

Aus der Anatomischen Anstalt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Laurenz Wurzinger

**Die molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix
des Lig. iliolumbale des Menschen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arnd Fredrik Viehöfer
aus Stolberg

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Milz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andrea Baur-Melnyk
Prof. Dr. med. Ekkehard Euler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	2
1.1	Anatomie.....	2
1.2	Biomechanik	3
1.3	Funktionelle Anpassung von Sehnen und Bandgewebe.....	4
1.4	Klinische Relevanz	6
1.5	Fragestellung.....	7
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Material.....	8
2.2	Methode	9
2.2.1	Feinpräparation	9
2.2.2	Kryomikrotomie.....	10
2.2.3	Immunhistochemische Markierung	10
3	Ergebnisse.....	14
3.1	Makroskopische Anatomie	14
3.2	Histologische Auswertung.....	14
3.3	Kollagene	16
3.3.1	Kollagen I (Col 1).....	16
3.3.2	Kollagen II (CIICI).....	17
3.3.3	Kollagen III (FH-7A).....	20
3.3.4	Kollagen VI (5C6).....	21
3.3.5	Kollagen X (Col-10).....	22
3.3.6	Kollagen XII (Anti (MAP) Type XII Collagen).....	24
3.3.7	Kollagen XIV (Anti (Map) Type XIV Collagen).....	24
3.4	Glykosaminoglykane	26
3.4.1	Dermatansulfat und Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChABC)	26
3.4.2	Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChACII).....	27
3.4.3	Chondroitin-6-sulfat (3B3 + ChABC).....	28
3.4.4	Keratansulfat (5D4)	29
3.5	Proteoglykane	30
3.5.1	Versican (12C5).....	30
3.5.2	Aggrecan (1C6).....	31
3.5.3	Link Protein (8A4).....	32
3.5.4	Fibromodulin (630 D1).....	33
3.6	Matrixproteine	34

3.6.1	Cartilage oligomeric matrix protein (COMP).....	34
3.7	Neurofilamente	35
3.7.1	Neurofilamente (RT 97).....	35
4	Diskussion	37
4.1	Methodik.....	37
4.1.1	Entnahme und Methanolfixierung	37
4.1.2	Feinpräparation und Kryomikrotomie	37
4.1.3	Immunhistochemie.....	38
4.2	Interpretation der Befunde	40
4.2.1	Kollagene	40
4.2.2	Glykosaminoglykane	43
4.2.3	Proteoglykane	46
4.2.4	Matrixproteine	47
4.2.5	Fettgewebe	48
4.2.6	Neurofilamente	49
4.3	Funktionelle Wertigkeit der Befunde	50
4.4	Klinische Relevanz der Befunde.....	55
5	Zusammenfassung	57
6	Danksagung	59
7	Lebenslauf.....	60
8	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

Bis zu 84 % aller Menschen in Deutschland leiden in ihrem Leben mindestens einmal an Rückenschmerzen (Schochat et al. 1998). Häufigste Lokalisation ist dabei die untere Wirbelsäule. In den Industrienationen treten hier bei 60% - 80% der Menschen im Laufe ihres Lebens Schmerzen auf (Borenstein 2001; Walker 2000). Epidemiologisch unterscheidet man spezifische Ursachen (wie z.B. Diskushernien oder Spinalkanalstenosen), welche durch Röntgenuntersuchungen, Biopsien oder Laboruntersuchungen diagnostizierbar sind, von unspezifischen Ursachen. Die unspezifischen Ursachen, bei denen durch diese Diagnostik kein eindeutiger Auslöser für die Schmerzen zu finden ist, machen dabei bis zu 85% der Fälle aus (Hirschberg et al. 1979; Vuori 2001). Eine Struktur deren möglicher Beitrag zu solch unspezifischen Schmerzsyndromen diskutiert wird ist das Lig. iliolumbale (Broudeur et al. 1981; Sims et al. 1996; Snijders et al. 2004).

1.1 Anatomie

Der lumbosakrale Übergang, die Verbindung zwischen Lendenwirbelsäule und Os sacrum, ist beim Menschen als bipedem Lebewesen von besonderer Bedeutung. Durch den Zweibeinstand wird das Gewicht des Oberkörpers über das Os sacrum, welches als Teil des Beckens fungiert, auf die Beine übertragen. Der fünfte Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule (L5) verbindet dabei als leicht keilförmiges Element die Wirbelsäule mit dem Os sacrum (Kapandji 1985). Aufgrund der Neigung der Deckplatte des Kreuzbeins tendiert der fünfte Wirbelkörper dazu nach vorne zu gleiten. Das Abrutschen des Wirbelkörpers nach ventral wird jedoch durch seine Abstützung über die kleinen Wirbelgelenke und das Os sacrum verhindert (Kapandji 1985). Kommt es zu einer Unterbrechung der Interartikularportion des Wirbelkörpers L5, wie bei Spondylolyse charakteristisch, kann dieser nur noch durch die Weichteilstrukturen gehalten werden und beginnt gegenüber dem Os sacrum nach ventral abzugleiten (Spondylolisthesis). Biomechanische Untersuchungen konnten zeigen, dass eine geringe

ventrale Verschiebung auch unter physiologischen Bedingungen zu beobachten ist (Snijders et al. 2004). Eine Struktur des Weichteilgewebes, die möglicherweise ein Wirbelgleiten verhindern kann, ist das Lig. iliolumbale. Das Lig. iliolumbale stellt dabei einen Bandkomplex dar, in dem sich unterschiedliche Faserzüge anhand ihres Verlaufs abgrenzen lassen (Henle 1871). Neben Faserzügen, die den Processus transversus des fünften Lendenwirbels mit dem Becken verbinden, werden von einigen Autoren auch meist schwächere Faserzüge genannt, die den 4. Lendenwirbel mit dem Os ilium verbinden (Rucco et al. 1996, Waldeyer 1899, Bock 1849). Andere beschreiben darüber hinaus noch eine vertikal verlaufende iliosakrale Komponente (Pool-Goudzwaard et al. 2001, Hartmann 1881). Die Variabilität des Bandapparates drückt sich auch darin aus, dass die oben genannten Bandstrukturen wiederum in einzelne Zügel aufgespalten sein können. So beobachtet Fujiwara et al. (2000) in 70 % der von ihm untersuchten Fälle eine Aufspaltung des vom Processus transversus des 5. Lendenwirbels zum Os ilium ziehenden Bandanteils in einen vorderen und einen hinteren Zügel. Es erstaunt daher nicht, dass Angaben zu Ansatz, Ursprung und Verlaufsbeschreibung der einzelnen Bandstrukturen in der Literatur sehr variieren (Rucco et al. 1996).

1.2 Biomechanik

Da der lumbosakrale Übergang bei Bewegungen multiplen destabilisierenden Momenten unterliegt, wird dem Lig. iliolumbale auch unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende, mechanisch stabilisierende Funktion zugewiesen.

Rudolf Fick postulierte bereits 1904 eine Beanspruchung der Bandmasse bei Rotation der Wirbelsäule gegenüber dem Becken und folgerte weiter, dass das Band auch einem Abrutschen des 5. Lendenwirbels entgegenwirkt (Fick 1904).

Neuere Studien konnten anhand von biomechanischen Modellen zeigen, dass das Lig. iliolumbale Bewegungen des lumbosakralen Übergangs in vitro begrenzt (Yamamoto et al. 1990; Chow et al. 1989; Leong et al. 1987). Das Restriktions-Ausmass variiert dabei bezüglich der einzelnen Bewegungsrichtungen in verschiedenen Studien. Yamaoto et al. (1990) beschreiben in ihrer Arbeit eine Stabilisierung des lumbosakralen Übergangs durch das Lig. iliolumbale in allen Bewegungsrichtungen, während Leong et. al. (1987)

keine Bewegungsbeschränkung durch dieses Band bei der Extension erkennen. Die unterschiedlichen Beobachtungen sind jedoch nicht verwunderlich, da zum einen verschiedene Testapparaturen verwendet wurden, die sich der realen Situation auf unterschiedlicher Weise nähern und zum anderen eine grosse anatomische Variabilität des Bands beschrieben ist.

1.3 Funktionelle Anpassung von Sehnen und Bandgewebe

Sehnen und Bänder stellen kein morphologisch-einheitliches Gewebe dar, sondern besitzen die Fähigkeit sich an lokale Belastungen funktionell anzupassen. Dieses Phänomen, welches als „kausale Histogenese“ bezeichnet wird (Pauwels 1965, Milz et al. 1995) folgt dabei dem Prinzip „form follows function“ (Pauwels 1965). Im Tierversuch konnte bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts gezeigt werden, dass Sehngewebe an druckbeanspruchten Stellen faserknorpelige Veränderungen ausbildet, welche unter reiner Zugbeanspruchung wieder verschwinden (Ploetz 1938). Bei humanen Lebewesen konnte die Ausbildung von Faserknorpel im Bandverlauf für Gleitsehnen, also dort, wo die Sehne um knöcherne Strukturen gelenkt wird, ebenfalls nachgewiesen werden (Benjamin et al. 1995). Dieser Faserknorpel zeigt grosse, rundliche bis ovale, den Chondrozyten ähnliche Zellen (Benjamin et al. 1990), welche sich von den in Zugsehnen vorkommenden Fibroblasten mit sternförmiger Gestalt unterscheiden. Für die mechanischen Eigenschaften ist jedoch weniger der Zelltyp, sondern die extrazelluläre Matrix (ECM) entscheidend (Benjamin et al. 1997). Diese weist im Faserknorpel eine dem hyalinen Knorpel ähnliche Zusammensetzung auf. Für den Faserknorpel typische Matrixmoleküle sind vor allem sulfatierte Glykosaminoglykane (GAG), Proteoglykane, wie z.B. Aggrecan, sowie Kollagen II (Vogel 1995). Diese ECM besitzt einen hohen Wassergehalt und erlaubt es dem Faserknorpel neben Zug auch Druckkräften zu widerstehen (Vogel et al. 1989). Die Kollagenfasern in diesen Bandabschnitten der Sehne zeigen dabei typischerweise einen „korbgeflecht-artigen“ Verlauf. Es wird vermutet, dass diese Verflechtung der Fasern ein Auseinanderweichen der Fasern unter der Druckbehandlung verhindern soll. Aufgrund der unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Knochen und Sehne bzw. Band ist die Anheftungsstelle dieser, welche auch Enthesis genannt wird, von

besonderer Bedeutung. Funktionell und morphologisch lassen sich dabei zwei Arten von Insertionen unterscheiden: faserige und faserknorpelige. Faserige Anheftungsstellen können dabei direkt an Knochengewebe ansetzen oder über das Periost mit diesem verbunden sein (Benjamin et al. 1986). Eine faserige Enthese findet sich zum Beispiel bei den Ansatzstrukturen einiger Muskel, wie z.B. bei dem M. deltoideus (Benjamin 2002). Im Bereich einer faserknorpeligen Enthese findet sich eine Übergangzone aus Faserknorpel zwischen Sehne und dem periostfreien Knochen, so dass sich typischerweise folgender Aufbau der Enthese ergibt (Benjamin et al. 1986): Dem Sehngewebe schliesst sich eine Zone mit unmineralisiertem Faserknorpel an. Dieser Zone folgt verkalkter Faserknorpel, der neben den knorpeltypischen Zellen auch mineralisierte extrazelluläre Matrix (ECM) aufweist. Daran grenzt schliesslich Knochengewebe. Dieser Aufbau gewährleistet die graduelle Anpassung der unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Knochen und Bandgewebe, wodurch Spitzenbelastungen vermieden werden können. Insbesondere die höhere Dehnfähigkeit (etwa 10 mal höher) der Sehne bzw. des Bands gegenüber der des Knochens spielt dabei eine wichtige Rolle (Knese 1958). Eine Dehnung in Längsrichtung bewirkt eine Querverkürzung des Bandes (bis zu 8%) (Alexander et al. 1984), die am Knochen-Band-Übergang zu erheblichen Scherkräften führen würde. Durch Ausprägung des druckresistenteren Faserknorpels am Übergang Knochen-Band kann eine Querverkürzung des Bandes behindert werden, wodurch auch die Längsdehnung eingeschränkt wird. Der Faserknorpel kann somit als „Dehnungsbremse“ betrachtet werden (Knese 1958).

Die Ausbildung einer faserknorpeligen Enthese erfolgt als Anpassung an eine mechanische Belastung. Ähnlich der oben erläuterten Situation bei Gleitsehnen werden lokale Druckkräfte für die Ausprägung einer faserknorpeligen Enthese verantwortlich gemacht. Abhängig von der wirkenden Zug- und Druckbeanspruchung, konnte eine Reihenfolge der exprimierten ECM-Moleküle beobachtet werden (Milz et al. 2005). Als Ursache einer lokalen Kompression werden Scherbeanspruchungen durch schräge Insertion des Bandes/ der Sehne und dynamische Insertionswinkeländerungen (Benjamin et al. 1986; Evans et al. 1990) angesehen.

1.4 Klinische Relevanz

Neben der Rolle des Lig. iliolumbale bei der Stabilisierung einer Spondylolyse, wird auch eine protektive Wirkung des Bands auf die Bandscheibe L5/S1 diskutiert. Durch die stabilisierende Wirkung des Lig. iliolumbale soll die Bandscheibe L5/S1 bei starker Ausprägung des Bandes besser vor einer Degeneration geschützt sein (Aihara et al. 2002). Aber auch bei den unspezifischen Rückenschmerzen erlangt das Lig. iliolumbale klinische Bedeutung. Einige Autoren machen das Lig. iliolumbale für mehr als die Hälfte der unspezifischen Rückenschmerzen verantwortlich und bezeichnen diese Schmerzzustände mit „iliolumbar syndrome“ (Broadhurst 1989; Hirschberg et al. 1979; Naeim et al. 1982; Rucco et al. 1996). Bei diesem Syndrom handelt es sich um meist einseitige Rückenschmerzen, die durch Lokalanästhetikainfiltration an der beckenseitigen Insertion des Lig. iliolumbale nachlassen (Hirschberg et al. 1979). Über die genaue Ursache dieser Schmerzsymptomatik gibt es in der Literatur verschiedene Theorien: Hanson et al. (1994) und Maigne et al. (1991) vermuten eine neuronale Ursache, wohingegen andere Autoren den Knochen-Band-Übergang des Lig. iliolumbale als Ausgangspunkt für das Schmerzsyndrom sehen (Snijders et al. 2008). Pathologische Veränderungen an den Insertionsstellen von Bändern und Sehnen, welche unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache als Enthesopathien bezeichnet werden, können im muskuloskeletalem System häufig beobachtet werden (z.B. Tennis- oder Golferellbogen). Histologisch zeichnen sich degenerative Veränderungen durch Zellhaufen von knorpelähnlichen Zellen, verkalkten Fissuren und Verknöcherungen in der Enthesis aus (Benjamin et al. 1997; Benjamin et al. 2007). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass in Sehngewebe nach einer Schädigung eine Kalzifikation innerhalb des Sehngewebes beobachtet werden kann (Lui et al. 2009). Hier stellt sich die Frage, welche Rolle die von einigen Autoren im Zusammenhang mit dem „iliolumbar syndrom“ diskutierten pathologischen Veränderungen der Enthesis (Basadonna et al. 1996) mit der in der Literatur beschriebenen Kalzifikation (Cotta 1964; Lapadula et al. 1991; Mainoldi 1952; Throuvalas 1951) des Bandes spielt.

Weitere klinische Bedeutung erlangt das Lig. iliolumbale bei Malgaigne-Frakturen des Beckenrings. Bei diesen Frakturen kann eine Instabilität des Beckens zu Scherkräften

führen, die einen Abriss des Processus transversus bedingen (Pennal et al. 1980; Reis et al. 1985). Eine solche Fraktur des Processus transversus kann nicht nur als diagnostischer Hinweis auf eine Instabilität des Beckens gewertet werden (Reis et al. 1985), sondern gibt auch indirekt Aufschluss über die relativ hohe mechanische Belastbarkeit des Bandes.

1.5 Fragestellung

Aufgrund der zuvor dargelegten Zusammenhänge ist es daher das Ziel diese Arbeit die folgenden Fragen zu klären:

1. Bestimmung der molekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des humanen Lig. iliolumbale.
2. Regionale Verteilung der verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix innerhalb des Lig. iliolumbale und seiner Anheftungszonen.
3. Bewertung der molekularen Zusammensetzung des Bandes im Hinblick auf die mechanische Funktion des Lig. iliolumbale unter Berücksichtigung der Biomechanik des lumbosakralen Übergangs.
4. Klinische Relevanz der Befunde, insbesondere im Zusammenhang mit möglichen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis sowie anderer Krankheitsbilder des rheumatischen Formenkreises.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Nach der einseitigen en bloc Entnahme von elf humanen lumbosakralen Übergängen inklusive der relevanten Anteile des Os ilium, wurden die Präparate zunächst für mindestens 6 Stunden bei +4°C und anschließend bei -20°C in 100% Methanol fixiert. Die Entnahme erfolgte mit Unterstützung des Instituts für Rechtsmedizin der LMU München nach den geltenden ethischen Verfahrensregeln.

Präparat Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Grösse [cm]	Gewicht [kg]	Seite	Todesursache
1	13	männlich	176	90,6	rechts	epileptischer Anfall DD: Myokarditis
2	48	weiblich	k.a.	k.a.	links	epidurales Hämatom nach Sturz
3	35	männlich	k.a.	k.a.	rechts	Herzversagen
4	30	männlich	166	67	rechts	Drogenintoxikation (Heroin)
5	44	männlich	167	68,1	rechts	zentrale Lungenembolie
6	27	männlich	179	65,5	links	zentrale Lähmung bei Sturz aus 8m Höhe
7	37	männlich	177	84,4	rechts	Polytrauma nach Verkehrsunfall (Motorradfahrer)
8	39	männlich	175	94,6	rechts	Drogenintoxikation
9	48	männlich	183	91,7	rechts	Verkehrsunfall
10	35	weiblich	164	68,4	rechts	Tötung
11	20	männlich	189	98,7	links	Verkehrsunfall

Tabelle 1 Biometrische Daten der Spender der Präparate

2.2 Methode

2.2.1 Feinpräparation

Im nächsten Schritt wurde das Lig. iliolumbale inklusive seiner knöchernen Ansätze anatomisch dargestellt und aus dem größeren Gewebblock herausgetrennt.

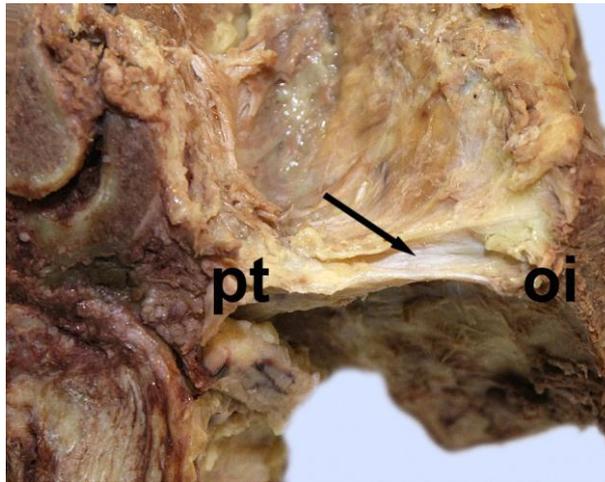


Bild 1: Darstellung des Lig. iliolumbale eines untersuchten Individuums; die Trennung des Bandes in einen vorderen und einen hinteren Zügel in diesem Präparat ist deutlich erkennbar; Blick von cranial: Lig. iliolumbale (Pfeil) mit Anheftungsstelle am Os ilium (oi) und Processus transversus (pt)

Nach Feinpräparation und Entfernung für die Untersuchung nicht-relevanter Strukturen wurden die Präparate zur Entkalkung in eine Lösung aus 12,5 % EDTA (gepuffert mit 1,5 % NaOH), welche jede Woche gewechselt wurde, gegeben. Wöchentliche Röntgenaufnahmen dienten dazu, den Grad der Entkalkung festzustellen. Jeweils nach sechs Wochen wurde eine Zwischenfixierung in 100% Methanol für 7 Tage durchgeführt. Diese Vorbehandlung ist die Voraussetzung um anschließend mittels eines Gefriermikrotoms (Cryo-Star HM560 MV / MICROM International GmbH, Walldorf Germany) histologisch verwertbare Schnitte anfertigen zu können.

2.2.2 Kryomikrotomie

Das Lig. iliolumbale wurde mit seinen knöchernen Anheftungsstellen für mindestens 12 Stunden in eine PBS-Pufferlösung mit 5% Saccharose gegeben um ein gewebeschonendes Einfrieren zu ermöglichen.

Anschließend wurden die Präparate auf Präparathaltern mittels Gefriermedium (Tissue freezing medium, Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch Germany) bei -20°C aufgefroren. Zu grosse Proben wurden zuvor in der Mitte des Bandes geteilt, die Teilstücke wurden dann gesondert weiterverarbeitet. Um die für die Untersuchung relevante Band-Knochen-Ansatzebene darzustellen, wurden zunächst $40\mu\text{m}$ dicke Trimmschnitte abgetragen. Das Auffinden der korrekten Schnittebene wurde mittels Toluidinblaufärbung einzelner Schnitte überprüft. Zur histologischen Untersuchung wurden in Längsrichtung des Lig. iliolumbale $12\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und mit Objektträgern (Super Frost Plus / Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig Germany) aufgenommen. Bis zur immunhistochemischen Markierung wurden diese Schnitte bei -20°C gelagert.

2.2.3 Immunhistochemische Markierung

Die immunhistochemische Markierung zum Nachweis der Kollagene I, II, III, VI, X, XII, XIV der Glykosaminoglykane Chondroitin-6-sulfat, Chondroitin-4-sulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat, der Proteoglykane Versican, Link Protein, Aggrecan, des Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Fibromodulin und Neurofilament erfolgte mit Hilfe eines Autostainers (LABVision Autostainer 480 / MICROM GmbH, Walldorf Germany) oder durch Inkubation von Hand. Am Tag vor der Färbung wurden die Präparate bei denen Aggrecan oder Link Protein dargestellt werden sollte, einem Reduktionsschritt mit 10 mM DTT (in 25 mM Tris + 100mM NaCl) unterzogen. In einer alkylierenden Lösung (40 mM Jodacetamid in PBS) wurde anschließend bei 37°C für 1 Stunde eine Stabilisierung der gespaltenen Disulfidbrücken erreicht. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden sie in einer feuchten Kammer bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag aufbewahrt.

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Markierung wurden alle Proben auf dem jeweiligen Objektträger mit einem hydrophoben Dako Pen (Dako Pen / Dako Denmark, Glostrup Denmark) umrandet, damit die später aufgetragenen Reagenzien nicht vorzeitig unkontrolliert abfließen konnten.

Im ersten Schritt des Färbeprotokolls erfolgte eine Enzymvorbehandlung (Hyaluronidase, Chondroitinase ABC, Chondroitinase AC) für 30 Minuten bei 37°C zur Demaskierung der jeweiligen Epitope der einzelnen Antikörper (siehe Tabelle 2). Nach einem Waschschrift (3 x 5 Minuten mit PBS + Tween) wurde eine Blockierung mit Normalserum vorgenommen (Pferdeserum 1:20 für 60 Minuten bei Raumtemperatur), wodurch eine unspezifische Proteinbindung minimiert wurde. Nun wurden Primärantikörper gegen die untersuchten ECM-Bestandteile bei Raumtemperatur für 30 Min. aufgetragen. Um eine erhöhte Sensitivität zu erreichen wurden der Antikörper gegen Chondroitin-6-sulfat, gegen Kollagen XII und gegen Kollagen XIV über Nacht (12 Stunden) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Als Kontrolle wurde der Erstantikörper mit PBS ersetzt, um Färbungen aufgrund unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers erkennen zu können. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift und anschließend die Inkubation mit einem biotinmarkiertem Zweitantikörper, welcher gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Aus diesem Grund wurde bei den monoklonalen Primärantikörpern aus der Maus ein Zweitantikörper gegen Maus IgG verwendet. Dieser wurde auf Grund der guten Kreuzreaktion mit den Primärantikörpern aus der Ratte auch bei dem Antikörper gegen COMP eingesetzt. Bei den Antikörpern gegen Kollagen XII und Kollagen XIV stammt der Primärantikörper aus dem Kaninchen, so dass hier ein Zweitantikörper gegen Kaninchen IgG eingesetzt wurde. Die Präparate wurden erneut gewaschen und danach mit dem Avidin/Biotin/Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC KIT / Vector Laboratories Inc., Burlingame USA) inkubiert. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und ermöglicht so eine Vernetzung zwischen dem biotinyliertem Zweitantikörper und dem ABC Komplex. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Chromogen DAB aufgetragen. Die Umsetzung des Chromogens durch die Peroxidase des ABC Komplexes erzeugt einen braunen Niederschlag und führt somit zur mikroskopisch detektierbaren Markierung der durch den Primärantikörper erkannten Strukturen.

Die Kern-Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Mayer. Unmittelbar nach der Differenzierung in Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 80% - 96% - 100% - 100%) für jeweils 5 Minuten entwässert und in Xylol überführt. Schließlich wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt.

Färbungen von Schnitten, bei denen es Zweifel an einer einheitlichen maschinellen Markierung gab oder solche die (ganz oder teilweise) verloren gingen, wurden nach selbigem Schema per Hand wiederholt.

Alle labortechnischen Untersuchungen wurden im AO Forschungsinstitut Davos, Schweiz, in der Abteilung „Tissue Morphology“ durchgeführt.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Wirtstier	Enzym	Bezugsquelle	Referenz
Kollagen I	COL-1	1:2000	Maus	Hyal (1,5IU/ml)	Sigma-Aldrich	Mayne 1988
Kollagen II	CIIC1	1:6	Maus	Hyal (1,5IU/ml)	DSHB	Holmdahl et al. 1986
Kollagen III	FH-7A	1:4000	Maus	Hyal (1,5IU/ml)	Sigma-Aldrich	Olsen et al. 1993
Kollagen VI	5C6	1:5	Maus	Hyal (1,5IU/ml)	DSHB	Hessle & Engvall 1984
Kollagen X	COL-10	1:2000	Maus	Hyal (1,5IU/ml)	Sigma-Aldrich	Sanes et al. 1990
Kollagen XII	Anti (MAP) Type XII Collagen	1:100	Kaninchen	Hyal (1,5IU/ml)	Cosmo Bio Co	keine
Kollagen XIV	Anti (MAP) Type XIV Collagen	1:100	Kaninchen	Hyal (1,5IU/ml)	Cosmo Bio Co	keine
Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)	MA37C94 (rat)	1:7	Ratte	keine	Serotec	keine
Fibromodulin	630D1	1:100	Maus	keine	Kamiya	keine
Versican	12C5	1:5	Maus	ChAC (0,25IU/ml)	DSHB	Asher et al. 1991, 1995
Link Protein	9/30/8A4	1:5	Maus	ChAC (0,25IU/ml) nach Red. und alkyl. Lsg.	DSHB	Calabro et al. 1992
Aggrecan	12/21/1C6	1:5	Maus	ChAC (0,25IU/ml) nach Red. und alkyl. Lsg.	DSHB	Calabro et al. 1992
Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat	2B6	1:1500	Maus	ChABC (0,25IU/ml)	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-4-sulfat	2B6	1:1500	Maus	ChAC (0,25IU/ml)	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-6-sulfat	3B3	1:200	Maus	ChABC (0,25IU/ml)	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Keratansulfat	5D4	1:1500	Maus	keine	B.Caterson	Caterson et al. 1983
Neurofilamente	RT97	1:5	Maus	keine	DSHB	keine

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper mit Angaben zu Herkunft und Vorbehandlung; Red. = Reduktion, alkyl. Lsg. = alkylierende Lösung, Hya =Hyaluronidase, ChABC = Chondroitinase ABC, ChAC = Chondroitinase AC, DSHB = Developmental studies hybridoma bank, Iowa University, USA

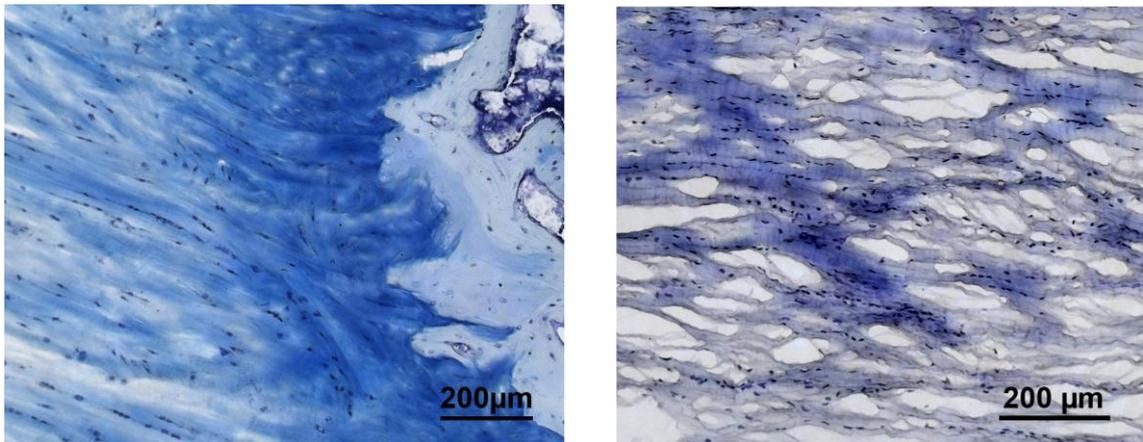
3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Anatomie

In allen untersuchten Leichen kann das Lig. iliolumbale als morphologisch klar abgrenzbare Struktur identifiziert werden. Die Faserzüge des Bandes verbinden in den von uns untersuchten Proben den Processus transversus des 5. Lendenwirbels mit dem Kamm des Os ilium und können bei einigen Individuen als singuläre, bei anderen als mehrteilige Faserstruktur beobachtet werden. Wenn das Lig. iliolumbale in unserer Untersuchung mehrere Züge aufweist, sind die Räume zwischen den Faserzügen meist mit Fettgewebe ausgefüllt. Der Verlauf der untersuchten Bänder zeigt eine deutlich kleinere vertikale als horizontale Komponente.

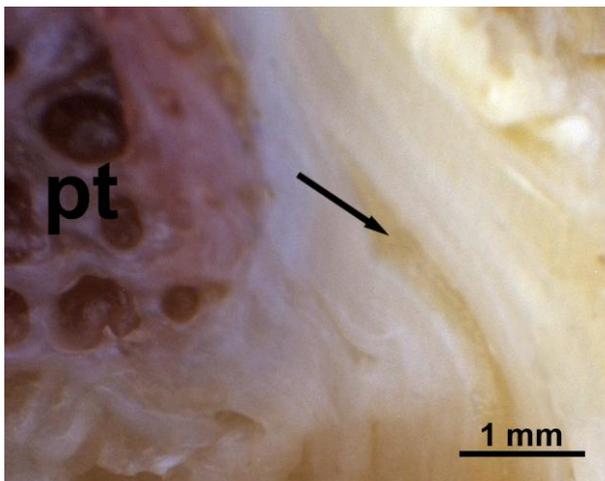
3.2 Histologische Auswertung

Die Toluidinblaufärbung der Präparate zeigt bei neun der elf Anheftungsstellen am Os ilium, sowie bei elf Anheftungsstellen am Processus transversus eine intensiv dunkelblau bis violett gefärbte Zone, die als Zeichen für eine Metachromasie gewertet wird. Bei fünf Präparaten konnten Stellen innerhalb des Bandes gefunden werden, die ebenfalls solche metachromatisch reagierenden Abschnitte zeigen. In diesen Bereichen lassen sich vermehrt Zellen mit rundlichen Zellkernen finden, welche sich hinsichtlich ihrer Morphologie von den eher länglichen Zellkernen des Bandes unterscheiden.



*Bild 2: links: Metachromasie im Enthesisbereich eines Processus transversus
rechts: metachromatisch reagierender Abschnitt innerhalb eines Bandes*

In drei Präparaten lassen sich Ansammlungen von rundkernigen Zellen (Clusterbildung) beobachten; zwischen den Clusterbildungen finden sich teilweise zellfreie Bereiche mit amorpher Substanz. Heterotope Knochenformationen lassen sich in zwei dieser Präparate identifizieren. Außerdem kann in einigen Proben Fettgewebe innerhalb des Bandes gefunden werden.



*Bild 3: Fett (Pfeil) innerhalb des Lig. iliolumbale;
links im Bild: Processus transversus (pt)*

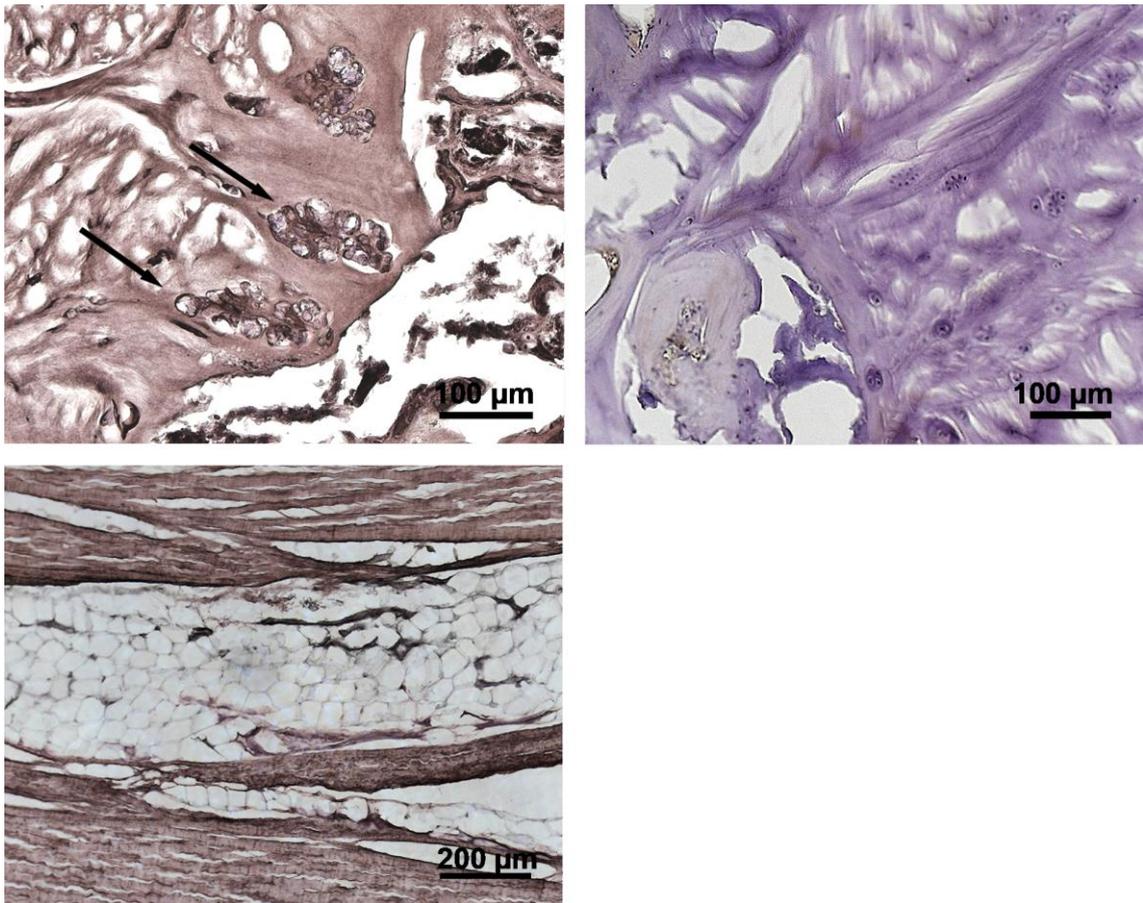


Bild 4: oben links: Vergrößerung zeigt knorpelzelltypische Zellgruppen (Pfeile) und amorphe Substanz. Kollagen XII Färbungen am Processus transversus
oben rechts: knöcherner Formation und Zellproliferationen. Kollagen X Färbung des Ansatzes am Os ilium
unten links: Fettgewebe innerhalb des Lig. iliolumbale Kollagen I Färbung

3.3 Kollagene

3.3.1 Kollagen I (Col 1)

Die Markierung für Kollagen 1 ergibt bei allen Lig. iliolumbalia in Bandmitte sowie an den knöchernen Anheftungszonen eine stark positive Markierung. An der Enthesis

des Processus transversus lässt sich in 7 Fällen, an der des Os ilium in 8 Fällen, ein nicht gefärbter streifenförmiger Bereich, das sogenannte gap-Phänomen, nachweisen.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	+g	+	+
2	+	+	+g
3	+	+	+g
4	+g	+	+
5	+	+	+g
6	+g	+	+g
7	+g	+	+g
8	+g	+	+g
9	+	+	+
10	+g	+	+g
11	+g	+	+g

Tabelle 3: Kollagen I:

+ = positiver Nachweis, - = kein Nachweis, g = gap-Phänomen

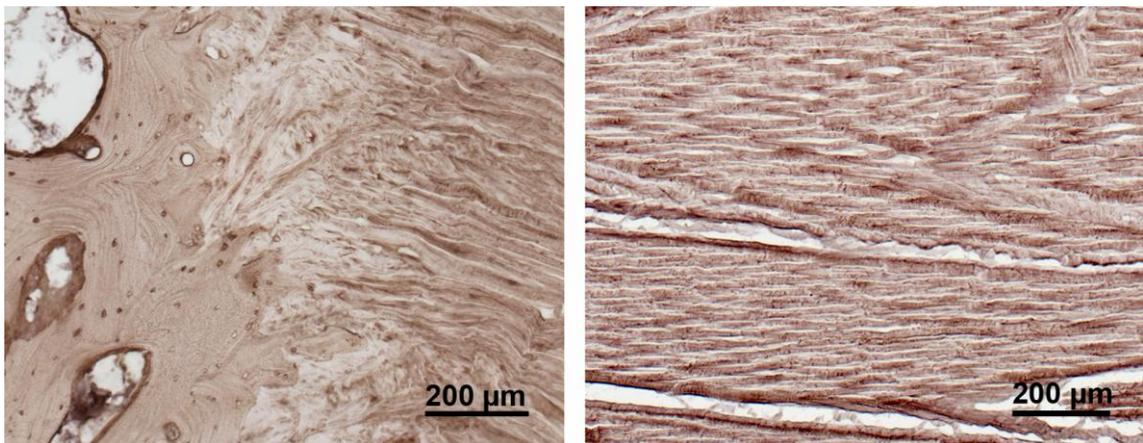


Bild 5: links: Kollagen I Nachweis im Enthesisbereich eines Processus transversus;
gap-Phänomen
rechts: Kollagen I Nachweis im Band

3.3.2 Kollagen II (CHIC)

In beiden Enthesisregionen zeigt sich in allen untersuchten Proben eine deutlich positive Markierung für Kollagen II. Die Größe des markierten Bereichs variiert jedoch zwischen den verschiedenen Individuen. In einigen Individuen zeigt die Markierung an

der Enthese am Os ilium eine deutlich grössere Ausdehnung, als die am Processus transversus (vgl. Bild 7). In den mittleren Bandbereichen kann in 4 Proben Kollagen II nachgewiesen werden.

Präparat Nr.	Enthese: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthese: Os ilium
1	+	+	+
2	+	(+)	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	(+)	+
10	+	(+)	+
11	+	-	+

Tabelle 4. Kollagen II:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

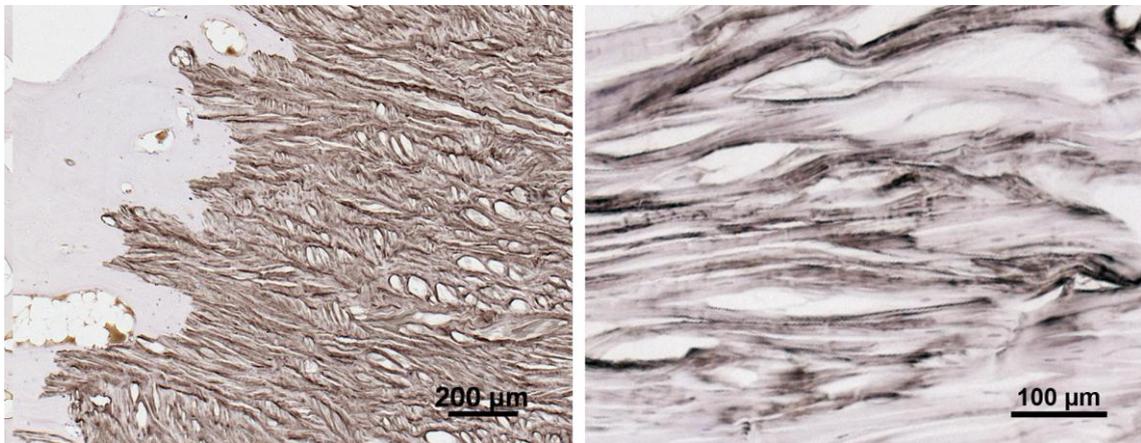


Bild 6: links: Kollagen II Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium. Sowohl der mineralisierte wie auch der nicht mineralisierte Faserknorpelbereich sind markiert

rechts: Fleckige Kollagen II Markierung im mittleren Bandbereich

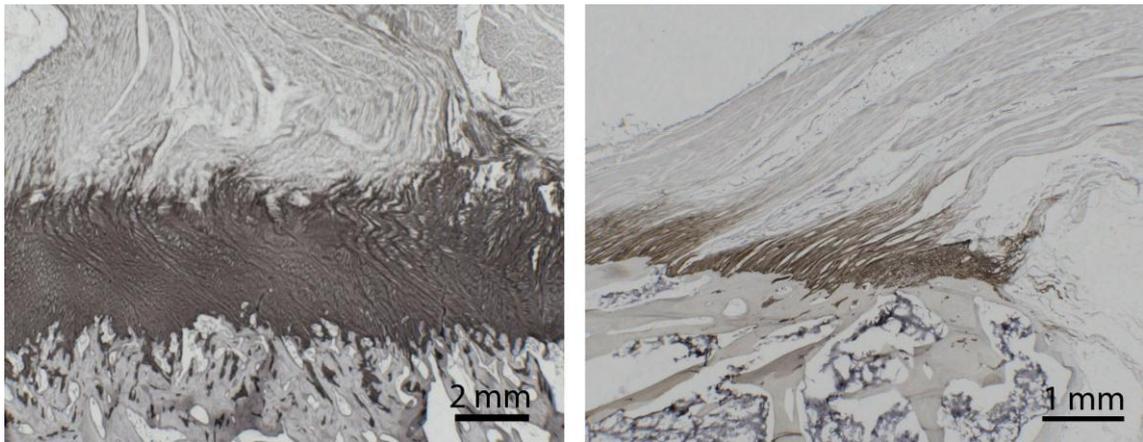


Bild 7: links: Kollagen II Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium. Sowohl der mineralisierte, wie auch der nicht mineralisierte Faserknorpelbereich sind markiert

rechts: Kollagen II Nachweis im Enthesisbereich eines Processus transversus

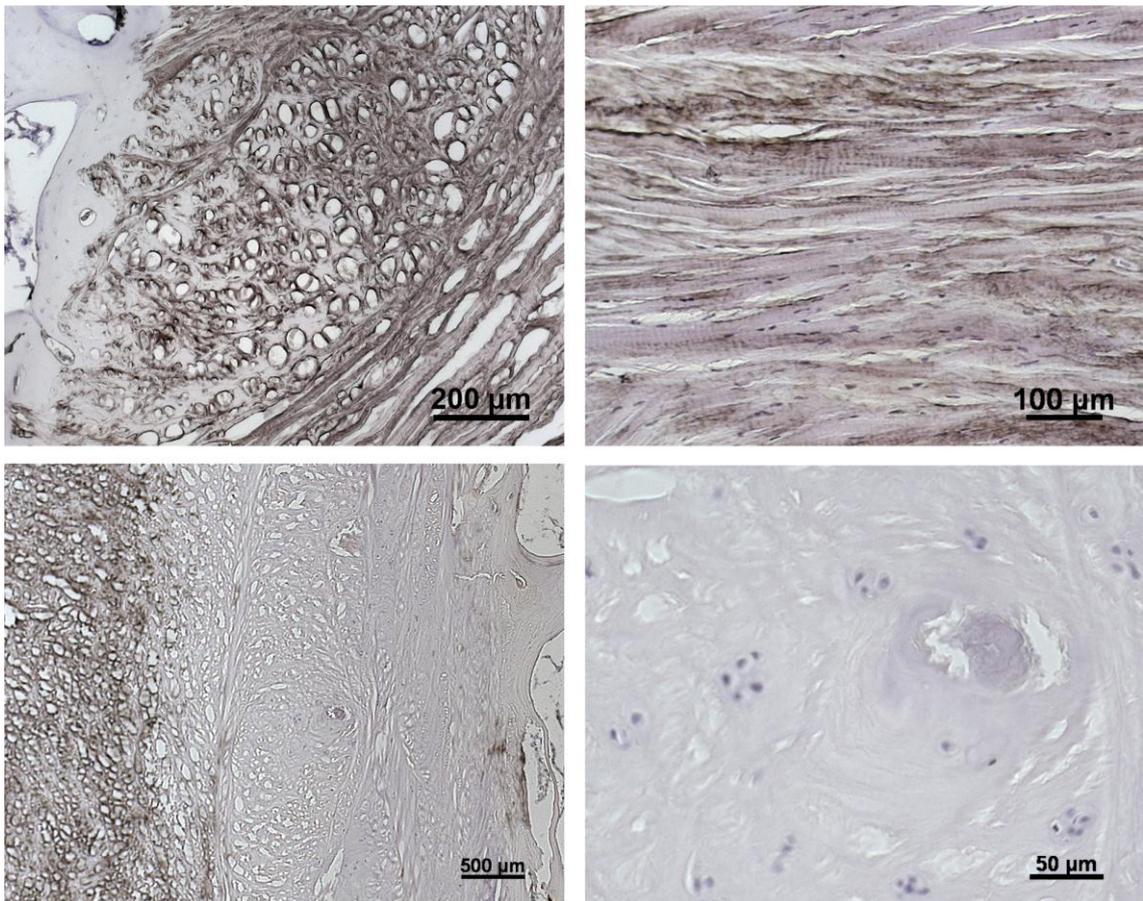
3.3.3 Kollagen III (FH-7A)

Kollagen III kann in allen Proben nachgewiesen werden. Die Markierung weist bis auf einige wenige Ansätze einen fleckigen Charakter auf. An zwei Enthesisregionen des Os ileum lässt sich ein nahezu kompletter Ausfall der Färbung nachweisen. In einem dieser Präparate finden sich in dem ungefärbten Bereich der Enthesis Ansammlungen von knorpelähnlichen Zellen, die sich um eine Stelle mit amorpher extrazellulärer Substanz gruppieren.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ileum
1	(+)	(+)	+
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	+
5	+	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	+g
8	(+)	(+)	+g
9	+	(+)	+
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	+

Tabelle 5. Kollagen III:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, g = Ausfall der Markierung



*Bild 8: oben links: Kollagen III Nachweis im Enthesisbereich eines Processus transversus; „Basket-weave“ Muster
oben rechts: Fleckige Kollagen III Färbung im Band
unten links: Rückgang der Färbung im Enthesisbereich eines Os ilium
unten rechts: Vergrößerung zeigt chondrozytenähnliche Zellen welche von amorpher Extrazellulärschubstanz umgeben sind*

3.3.4 Kollagen VI (5C6)

In allen Proben kann ein positiver Nachweis für Kollagen VI erbracht werden. Im Bereich der Enthesis ist in allen Fällen eine aufgelockerte Markierung zu beobachten. In einem Präparat ist die Färbung im Anheftungsbereich sogar vollständig aufgehoben. In den meisten Fällen lassen sich auch im mittleren Teil des Bandes Stellen mit einer fleckigen Färbung nachweisen.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	+	(+)
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)g
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	+	(+)
11	(+)	+	(+)

Tabelle 6. Kollagen VI:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, g = Rückgang der Färbung

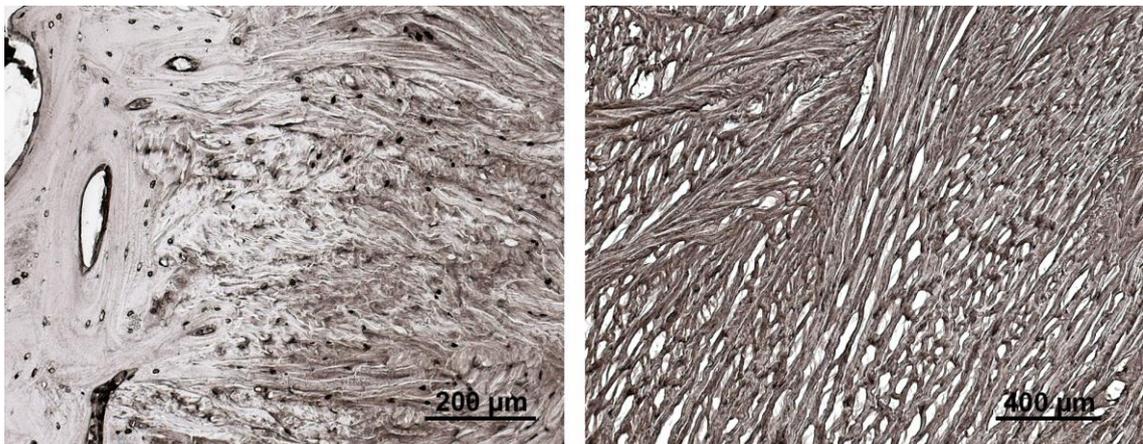


Bild 9: links: Kollagen VI Markierung im Enthesisbereich eines Processus transversus

rechts: Kollagen VI Nachweis im Übergangsbereich Band/Enthesis

3.3.5 Kollagen X (Col-10)

Die Markierung für Kollagen X ergibt ein weniger einheitliches Bild. Bei acht Individuen kann Kollagen X sowohl an der Enthesis des Os ilium als auch der des Processus transversus nachgewiesen werden. Bei einer Probe der beckenständigen Anheftungszone, wie auch bei einer der wirbelseitigen, kann Kollagen X bei fehlender Markierung der anderen Enthesis nachgewiesen werden. Die Markierung hat

überwiegend fleckigen Charakter, wobei ein dichteres Färbemuster in einigen Fällen an der bandseitigen Entheseisregion zu beobachten ist. Im mittleren Bandabschnitt kann bei sieben Individuen ein positiver Nachweis erbracht werden. Der Charakter der Färbung ist dabei sehr unterschiedlich und zeigt neben einer streckenweise fleckigen Markierung auch teilweise eine Markierung kleiner Areale, die scheinbar zwischen einzelnen Faserzügeln zu liegen scheinen.

Präparat Nr.	Entheseis: Processus transversus L5	Bandmitte	Entheseis: Os ilium
1	(+)	-	-
2	-	-	-
3	-	-	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	-	(+)
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)

Tabelle 7. Kollagen X:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

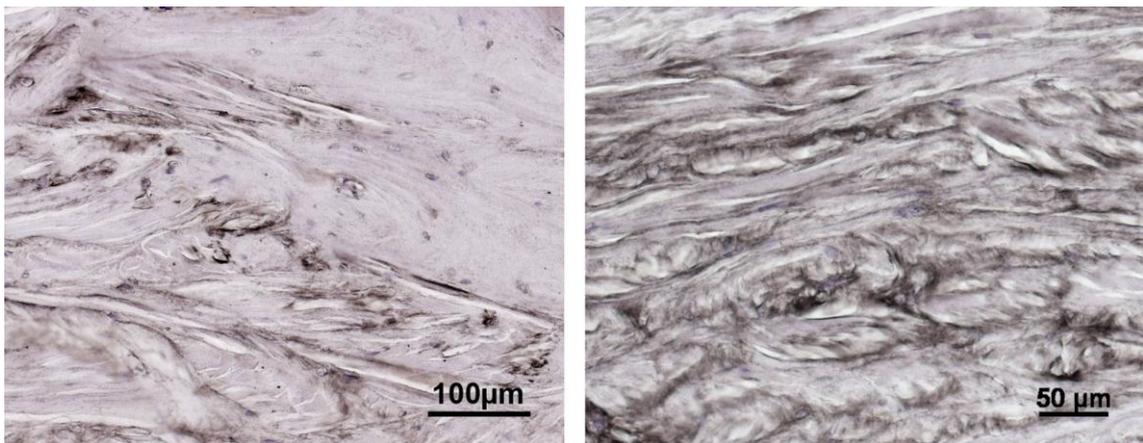


Bild 10: links: Kollagen X Nachweis im Entheseisbereich eines Processus transversus
rechts: Kollagen X Markierung im Band

3.3.6 Kollagen XII (Anti (MAP) Type XII Collagen)

Alle Proben zeigen eine flächige Markierung für Kollagen XII in Bandmitte mit einer geringfügigen Auflockerung der Markierung zu den Anheftungsstellen hin.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	+	(+)
2	+	+	(+)
3	+	+	(+)
4	(+)	+	(+)
5	+	+	(+)
6	(+)	+	(+)
7	(+)	+	(+)
8	(+)	+	(+)
9	+	+	(+)
10	(+)	+	(+)
11	(+)	+	+

Tabelle 8. Kollagen XII:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert

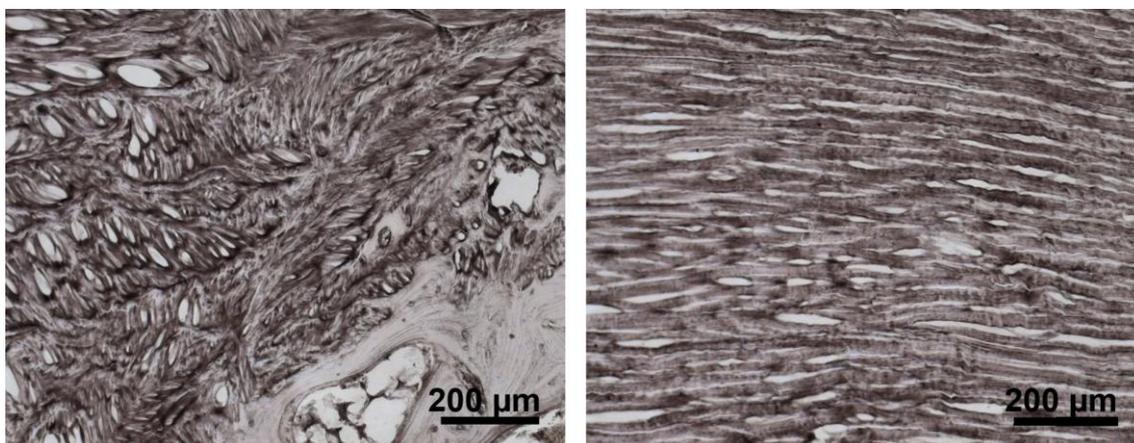


Bild 11: links: Kollagen XII Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
rechts: Kollagen XII Färbung im Band

3.3.7 Kollagen XIV (Anti (Map) Type XIV Collagen)

Die Markierung für Kollagen XIV ist in allen Bändern und deren Ansatzstellen positiv. An der Enthesis zeigt sich bei den meisten Präparaten eine eindeutige Auflockerung der

sonst eher homogenen Markierung. In fünf mittleren Bandabschnitten können ebenfalls Stellen mit fleckiger Markierung beobachtet werden.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	+	(+)
2	+	(+)	(+)
3	(+)	+	(+)
4	(+)	+	(+)
5	+	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	+	(+)
9	(+)	+	(+)
10	(+)	(+)	(+)
11	+	+	+

Tabelle 9. Kollagen XIV:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert

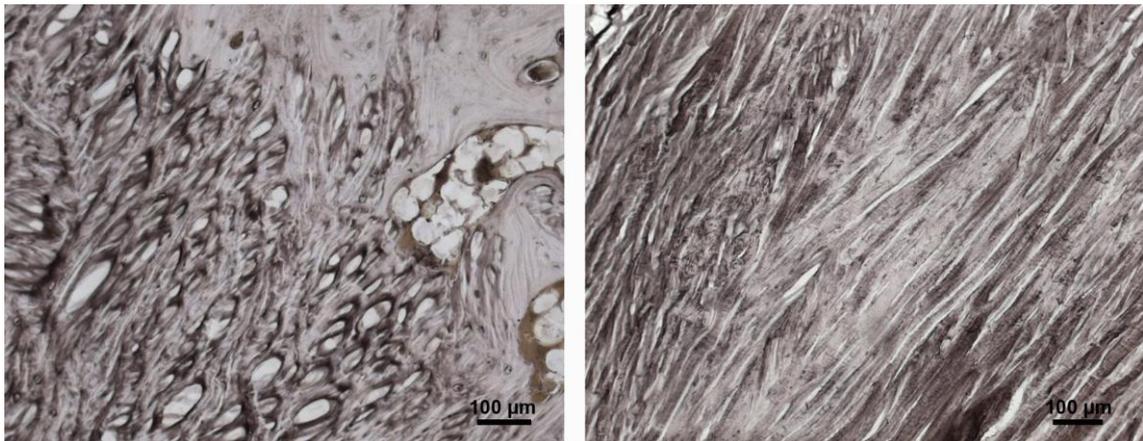


Bild 12: links: Kollagen XIV Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium

rechts: Kollagen XIV Färbung im Band

3.4 Glykosaminoglykane

3.4.1 Dermatansulfat und Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChABC)

Nach der Vorbehandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC erkennt der Antikörper 2B6 sowohl Dermatansulfat, als auch Chondroitin-4-sulfat. In der vorliegenden Arbeit lässt sich eine Markierung mit 2B6 nach der Inkubation der Schnitte mit Chondroitinase ABC in allen Bändern erkennen. Die Enthese am Os ilium markiert in 10 Fällen, die am Proc. transversus in 8 Fällen, fleckig.

Präparat Nr.	Enthese: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthese: Os ilium
1	(+)	+	-
2	-	(+)	(+)
3	-	(+)	(+)
4	Z	+	(+)
5	(+)	+	(+)
6	-	+	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)
9	(+)	+	(+)
10	(+)	+	(+)
11	(+)	+	(+)

Tabelle 10. Dermatansulfat und Chondroitin-4-sulfat:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis,
Z = Nachweis positiv markierter Zellen

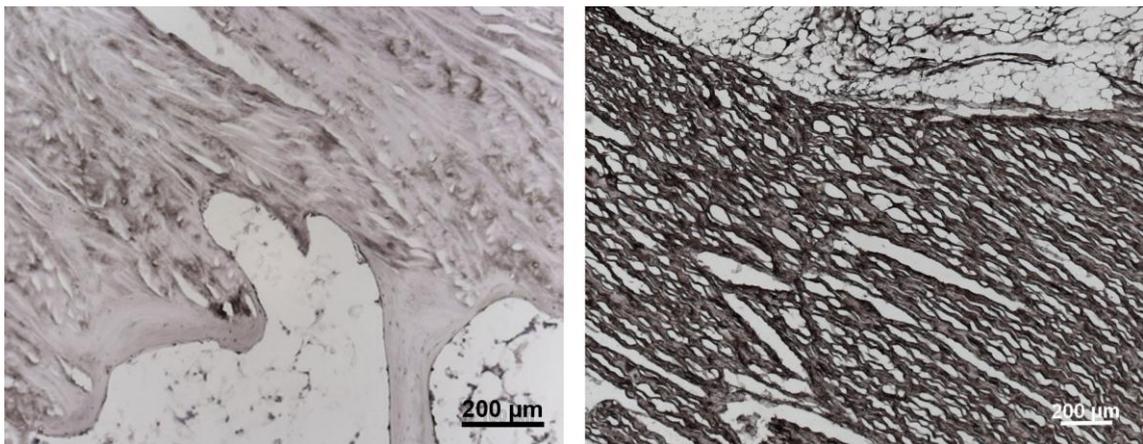


Bild 13: links: Dermatan- und Chondroitin-4-sulfat-Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium

rechts: Dermatan- und Chondroitin-4-sulfat-Nachweis im Band

3.4.2 Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChACII)

Nach der Vorbehandlung mit dem Enzym Chondroitinase ACII erkennt der Antikörper 2B6 Chondroitin-4-sulfat, nicht jedoch Dermatansulfat. An der Anheftungszone des Lig. illiolumbale am Proc. transversus lässt sich in 4 Fällen, an der Enthesis des Os ilium in 8 Fällen, eine positive Markierung nachweisen. Die mittleren Bandpartien zeigen in allen Präparaten eine positive Markierung.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	+	-
2	(+)	(+)	(+)
3	-	+	(+)
4	-	(+)	-
5	-	(+)	(+)
6	-	(+)	(+)
7	-	(+)	(+)
8	-	(+)	(+)
9	-	+	(+)
10	(+)	+	(+)
11	Z	+	-

Tabelle 11. Chondroitin-4-sulfat :

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert,

- = kein Nachweis, Z = Nachweis positiv markierter Zellen

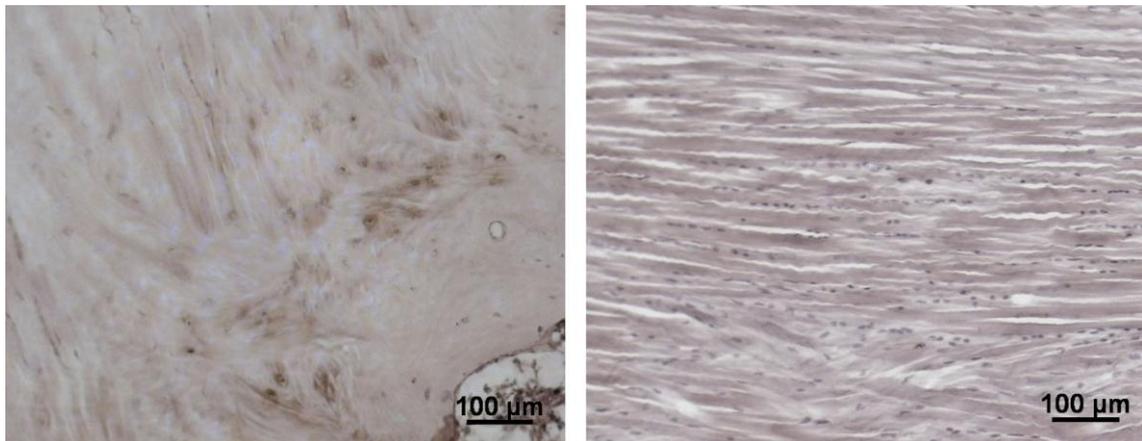


Bild 14: links: Chondroitin-4-sulfat-Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
rechts: Chondroitin-4-sulfat-Nachweis im Band

3.4.3 Chondroitin-6-sulfat (3B3 + ChABC)

Chondroitin-6-sulfat kann in 10 becken seitigen Anheftungsstellen des Bandes nachgewiesen werden. An den Processus transversus zeigen 9 Anheftungsstellen eine fleckige Markierung. In der Bandmitte können in 7 Proben gefärbte Abschnitte nachgewiesen werden.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	-	-
2	-	(+)	(+)
3	(+)	-	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	-	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	-	(+)
9	(+)	-	+
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)

Tabelle 12. Chondroitin-6-sulfat:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

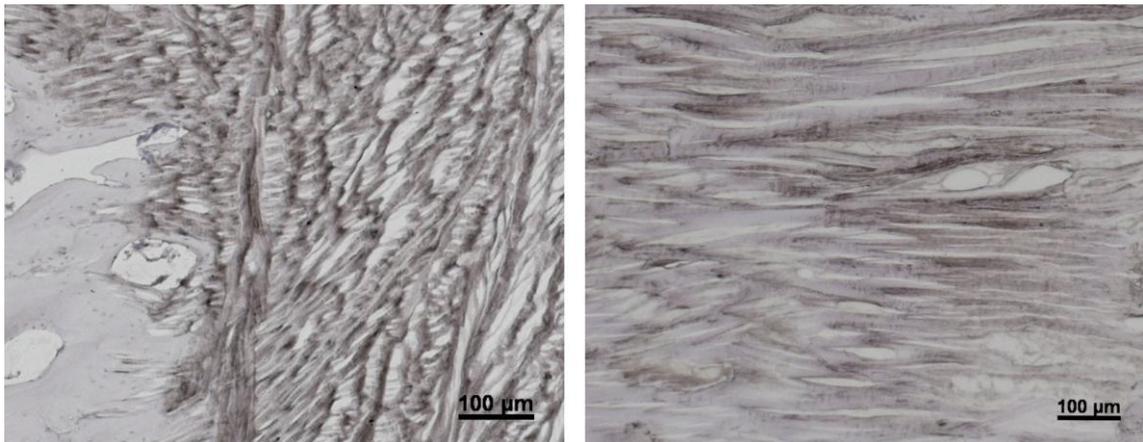


Bild 15: links: Chondroitin-6-sulfat-Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
rechts: Chondroitin-6-sulfat-Nachweis im Band

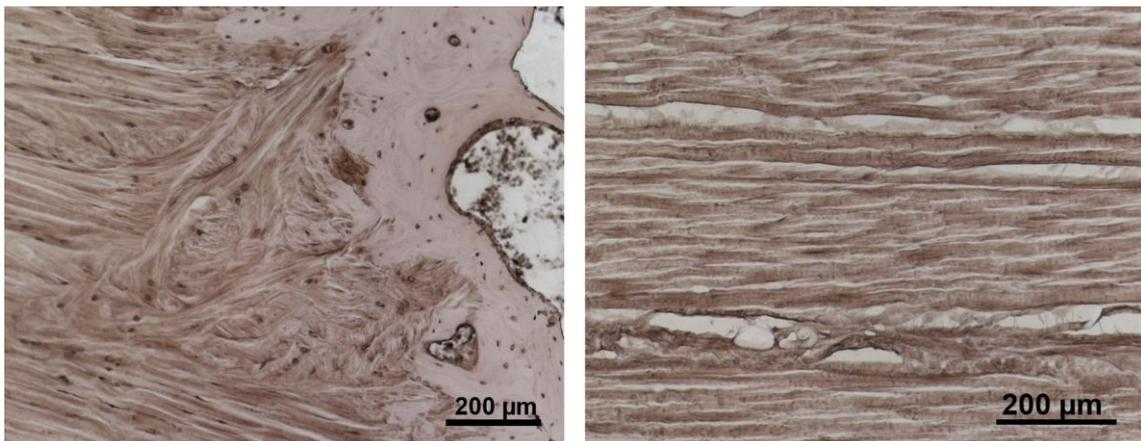
3.4.4 Keratansulfat (5D4)

Der immunhistochemische Nachweis für Keratansulfat ist für alle Ligg. iliolumbalia in Bandmitte, sowie an den knöchernen Anheftungszonen positiv. Die Färbung ist flächig über alle Bereiche des Bandes verteilt und zeigt fast immer einen leicht fleckigen Charakter. Eine Auflockerung der Färbung zu den Anheftungszonen hin kann nicht beobachtet werden.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	+	+	(+)
2	(+)	(+)	+
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	+
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	+

Tabelle 13. Keratansulfat:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert



*Bild 16: links: Keratansulfat Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
rechts: Keratansulfat Nachweis im Band*

3.5 Proteoglykane

3.5.1 Versican (12C5)

Die Markierung für Versican zeigt in allen Präparaten eine fleckige Verteilung. Lediglich bei einer Probe lässt sich an der Anheftungszone am Processus transversus kein positiver Nachweis erbringen.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	+	+	+
2	-	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	+	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)

Tabelle 14 Versican:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

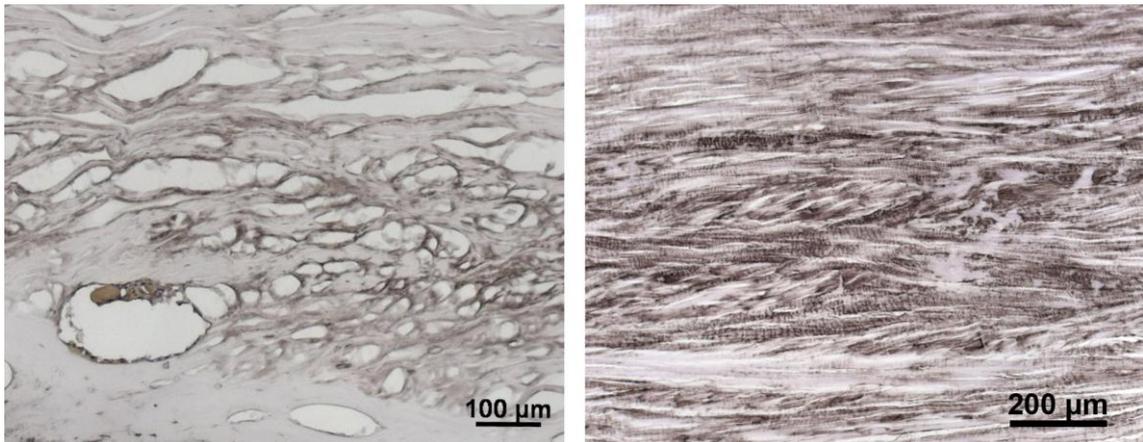


Bild 17: links: Versican Nachweis im Enthesisbereich eines Processus transversus
rechts: Versican Nachweis im Band

3.5.2 Aggrecan (1C6)

Der Antikörper 1C6 markiert alle becken seitigen Enthesisregionen und mit einer Ausnahme alle Anheftungszonen am Processus transversus des Lig. iliolumbale. In fünf Präparaten kann in Bandmitte eine positive Markierung nachgewiesen werden. Die Färbung ist allgemein fleckig und erstreckt sich in seltenen Fällen auch über ganze Abschnitte des Bandes. Wie bei Kollagen II variiert das Ausmass der positiven Markierung im Enthesisbereich zwischen den verschiedenen Individuen.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	+	-	+
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	-	(+)
4	(+)	-	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	-	(+)
7	+	(+)	+
8	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	+
11	(+)	-	(+)

Tabelle 15 Aggrecan:

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

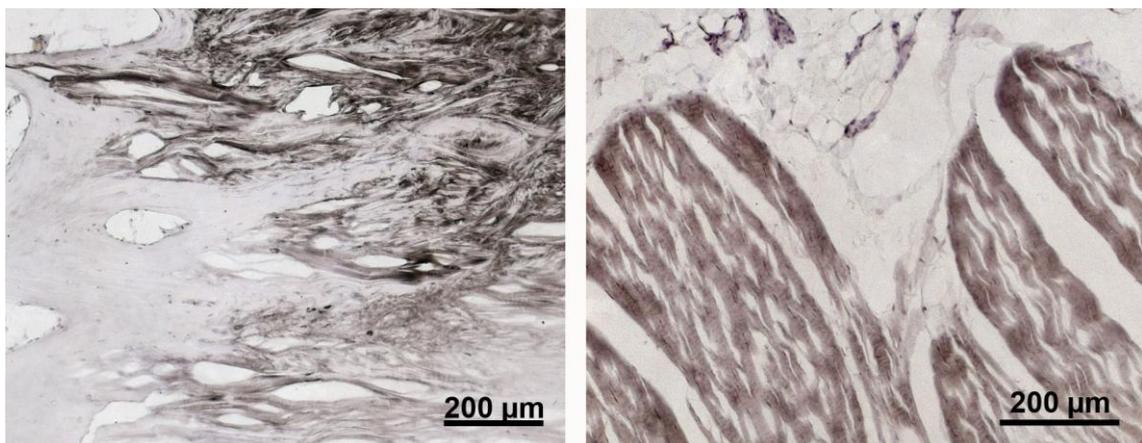


Bild 18: links: Aggrecan Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium

rechts: Aggrecan Nachweis im Band

3.5.3 Link Protein (8A4)

Link Protein kann im Bereich aller Anheftungszonen des Lig. iliolumbale nachgewiesen werden. In der Bandmitte finden sich bei acht Individuen positive Markierungen für Link Protein. Die Färbung ist dabei in allen Fällen fleckig und meistens auf einzelne unterschiedlich grosse Bezirke des Bandes bzw. der Enthesis beschränkt.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	-	(+)
4	(+)	-	(+)
5	(+)	-	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)

Tabelle 16, Link Protein:

(+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis

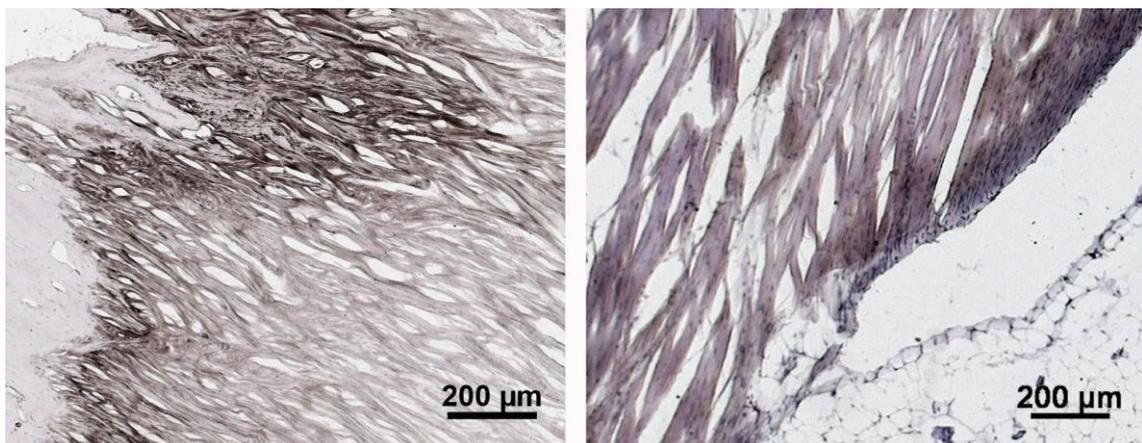


Bild 19: links: Link Protein Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium

rechts: Link Protein Nachweis im Band

3.5.4 Fibromodulin (630 D1)

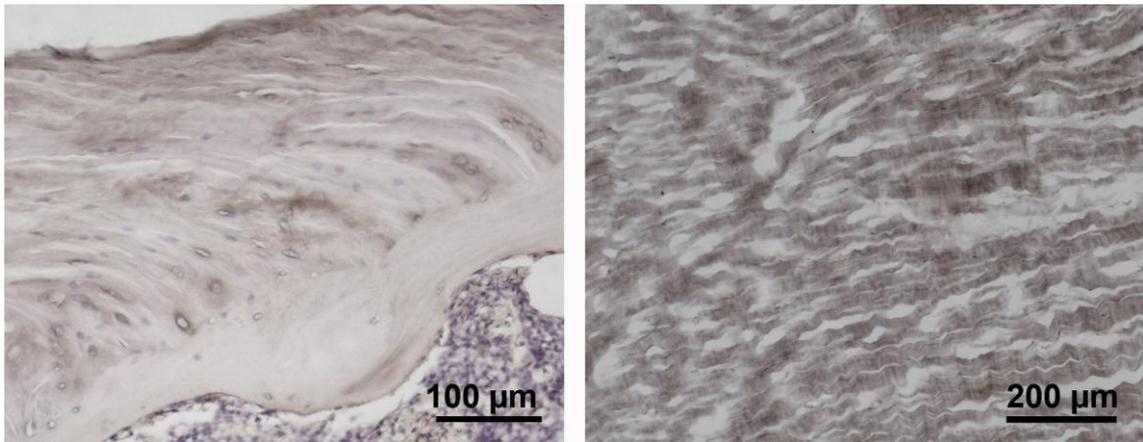
Die immunhistochemische Markierung mit 630D1 zeigt eine positive Reaktion in allen Bändern. An beiden Anheftungsstellen wird sie in den meisten Fällen fleckig und in zwei Proben ist kein positiver Nachweis mehr möglich.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	Z	(+)	+
2	-	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	+g
8	(+)	(+)	+g
9	(+)	(+)	+
10	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)

Tabelle 17. Fibromodulin :

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert, - = kein Nachweis,

Z = Nachweis positiv markierter Zellen, g = Rückgang der Färbung



*Bild 20: links: Fibromodulin Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
rechts: Fibromodulin Nachweis im Band*

3.6 Matrixproteine

3.6.1 Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)

Das cartilage oligomeric matrix protein (COMP) lässt sich in allen Präparaten, sowohl im Band, als auch an beiden Anheftungsstellen nachweisen. Im Bereich der Enthesis zeigt sich häufig eine Abnahme der Markierung die von einer eher homogenen in eine fleckige Verteilung übergeht. In einem Präparat lässt sich an der Enthesis des Os ilium ein kompletter Ausfall der Markierung beobachten.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	(+)	+	+
2	+	+	(+)
3	+	+	(+)
4	(+)	+	(+)
5	+	+	(+)
6	(+)	+	(+)
7	(+)	+	(+)
8	(+)	+	+g
9	+	+	+
10	(+)	+	(+)
11	(+)	+	(+)

Tabelle 18. COMP :

+ = positiver Nachweis, (+) = fleckig markiert,
 - = kein Nachweis, g = Rückgang der Färbung

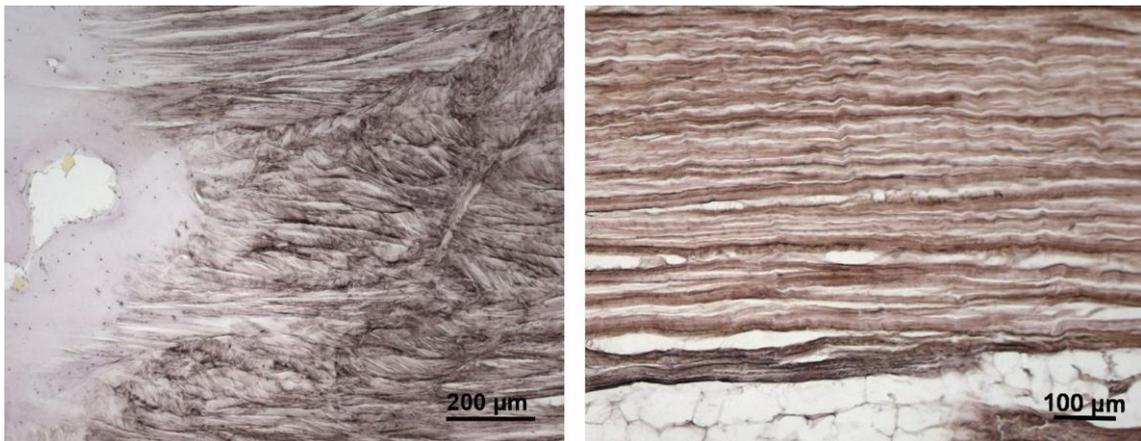


Bild 21: links: COMP Nachweis im Enthesisbereich eines Os ilium
 rechts: COMP Nachweis im Band

3.7 Neurofilamente

3.7.1 Neurofilamente (RT 97)

In 5 Präparaten können im Fettgewebe innerhalb der Proben eingebettete nervale Strukturen durch den Neurofilament markierenden Antikörper RT 97 nachgewiesen werden.

Präparat Nr.	Enthesis: Processus transversus L5	Bandmitte	Enthesis: Os ilium
1	-	+	-
2	-	+	-
3	-	+	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	+	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	+	-

Tabelle 19. RT-97 :

+ = positiver Nachweis, - = kein Nachweis

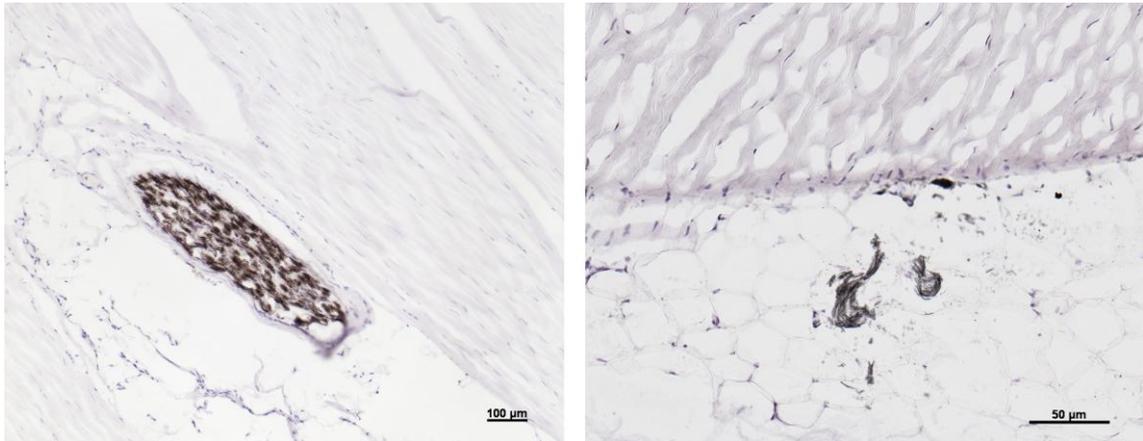


Bild 22: links und rechts: RT-97 markierte nervale Strukturen im Fettgewebe

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Entnahme und Methanolfixierung

Eine frühe Entnahme mit geeigneter anschließender Fixierung der Präparate ist essentiell für den Erhalt der Antigenstrukturen in der Immunhistochemie. Um eine Zerstörung der Feinstruktur durch autolytische Prozesse zu verhindern wurden alle Proben der vorliegenden Untersuchung innerhalb von 72 Stunden post mortem entnommen und in Methanol fixiert. Die Fixierung mit Methanol wird der Standardfixierung mit Formalin vorgezogen, da Formalin zu einer Verdeckung der Antigenstrukturen durch Vernetzung von Aminosäuren (Namimatsu et al. 2005) führt. Außerdem wird die Aktivität der endogenen Peroxidase schon durch das Methanol während der Fixierung herabgesetzt und somit unspezifische Hintergrundmarkierungen besser vermieden. Gleichzeitig wird das Gewebe durch die Fixierung mit Methanol vor Verwesung geschützt und Proteine in den Präparaten durch Denaturierung fixiert.

4.1.2 Feinpräparation und Kryomikrotomie

Aufgrund der Komplexität und Variabilität des Verlaufs des Lig. iliolumbale wurde bei der Feinpräparation großes Augenmerk darauf gelegt die Hauptmasse des Lig. iliolumbale mit der zugehörigen Enthese darzustellen. Um schließlich die richtige Schnittebene sicherzustellen wurden Toluidinblaufärbungen und Kryoschnitte aus den Präparatbereichen mit der ausgeprägtesten Metachromasie untersucht. Einige Präparate waren zu groß um geeignete durchgehende Schnitte zu erzielen. Diese Präparate wurden nach der Identifikation der relevanten Strukturen in der Mitte des Bandes getrennt und einzeln weiterverarbeitet. Durch genaue topographische Zuordnung wurde bei diesen Präparaten sichergestellt, dass die korrespondierenden Schnittebenen der Proben untersucht wurden.

Bei der Kryomikrotomie wurde eine Schnittdicke von 12 µm gewählt. Dadurch wurde eine gute immunhistochemische Markierbarkeit und Beurteilbarkeit bei zufriedenstellender Qualität der Schnitte erreicht.

4.1.3 Immunhistochemie

Bei der vorliegenden Studie wird zum Nachweis der ECM Bestandteile die immunhistochemische Markierung eingesetzt. Diese beruht im Wesentlichen auf der besonderen Affinität zwischen Antikörper und Antigen, wodurch ein Erkennen von Makromolekülen durch Bindung von entsprechenden Antikörpern an Epitope dieser Moleküle erreicht wird. Diese Antigen-Antikörper-Bindung beruht auf einem komplexen dreidimensionalen Schlüssel-Schloss-Prinzip und wird durch eine Mischung aus Anziehungskräften auf Ionenbasis, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen (Kiernan 1999) stabilisiert.

Entsprechend ihrer Produktion und Herkunft unterscheidet man monoklonale von polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper sind das Produkt eines einzelnen Plasmazellklons und dadurch nur gegen ein einziges Epitop des Antigens gerichtet. Ihre Spezifität liegt dadurch in der Regel höher als die von polyklonalen Antikörpern, die an verschiedene Epitope eines Antigens binden können.

In der vorliegenden Studie wurden vorwiegend monoklonale Antikörper verwendet. Nur bei den Antikörpern gegen Kollagen XII und Kollagen XIV handelt es sich um polyklonale Antikörper. Kreuzreaktionen mit anderen Molekülen können jedoch auch bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern auftreten. Eine genaue Charakterisierung der Antikörper hilft die Spezifität der Nachweismethode zu bewerten. Bei den meisten der verwendeten Antikörper konnte eine solche Charakterisierung als Referenz angegeben werden.

Die hohe Spezifität des Nachweissystems erlaubt die Markierung der entsprechenden Antigene durch den Primärantikörper. In den folgenden Schritten der immunhistochemischen Färbung kommt es zu einer Amplifizierung des Signals, welche zu einer lichtmikroskopisch auswertbaren Chromogenumsetzung führt. Die Stärke der Färbung lässt durch die nicht stöchiometrische Verstärkung des Signals allerdings keine Rückschlüsse auf die Quantität der Antigenexpression zu.

Die gewählte ABC-Peroxidase-Methode soll nach Kiernan (1999) die besten Ergebnisse bei Geweben des Bewegungsapparates liefern und wurde deshalb in der vorliegenden Studie verwendet.

4.2 Interpretation der Befunde

4.2.1 Kollagene

Kollagene machen mit 30% den grössten Anteil der Proteine in Säugetieren aus (Burgeson et al. 1992). Sie kommen in verschiedenen Geweben vor, in denen sie hauptsächlich eine strukturgebende Funktion übernehmen. Kollagene sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut, die zwei verschiedenartige Domänen erkennen lassen: eine Trippelhelixdomäne und eine globuläre Domäne (Burgeson et al. 1992). Die Trippelhelixdomäne besteht aus drei umeinander gewundenen α -Ketten und gibt den Kollagenen eine biegefesten Region (Olsen et al. 1999).

Kollagen I ist das am häufigsten vorkommende Kollagen (über 90% am Kollagensgesamtanteil) und wurde in Haut, Sehnen, Bändern, Knochen und der Cornea gefunden. In Sehnen und Bändern stellt es den Bestandteil dar, welcher hauptsächlich für die Zugfestigkeit verantwortlich ist (Benjamin et al. 1997; Franchi et al. 2007). Der hohe Ordnungsgrad und die axiale Anordnung der Kollagen I-Fibrillen tragen zu der hohen Zugfestigkeit dieser Gewebe bei (Kielty et al. 1993; Sodersten et al. 2005)

In unserer Studie zeigen alle Bänder eine Kollagen I-Markierung. An faserknorpeligen Enthesiszonen konnte ein Bereich ohne Färbung beobachtet werden. Dies wird allgemein als gap-Phänomen bezeichnet und ist ein Zeichen dafür, dass die Expression von Kollagen I der von Kollagen II weicht (Benjamin et al. 2006).

Kollagen II wurde zuerst in Knorpel nachgewiesen, in dem es neben den gewebespezifischen Proteoglykanen den Hauptteil des Gewebes ausmacht (Heinegard et al. 1993). Aber auch andere Gewebe, wie der Nucleus Pulposus, der Glaskörper und Faserknorpel, zeigen eine Kollagen II-Expression (Burgeson et al. 1992). Kollagen II findet sich unter anderem an den Stellen in Sehnen, die neben Zug auch Druckkräften ausgesetzt sind (Waggett et al. 1998). Es ist damit ein wesentliches und typisches Merkmal faserknorpeliger Enthesiszonen bei einer Vielzahl von Sehnen und Bändern (Milz et al. 2005).

Beide Anheftungszonen des Lig. iliolumbale zeigen Kollagen-II-positive Bereiche, wobei deren jeweilige Ausdehnung deutliche Unterschiede aufweist. Obwohl keine quantitative Bestimmung der positiv markierten Fläche durchgeführt wurde, lässt sich beobachten, dass die Schnitte an der beckenseitigen Enthese tendenziell eine ausgedehntere Markierung zeigen (vgl. Bild 7).

Bei vier Präparaten finden sich auch in der sonst negativen Bandmitte weitere Stellen mit einer positiven Markierung. Solche Kollagen II-Markierungen wurden bereits in früheren Studien in den Bandabschnitten gefunden, die einer lokalen Druckbeanspruchung ausgesetzt sind. Dies ist unter anderem der Fall in Abschnitten des Lig. transversum acetabuli, welche in Kontakt mit dem Femurkopf stehen (Milz et al. 2001b), oder beim Lig. transversum atlantis im Bereich des Dens axis (Milz et al. 2001a). Generell gilt als belegt, dass im Bereich von Gleitsehnen, also dort, wo die Sehne um knöcherne Strukturen gelenkt wird, Kollagen II nachgewiesen wird (Benjamin et al. 1995).

Kollagen III gehört ebenso wie Kollagen I und II zu den fibrillären Kollagenen und kommt vermehrt in Geweben mit höherer Elastizitätsanforderung vor (Olsen et al. 1999). Es macht den zweitgrössten Anteil an Kollagen in diesem Gewebe aus (Eyre et al. 2006). Dabei bildet es mit Kollagen Typ I Mischfasern und soll den Durchmesser der Kollagen I-Fibrillen beeinflussen (Waggett et al. 1998).

In unserer Studie weisen alle Bänder eine Kollagen III-Markierung auf. Dies ist funktionell von Bedeutung, da bei einer Anspannung der Ligg. iliolumbalia, wie sie z.B. für eine Flexion von L5 gegenüber dem Becken beschrieben wird (Snijders et al. 2008), die elastischen Eigenschaften dieser Bänder helfen Stresskonzentrationen zu vermeiden. Im Bereich besonders faserknorpeliger Enthesezonen, zeigt sich in einigen Proben eine Auflockerung der Markierung, in zwei Fällen eine komplette Aufhebung der Färbung für Kollagen III. In diesen Bereichen ist eine deutliche Ausprägung der Kollagen II-Markierung zu beobachten. Analog zu der Kollagen I-Markierung könnte hier Kollagen III der Expression anderer ECM Molekülen, wie z.B. der von Kollagen II weichen. Dies ist eine Beobachtung, die in der Literatur für andere Faserknorpel bisher nicht

beschrieben wurde. Zudem wird Kollagen III im adulten Gelenkknorpel zusammen mit Kollagen II koexprimiert und kovalent verknüpft (Eyre 2002).

Kollagen VI bildet perlschnurartige Mikrofibrillen und soll an der Bindung von Zellen an ECM-Molekülen beteiligt sein (Waggett et al. 1998). Eine „korbflechtartige“, perizelluläre Verteilung, wie man sie auch bei hyalinem Knorpel findet, ist charakteristisch für Kollagen VI in Faserknorpeln. In der Bandmitte dagegen findet man üblicherweise die für faseriges Bindegewebe charakteristische, longitudinal angeordnete durchgehende Färbung der ECM (Milz et al. 2005b; Waggett et al. 1998).

In der vorliegenden Studie ist die Markierung für Kollagen VI in allen Ligg. iliolumbalia und ihren Anheftungszone positiv. Im Bereich der Enthese weist die Markierung einen fleckigen Charakter auf und zeigt in einigen Fällen das Bild einer „korbflechtartigen“ Färbung.

Kollagen X wird aufgrund seiner kürzeren Kettenlänge zu den Kurzkettenkollagenen gezählt. Bei der enchondralen Ossifikation der Skelettreifung wird Kollagen X von hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Hjorten et al. 2007). Es wird vermutet, dass Kollagen X um die Chondrozyten der Wachstumsfugen eine Art Schutzgerüst bildet, wenn die ECM der Knorpelzellen bei der enchondralen Ossifikation abgebaut wird (Olsen et al. 1999). Tierexperimentell konnte an Patellarsehnen gezeigt werden, dass Sehngewebe auf eine Kollagenase induzierte Schädigung mit der Expression von Kollagen X und ektope Kalzifizierung innerhalb des Sehngewebes reagieren kann (Lui et al. 2009). In diesem Zusammenhang gewinnt die Betrachtung des Faserknorpels als kleine Wachstumsplatte, bei der Faserknorpel zu Knochen umgebaut wird, neue Bedeutung (Benjamin et al. 2006).

In sieben Präparaten konnte Kollagen X in beiden Enthese-Regionen und in der Bandmitte, in jeweils einem Fall nur an einer Enthese oder in Bandmitte und bei einem Individuum in keinem Bereich nachgewiesen werden. Interessant ist, dass in einer Probe eine massive Markierung am bandseitigen Ende der Enthese des Processus transversus zu finden war. Gleichzeitig zeigt sich in diesem Präparat eine Ansammlung knorpeltypischer Zellen, die in eine amorphe Substanz entlang von Fissuren an der Enthese eingebettet sind. Ähnliche Beschreibungen wurden in der Literatur als Zeichen degenerativer Veränderungen der Enthese gegeben (Benjamin et al. 1998). Folgt man

weiterhin der Theorie, dass degenerative Veränderungen in Sehnen durch ein Missverhältnis von Matrixaufbau und deren Degradation unter mechanischer Beanspruchung auftreten (Riley et al. 2001), könnten unsere Beobachtungen das Bild einer solchen Überbeanspruchung einer Enthese darstellen. Wie bereits oben beschrieben, konnte tierexperimentell eine Mineralisierung in Sehnengewebe nach einer iatrogenen Verletzung der Sehne beobachtet werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das Präparat in einer anderen Schnittebene keine solchen Veränderungen zeigt, wohl aber eine breitere Knochenstruktur des Processus transversus. Ob es sich bei der Beobachtung um das Bild verschiedener Stadien eines Mineralisierungsprozesses handelt, lässt sich allerdings nicht feststellen, da aus der räumlichen Korrelation keine zeitliche Entwicklung abgeleitet werden kann. Allerdings legt der Vergleich mit der epiphysären Wachstumszone eine solche Interpretation nahe.

Kollagen XII und XIV gehören zu den fibrillenassoziierten Kollagenen, welche als Brückenmoleküle, in Faszikeln zwischen den fibrillären Kollagenen angeordnet, fungieren (Akutsu et al. 1999). Kollagen XII kommt in Knorpel (Eyre et al. 2006) Bändern, Sehnen, Perichondrium und Periost vor. Eine vermehrte Expression von Kollagen XII wird in Knorpel in Bereichen mit einer starken Orientierung der Kollagenfibrillen beobachtet und scheint eine Bedeutung für die Anordnung dieser Fibrillen zu haben (Gregory 2005). Auf Bänder übertragen, müssten faserknorpelige Regionen dann eine schwächere Kollagen XII-Markierung zeigen als solche, die rein faserige Strukturen mit einer ausgeprägteren Orientierung der Kollagenfibrillen aufweisen.

In der vorliegenden Studie wird in allen Präparaten Kollagen XII, sowohl in beiden Ansatzzonen, wie auch durchgehend im Band, nachgewiesen. Im Bereich der Enthese zeigt sich eine Auflockerung der Markierung.

4.2.2 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) bestehen im Wesentlichen aus Disaccharidketten. Die Disaccharideinheiten enthalten dabei zum einen einen Aminosucker (D-Glukosamin oder Galaktosamin) und zum anderen typischerweise eine Uronsäure (D-Glukuronsäure

oder ihr C5-Epimer, die L-Iduronsäure) oder Galaktose (Jackson et al. 1991). Durch sporadische, enzymatische Modifikation, wie z.B. Sulfatierung oder Acetylierung der einzelnen Zucker entsteht eine Vielzahl verschiedener GAG. Keratansulfat besteht aus Disacchariden der Galaktose und Glukosamin, welche an Position 6 sulfatiert sein können. Chondroitinsulfate enthalten in den Grundpolymeren Galaktosamin und Glukuronsäure. Eine Sulfatierung an Position 6 des Aminozuckers führt zu der Bezeichnung Chondroitin-6, eine an der Stelle 4 zu Chondroitin-4-sulfat. Weiterhin kann bei einigen Disacchariden der Chondroitinsulfate Glukuronsäure gegen Iduronsäure ausgetauscht sein (Lander 1999). Tritt diese Modifikation bei mehr als 10% des Uronats auf, spricht man von Dermatansulfat.

Das Enzym Chondroitinase ABC kann im Gegensatz zur Chondroitinase AC auch die Verbindung von Iduronsäure und Galaktosamin spalten, woraufhin durch eine anschließende Inkubation mit dem Antikörper 2B6 sowohl Dermatansulfat als auch Chondroitin-4-sulfat erkannt werden. Nach einer Vorbehandlung mit Chondroitinase AC wird jedoch nur Chondroitin-4-sulfat nachgewiesen.

Durch die enzymatischen Modifikationen ändern sich auch die Eigenschaften der GAG. Negativ geladene Carboxylat- oder Sulfatgruppen führen zu einer hohen negativen Ladungsdichte, die über Kationenbindung einen erhöhten osmotischen Druck erzeugt und somit zur Bindung von Wasser im Gewebe führt (Alberts et al. 2002). Dieser Mechanismus erklärt die besondere Druckresistenz von Gewebe mit hohem Gehalt an glykosaminoglykanreichen Proteoglykanen.

Entsprechend der Höhe einer solchen lokalen Druckbeanspruchung werden im Bereich einer faserknorpeligen Enthesis verschiedene ECM-Moleküle exprimiert. Dermatansulfat gefolgt von Keratansulfat wird schon in Gewebe mit relativ schwacher Druckbeanspruchung beobachtet. Steigende Kompression führt zur Expression von Chondroitin-4-sulfat und schliesslich von Chondroitin-6-sulfat (Benjamin et al. 2006; Milz et al. 2005).

In der vorliegenden Studie weist der immunhistochemische Nachweis von Chondroitin-4-sulfat ein uneinheitliches Markierungsmuster auf. Die Markierung ist zwar in allen Ligg. iliolumbalia in der Bandmitte positiv, die Enthesiszonen (Os ilium und Processus transversus) sind aber nur stark fleckig gefärbt oder zeigen gar keine Markierung. Bei 7

Proben lässt sich an der Anheftungsstelle des Bandes an dem Processus transversus von L5, bei 3 Proben an der Anheftungsstelle des Bandes am Beckenkamm kein Nachweis von Chondroitin-4-sulfat erbringen. Auch nach der Vorbehandlung mit Chondroitinase ABC, also der Markierung von Dermatan- und Chondroitin-4-sulfat, kann eine fleckige bis aufgehobene Markierung des Antikörpers 2B6 bei einzelnen Anheftungsstellen des Lig. iliolumbale nachgewiesen werden, wohingegen die mittleren Bandpartien auch hier in allen Proben eine positive Markierung zeigen. Chondroitin-4-sulfat wird schon bei geringerer lokaler Kompression als Chondroitin-6-sulfat exprimiert (Milz et al. 2005). Der fehlende Nachweis von Chondroitin-4-sulfat in einigen Enthesiszonen scheint also anzudeuten, dass hier nur eine sehr geringe Kompression auftritt. Da häufiger der Ansatz des Lig. iliolumbale am Processus transversus betroffen ist, als der am Os ilium, könnte dies auf Unterschiede in der Belastung der beiden Enthesisregionen hindeuten. Gegen diese Interpretation spricht aber der Nachweis von Kollagen II und Aggrecan sowie Chondroitin-6-sulfat, der in Faserknorpeln bisher untersuchter Bänder und Sehnen mit dem Auftreten höherer lokaler Druckbeanspruchungen assoziiert wurde (Milz et al. 2005). Bisher konnte Chondroitin-4-sulfat in faserknorpeligen Ansatzzonen vieler anderer humaner Bänder nachgewiesen werden (Milz et al. 2005). Dies schließt jedoch das erstmalige Auftreten eines bisher nicht erklärbaren Ausfalls der Markierung nicht aus. Es ist anzumerken, dass auch biochemische Faktoren eine Rolle spielen könnten. So wurde beobachtet, dass Chondroitin-6-sulfat leichter selbst aggregieren kann als Chondroitin-4-sulfat und dass sich das Verhältnis zwischen Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat in vitro zu Gunsten von Chondroitin-6-sulfat in druckbelasteten fetalen bovinen Sehnen verändert (Evanko et al. 1993).

Um einen systematischen Fehler bei der Nachweismethode auszuschließen wurde eine Kontrollfärbung mit dem Antikörper 2B6 nach Vorbehandlung mit Chondroitinase ABC nach dem in der vorliegenden Studie benutzten Färbeprotokoll an einem Präparat einer humanen Patellarsehne durchgeführt. Hier zeigte sich die bereits in der Literatur beschriebene Markierung der ganzen Enthesis.

Chondroitin-6-sulfat kann an den meisten Anheftungsstellen und in 7 von 11 mittleren Bandabschnitten nachgewiesen werden. Dies spricht wiederum für eine lokale Druckbeanspruchung dieser Bandpartien und unterstreicht den faserknorpeligen

Phänotyp des Gewebes. Die positiven Markierungen im Band finden sich in den Bereichen, welche auch häufig positiv für Kollagen II sind.

Keratansulfat wird in der vorliegenden Studie in fast allen Präparaten in allen Bereichen gefunden. Dies ist nicht überraschend, da Keratansulfat sowohl in Proteoglykanen des zugbeanspruchten Bindegewebes (z.B. Fibromodulin), wie auch in knorpeltypischen Proteoglykanen (z.B. Aggrecan) vorkommt (Milz et al. 2005).

4.2.3 Proteoglykane

Proteoglykane (PG) bestehen aus einem Kernprotein, an welches kovalent Glykosaminoglykane gebunden sind (Jackson et al. 1991). Die Länge des Kernproteins, wie auch die Menge und Länge der gebundenen Glykosaminoglykane (GAG) sind variabel, wodurch die unterschiedlichen biochemischen und biomechanischen Eigenschaften der Proteoglykane mitbegründet sind. Aggrecan ist ein grosses PG, welches über Link Protein an Hyaluronsäure gebunden ist und charakteristischerweise in Knorpelgewebe vorkommt. Es weist eine an Chondroitinsulfat-reiche Domäne mit hoher Ladungsdichte auf, die die Wasserbindung in Knorpelgewebe begünstigt (Heinegard et al. 1993; Watanabe et al. 1995). Vor allem in Verbindung mit Kollagen II, aber auch mit Kollagen I bildet Aggrecan druckresistente hydratisierte Komplexe (Hedlund et al. 1999). In der Enthese wird lokale Kompression mit der Expression von Aggrecan in Verbindung gebracht (Benjamin et al. 1998; Evanko et al. 1993). Es wird vermutet, dass Faserknorpelzellen auf eine solche mechanische Situation mit einer Aggrecanexpression reagieren, noch bevor die Bildung von Kollagen II einsetzt (Milz et al. 2005b). Aggrecan in adultem Knorpel besteht zu 95 % aus Chondroitin-6-sulfat (Lauder et al. 2001), so dass häufig der Nachweis von Chondroitin-6-sulfat mit dem von Aggrecan korreliert.

In unseren Proben kann in allen Fällen Aggrecan an den Anheftungsstellen der Ligg. iliolumbalia nachgewiesen werden. Auch in verschiedenen mittleren Bandpartien ist die Markierung für Aggrecan positiv. Analog zur Verteilung von Kollagen II deutet dieses Verteilungsmuster ebenfalls auf eine lokale Druckbeanspruchung der untersuchten Bandabschnitte hin.

Versican ist ein weiteres PG, welches auch über Link Protein an Hyaluronsäure gebunden wird. Im Gegensatz zu Aggrecan weist es Dermatansulfatketten auf. (Heinegard et al. 1993). Versican besitzt weniger Chondroitinsulfatbindungsstellen und eine geringere Ladungsdichte als Aggrecan und ist das charakteristische Proteoglykan des zugbeanspruchten faserreichen Bindegewebes (Milz et al. 2005a).

In der vorliegenden Studie wird Versican in allen Ligg. iliolumbalia und in den meisten Fällen an deren Anheftungsstellen nachgewiesen. Nur an einer Enthese eines Processus transversus ist keine Markierung für Versican vorhanden. Allerdings zeigt die Färbung bei allen Proben einen deutlich fleckigen Charakter.

Fibromodulin gehört zu der Klasse der kleinen PG. Es weist keine Chondroitinsulfat- und Dermatansulfatketten aber Keratansulfatketten auf (Heinegard et al. 1993). Im Gegensatz zu Aggrecan und Versican kann es fibrillenformende Kollagene binden (Heinegard et al. 1993) und spielt eine Rolle der Fibrillengese von Kollagen I und Kollagen II (Viola et al. 2007). Durch Oberflächeninteraktion mit den Kollagenfibrillen soll es ferner zu der Belastbarkeit und Elastizität von Sehnen beitragen (Ezura et al. 2000).

Der Nachweis von Fibromodulin gelingt in allen mittleren Bandpartien unserer Präparate. An den Anheftungsstellen wird ein Rückgang der Markierung beobachtet. An drei Anheftungsstellen kann gar keine Markierung nachgewiesen werden. Dieses Phänomen kann ähnlich dem Rückgang von Kollagen I und III als ein Weichen von Fibromodulin gegenüber anderen ECM Komponenten interpretiert werden.

Link Protein stabilisiert die Interaktion von Aggrecan und Versican mit Hyaluronsäure. Link Protein kann in allen Anheftungszonen und in 8 der 11 Proben in Bandmitte nachgewiesen werden. In allen Fällen einer positiven Markierung für Link Protein kann auch entweder Versican oder Aggrecan nachgewiesen werden.

4.2.4 Matrixproteine

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), auch als Thrombospondin 5 bekannt, ist ein ECM- Molekül, welches ursprünglich in Knorpel gefunden wurde (Newton et al. 1994). Darüber hinaus wurde es in Bändern, Sehnen, Meniskus- und Synovialgewebe

nachgewiesen (Jordan 2004). Es besteht aus fünf identischen Untereinheiten, die jeweils über eine carboxyterminale globuläre Domaine an Kollagen I, II und IX binden können (Jordan 2004; Sodersten et al. 2005). Es wird vermutet, dass COMP dadurch bei der Organisation der Kollagenfibrillen insbesondere bei Reparaturprozessen beteiligt ist (Farina et al. 2006; Jordan 2004).

COMP färbt in unseren Präparaten sowohl Band, wie auch Enthesiszonen. Eine verstärkte Markierung in der „gap Zone“, wie es Sodersten et al. in Sehnen von Pferden beobachtet hatten (Sodersten et al. 2005), war in unserer Studie nicht zu finden. Stattdessen findet sich bei einigen Präparaten mit ausgeprägten Faserknorpeln eine abgeschwächte bis aufgehobene Markierung.

4.2.5 Fettgewebe

Das Vorkommen von Fettgewebe in Bändern und Sehnen wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben und im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung diskutiert (Benjamin et al. 2006, Milz et al. 2008). Obwohl es häufig in Verbindung mit degenerativen Veränderungen beobachtet wurde (Kannus et al. 1997), stellen Benjamin et al. (2004) fest, dass das Auftreten von Fett in Sehnen und Bändern nicht immer ein pathologisches Zeichen sein muss. An Strukturen mit weit ausfächernden Anheftungsstellen soll Fett zum Beispiel als Füllsubstanz zwischen den Kollagenfaserbündeln dienen. Auch an schräg einstrahlenden Anheftungsstellen kann Fett dazu dienen, den Platz zwischen Knochen und Band bzw. Sehne zu füllen und dadurch eine gewisse Verschiebbarkeit des Gewebes zu ermöglichen. Weiterhin konnten Benjamin et al. (2004) Nerven und Blutgefäße in solchen Fettansammlungen nachweisen und postulierten, dass Fettgewebe auch an der Unterstützung der propriozeptiven Funktionen beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie wurde Fett sowohl innerhalb des Bandes, als auch zwischen Knochen und Enthesis am Os ilium gefunden. Dieses spezielle und topographisch genau definierte Vorkommen wäre funktionell mit den zuvor umrissenen physiologischen Aufgaben erklärbar.

4.2.6 Neurofilamente

Der Nachweis von nervalen Strukturen im Lig. iliolumbale ist in guter Übereinstimmung mit aktuellen Berichten in der Literatur (Kiter 2010) und untermauert die Annahme, dass Bänder und ihr Fettgewebe im mechanosensorischen Regelkreis involviert sind. Kiter et al (2010) konnten zudem freie Nervenendigungen im Band nachweisen. Dadurch wird die bereits früher aufgestellte Vermutung gestützt (Sims et al. 1996), dass das Lig. iliolumbale ein stark sensibel innerviertes Band ist, in dessen Schädigung eine Ursache von chronischen Rückenschmerzen liegen könnte.

4.3 Funktionelle Wertigkeit der Befunde

Die molekulare Zusammensetzung der ECM des Lig. iliolumbale lässt die für andere Bänder des menschlichen Körpers bereits beschriebene regional unterschiedliche Verteilung erkennen. In Bandmitte finden sich bevorzugt die ECM-Moleküle, welche für das faserreiche straffe Bindegewebe charakteristisch sind. An erster Stelle sind in diesem Zusammenhang Kollagen I, III, und kleine Proteoglykane (z.B. Versican und Fibromodulin) zu nennen.

Das Vorkommen von faserknorpeltypischen Molekülen ist charakteristisch für beide Anheftungsstellen des Lig. iliolumbale. Sowohl am Os ilium, wie auch am Proc. transversus des fünften Lendenwirbelkörpers finden sich die typischen Merkmale einer faserknorpeligen Enthesis. Zu den hier auftretenden charakteristischen Matrixbestandteilen zählen insbesondere Kollagen II, Aggrecan, Link Protein, Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat. Zwischen den einzelnen Individuen variiert die Ausdehnung dabei deutlich.

In der Literatur wird die Ausprägung eines bestimmten Gewebephänotyps im Bereich der Sehnen- und Bandansätze als Ausdruck der Anpassung an die vorherrschende mechanische Beanspruchung gesehen (Milz et al. 2005b). Die molekulare Zusammensetzung der ECM hängt demnach sowohl von der Grösse der übertragenen Zugkräfte, dem Insertionswinkel des Bandes, sowie der Änderung des Insertionswinkels während des Bewegungsablaufes ab. Die zuvor genannten Faktoren bestimmen dabei die lokalen Druckkräfte, welche im Gewebe auf zellulärer Ebene einwirken und beeinflussen so die funktionelle Anpassung des Bindegewebes auf molekularer Ebene. Milz et al. (Milz et al. 2005b) konnten weiterhin zeigen, dass es in Abhängigkeit von der lokalen Zug- und Druckbelastung eine Reihenfolge des Auftretens der einzelnen ECM-Bestandteile gibt. Im Falle des Lig. iliolumbale stellt das im Bereich beider Anheftungsstellen nachgewiesene Vorkommen von Kollagen II, Link Protein, Aggrecan und Chondroitin-6-sulfat ein klares Zeichen für eine Anpassung des Bandes an eine Kombination aus Zugbeanspruchung und lokaler Druckbeanspruchung dar. Zu einer lokalen Druckbeanspruchung an der Anheftungsstelle eines Bands kann es durch schräges Einstrahlen der Bandfasern in den Knochen mit einer bei Zugbeanspruchung unweigerlich hinzutretenden Druckkomponente kommen (Milz et al. 2005b). Auch eine

während der Bewegung der Skelettelemente erfolgende Winkeländerung führt zu einer lokalen Kompressionsbeanspruchung der Anheftungszonen. Die Anpassung des Gewebstypus, d.h. die Faserknorpelbildung, führt zu einem lokal druckresistenten Gewebe, welches, ähnlich einer Kabeltülle an elektrischen Steckern, protektiv auf den Band-Knochen-Übergang wirkt und diesen so vor lokaler Überbeanspruchung schützt (Boszczyk et al. 2006).

Um unsere Interpretation der lokalen mechanischen Beanspruchung des Lig. iliolumbale im Gesamtzusammenhang des lumbosakralen Übergangs leichter darstellen zu können, haben wir die prinzipiellen Längen und Insertionswinkelveränderungen in Bild 23 bis 25 schematisch dargestellt. Anhand von Bild 23 wird verdeutlicht, dass das Lig. iliolumbale bei einer Rotation des Lendenwirbels gegenüber dem Becken auf der anderen Seite der Drehbewegung gedehnt wird. Aus der Skizze lässt sich bei einer Rotation auch eine Änderung des Insertionswinkels des Bandes sowohl am Proc. transversus als auch am Beckenkamm ableiten. Rotation im Iliosakralgelenk kann zu einer Positionsänderung des Wirbelkörpers L5 gegenüber dem Becken führen und wird beispielsweise für entspanntes Sitzen beschrieben (Snijders et al. 2004).

Neben der Rotation wird auch die Wirkung des Lig. iliolumbale bei der Flexion/Extension und der Seitwärtsneigung am lumbosakralen Übergang diskutiert. Bild 24 und 25 verdeutlichen, dass es bei einer Flexion und Extension der lumbalen Wirbelsäule ebenfalls zu einer Insertionswinkeländerung und Dehnung des Bandes kommt.

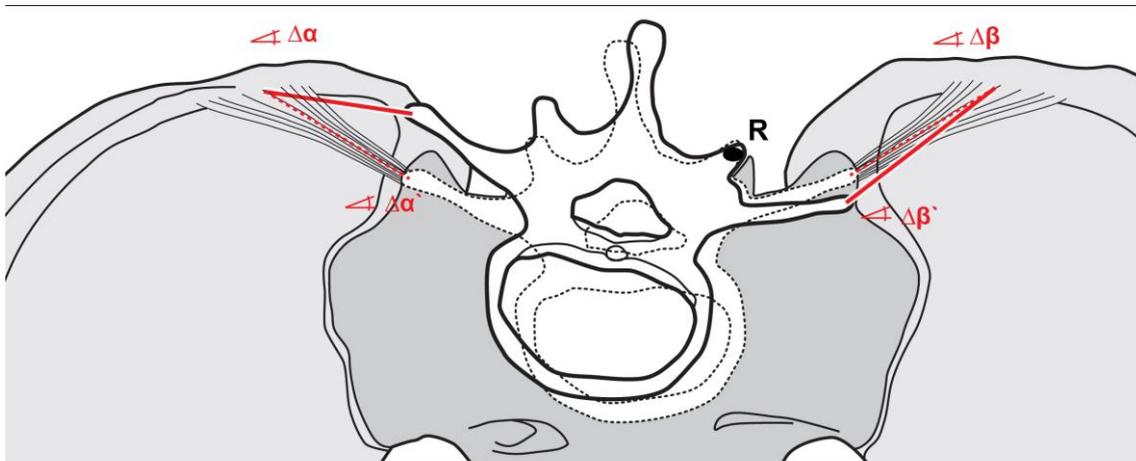


Bild 23: Insertionswinkeländerung ($\Delta\alpha$, $\Delta\alpha'$ und $\Delta\beta$, $\Delta\beta'$) bei Rotation des Lendenwirbels L5 gegenüber dem Sakrum. Der gepunktet gezeichnete Wirbel zeigt die Ausgangssituation (Normal-0-Stellung), der durchgezeichnete den ausgelenkten Wirbel. $\Delta\alpha$ und $\Delta\beta$ bezeichnen die Winkeländerungen an den Beckenkämmen und $\Delta\alpha'$ und $\Delta\beta'$ die an den Processus transversi. Die Skizze zeigt eine stärkere Auslenkung von L5 gegen S1, als unter physiologischen Bedingungen möglich. Dadurch lässt sich das Prinzip der geometrischen Veränderungen besser verdeutlichen. Bei der Rotation verschiebt sich das Rotationszentrum von der Mitte des Wirbelkörpers in Richtung R, wodurch eine unterschiedliche Anspannung des linken Lig. iliolumbale im Vergleich zum rechten Band und eine unterschiedliche Winkeländerung an den verschiedenen Insertionsstellen resultiert. Es lässt sich ausserdem erkennen, dass es zu einer unterschiedlichen Längenänderung beider Ligg. iliolumbalia kommen muss.

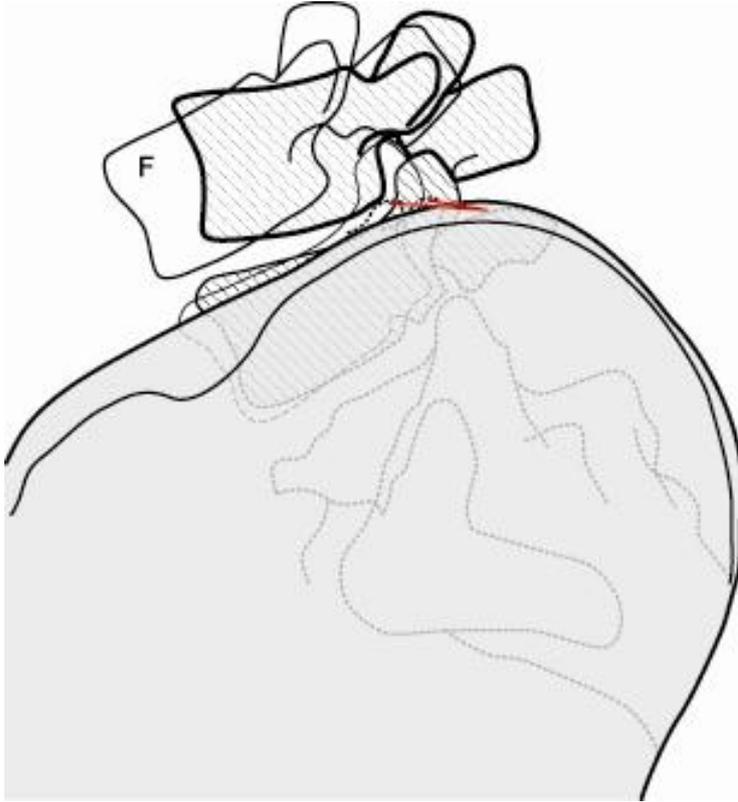


Bild 24: Flexion der unteren Lendenwirbelsäule (die Ausgangsstellung ist schraffiert dargestellt). Der Verlauf des Lig. Iliolumbale ist rot dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass bei Flexion eine Dehnung des Bandes, sowie eine Insertionswinkeländerung am Beckenkamm, wie auch am Processus transversus, erfolgt.

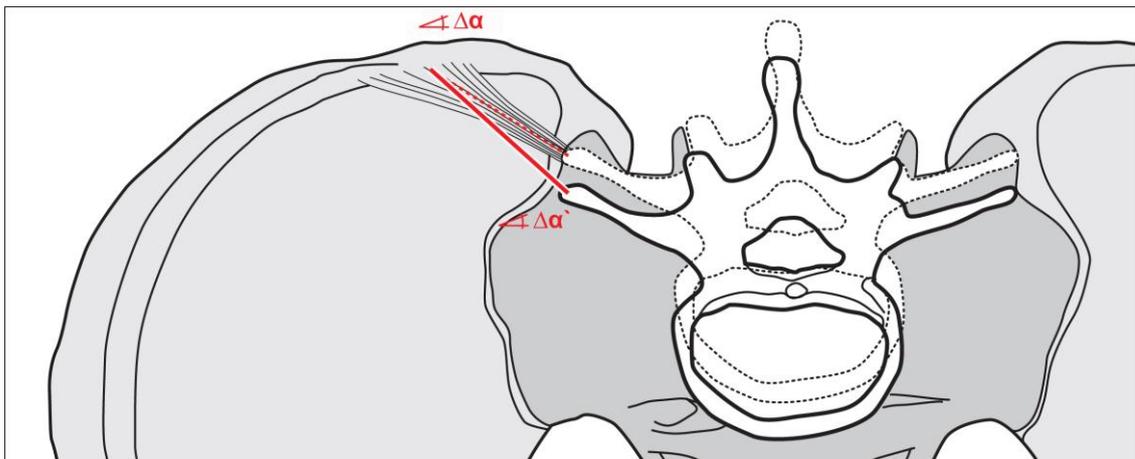


Bild 25: Insertionswinkeländerung ($\Delta\alpha$ $\Delta\alpha'$) bei einer Verkipfung des Lendenwirbels L5 gegenüber dem Beckenkamm, Darstellung in Aufsicht auf die Grund und Deckplatten der Wirbelkörper. Der gepunktet gezeichnete Wirbel zeigt die Ausgangssituation, der durchgezogene gezeichnete den verkippten Wirbel L5. Die Skizze zeigt eine stärkere Auslenkung von L5 gegen S1, als unter physiologischen Bedingungen möglich. Dadurch lassen sich die geometrischen Verhältnisse klarer verdeutlichen. $\Delta\alpha$ bezeichnet dabei die Winkeländerungen am Beckenkamm und $\Delta\alpha'$ am Processus transversus.

Bei der Seitneigung wird in der Literatur eine Anspannung des Lig. iliolumbale auf der konvexen Seite beschrieben, welche die Bewegung begrenzt (Kapandji 1985). Auch hier lässt sich analog der für Rotation und Flexion getroffenen Ausführungen eine Insertionswinkeländerung finden.

Aus all diesen Überlegungen ergibt sich, dass die mechanische Beanspruchung des Bandes bei der Stabilisierung des lumbosakralen Übergangs eine Anpassung an Dehnung und lokale Kompression an beiden Anheftungsstellen des Lig. iliolumbale erfordert. Die beobachteten Faserknorpel stellen mit ihrem Aufbau das morphologische und molekulare Korrelat dieser Anpassung an die Funktion dar.

Die unterschiedliche Ausprägung des Faserknorpels bei den einzelnen Donoren weist dabei auf individuelle Unterschiede im Ausmass dieser Beanspruchung hin. Im Gegensatz zu den an Leichen durchgeführten biomechanischen Experimenten, welche die natürliche Belastung des Bandes nur eingeschränkt untersuchen können, erlauben die vorliegenden Ergebnisse eine Aussage über die tatsächliche Beanspruchung, welche während der Lebzeiten der untersuchten Individuen vorlag. Auch wird der Einfluss

einer Fixierung oder anderer post mortem Veränderungen umgangen. Limitierend ist dabei allerdings, dass keine Aussage über die Höhe der einwirkenden mechanischen Beanspruchung gemacht werden kann.

Auch innerhalb des Bandes kann in einigen Präparaten der Nachweis von faserknorpeltypischen ECM-Molekülen erbracht werden. Das Auftreten von Faserknorpel innerhalb eines Bandes wird in der Literatur für diejenigen Stellen beschrieben, bei denen es zu lokaler Druckbeanspruchung kommt (Benjamin et al. 1995). Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Gleitsehnen, die über ein Hypomochlion hinwegziehen, wobei die Sehne an diesen Stellen gegen das Hypomochlion gedrückt wird. Im Falle des Lig. iliolumbale könnte es bei den oben beschriebenen Bewegungen des iliolumbalen Übergangs zum Kontakt des Bandes mit Teilen des Beckenkamms kommen. Dadurch liesse sich das Auftreten der für Druck charakteristischen Moleküle an diesen Stellen erklären.

4.4 Klinische Relevanz der Befunde

Das Auftreten von Faserknorpel im Bereich der Anheftungszone eines Bandes ist eine physiologische Anpassungsreaktion des Gewebes und stellt an sich keine Pathologie dar. Dagegen sind degenerative Veränderungen der faserknorpeligen Enthese möglich und bei Tennis-, Golferellbogen und anderen Sehnenansatzerkrankungen oft als Enthesopathien beschrieben worden (Benjamin et al. 2004). Rein faserige Anheftungszone sind von diesen Erkrankungen wesentlich seltener betroffen (Shaw et al. 2007). Histologisch zeichnen sich degenerative Veränderungen durch Zellhaufen von knorpelähnlichen Zellen, verkalkten Fissuren und Verknöcherungen in der Enthese aus (Benjamin et al. 1997; Benjamin et al. 2007). In drei unserer Präparate konnten wir Veränderungen dieser Art nachweisen. Diese degenerativen Veränderungen fanden sich interessanterweise bei relativ jungen Individuen (39-44 J.) und könnten unter Umständen im Zusammenhang mit unspezifischen Rückenschmerzen stehen. Leider sind diesbezüglich keine anamnestischen Daten zugänglich. In diesem Zusammenhang ist auch der Nachweis von neuralen Strukturen interessant, die für die Schmerzentstehung und ihre Weiterleitung verantwortlich sein können. In wie weit die in der Literatur in diesem Zusammenhang genannte Mikrotraumatisierung mit anschließender Sklerosierung (Sims et al. 1996, Naeim 1982) mit den von uns

gefundenen degenerativen Veränderungen in Verbindung steht, bleibt jedoch ungeklärt. Auch ist über den Sklerosierungsprozess noch zu wenig bekannt, um ihn in Zusammenhang mit den in der Literatur beschriebenen Verknöcherungen des Bands zu bringen. Es wird allerdings in der Literatur angenommen, dass Faserknorpel als Substrat für eine enchondrale Ossifikation dienen kann und dadurch eine Mineralisierung ermöglicht (Jozsa et al. 1997; Ogata et al. 1990). Der in der aktuellen Studie erbrachte Nachweis von Kollagen X könnte mit Mineralisierungsvorgängen im Bereich der Enthesis zusammenhängen. Interessant ist in diesem Kontext auch der Nachweis von Parathormonrezeptorprotein in Enthesisregionen (Chen et al. 2007). Ob dieses Protein, dessen Expression durch mechanische Beanspruchung induziert wird (Turner et al. 2002) zu einer Verknöcherung oder zu einem Knochen- oder Abbau führt, ist bisher unklar. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass bei einer Sehnenschädigung ein Umbau der Sehne mit Expression von Kollagen X erfolgt und anschließend eine Mineralisation beobachtet werden konnte (Lui et al. 2009). Rufai et al. (1995) konnten zeigen, dass an der Achillessehne Knochensporne im Sehnenansatzbereich durch enchondrale Ossifikation innerhalb des Faserknorpels entstehen können. Diese Enthesophyten entsprechen den Osteophyten bei Gelenkerkrankungen und können bei Überlastung, Morbus Forestier (DISH: diffuse idiopathic skeletal hyperostosis) und seronegativen Spondylarthropathien beobachtet werden (Benjamin et al. 2006). Seronegative Spondylarthropathien bilden neben der rheumatoiden Arthritis die zweitgrößte Gruppe der rheumatischen Erkrankungen. Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis, bei der die Synovia als zentraler Faktor der Pathogenese identifiziert wurde, vermutet man Veränderungen an den Anheftungsstellen von Bändern und Sehnen als initiale Manifestation der Erkrankung (Benjamin et al. 2001). Im Rahmen dieser Manifestation kommt es zu den für die seronegativen Spondylarthropathien typischen entzündlichen Veränderungen der Enthesis, welche als Enthesitis beschrieben werden (Nash et al. 2005). Es wird zudem angenommen, dass die Knochenbeteiligung bei diesen Erkrankungen (z.B. Sakroiliitis) von den Bandansätzen ausgeht (Benjamin et al. 2001; McGonagle et al. 1998).

Neben anderen Molekülen wurde Aggrecan als Autoantigen für die T-Zell-Reaktion bei entzündlichen Spondylarthropathien identifiziert (Kuon et al. 2004; Li et al. 2000). Link Protein wurde bei Spondylitis ankylosans, einer Erkrankung aus der Gruppe der

seronegativen Spondylarthritiden und bei rheumatoider Arthritis als Autoantigen nachgewiesen (Guerassimov et al. 1997; Zhang et al. 1998). Es wird angenommen, dass diese Moleküle eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der seronegativen Spondylarthropathien spielen (Benjamin et al. 2001). Bewertet man die Befunde zur ECM des Lig. iliolumbale unter diesem Aspekt, so liegt es nahe, einen Zusammenhang von ungeklärten tiefen Rückenschmerzen bei seronegativen Spondylarthropathien und molekularer Zusammensetzung zu vermuten.

Es wird darüber hinaus vermutet, dass die Enthesis Ausgangspunkt einer Verknöcherung ist. Eine inkomplette Verknöcherung eines Lig. iliolumbale wurde bei einer HLA-B27 positiven Patientin beobachtet (Lapadula et al. 1991), während bei Spondylarthritiden ohne weitere Manifestation an der Wirbelsäule über eine vollständige Verknöcherung beider Bänder berichtet wird (Olivieri et al. 1997). Eine erhöhte BMP-2 Expression findet sich interessanterweise bei Spondylitis ankylosans und rheumatoider Arthritis (Park et al. 2008) sowie bei Ossifikation des hinteren Längsbandes (Sato et al. 2007).

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aus der Verteilung der verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix Rückschlüsse auf die mechanische Beanspruchung des Lig. iliolumbale zu ziehen. Dazu wurde bei 11 unfixierten Leichen einseitig das Lig. iliolumbale mit seinen knöchernen Anheftungsstellen entnommen und immunhistochemisch untersucht.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung konnten an beiden Insertionsstellen die für eine faserknorpelige Enthesis charakteristischen Moleküle nachgewiesen werden. Das Auftreten derartiger Faserknorpel wird an anderen Stellen des menschlichen Körpers als Anpassung an lokale Kompression gewertet. Im vorliegenden Fall lässt sich daraus ableiten, dass das Lig. iliolumbale in vivo einer vergleichbaren Beanspruchung ausgesetzt ist. Solche Beanspruchungen entstehen, wenn das Lig. iliolumbale eine

stabilisierende Wirkung auf den lumbosakralen Übergang ausübt. Dabei treten Zugbeanspruchungen im Band auf, welche an den schräg zur Zugrichtung angelegten knöchernen Anheftungsstellen zu lokaler Druckbeanspruchung führen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Lig. iliolumbale ein physiologisch beanspruchter Stabilisator des lumbosakralen Übergangs ist.

Auch innerhalb des Bandes finden sich vereinzelt faserknorpeltypische Moleküle, die auf einen lokalen Kontakt des Bandes mit dem Beckenkamm hinweisen. In 3 Proben konnten Zeichen einer fokalen Degeneration im Bereich einer Enthese beobachtet werden, was zu Spekulationen hinsichtlich der Entstehung von „low back pain“ einlädt. Das Vorkommen von Molekülen, welche bei rheumatoider Arthritis und seronegativer Spondylarthropathie als Autoantigene beschrieben wurden, lässt ebenfalls vermuten, dass entzündliche Schmerzsyndrome ihren Ursprung im Lig. iliolumbale haben können.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Milz für die hervorragende Betreuung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Team der Histologie der AO Foundation in Davos für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, Herrn Jürgen Staiger und der Media Production der AO Foundation für die Hilfe bei der Erstellung der Bilder und Illustrationen bedanken. Herrn Prof. Dr med. Andreas Prescher danke ich für die Bereitstellung der alten anatomischen Literaturquellen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation.

7 Lebenslauf

Schulbildung

Städtisches Gymnasium Herzogenrath, Abitur 1990 – 1999

Ersatzdienst

Zivildienst in der Radiologie und Inneren Medizin des
Medizinisches Zentrums Kreis Aachen GmbH 1999 – 2000

Hochschulstudium

Humanmedizinstudium an der RWTH Aachen, 10/2002 – 12/2008
Ärztliche Prüfung 12/2008
Approbation als Arzt 02/2009
Physikum 09/2004
Gaststudium Physik ETH, Zürich, Schweiz 02/2009 – 05/2009
Physik- und Mathematikstudium 10/2000 – 03/2010
Diplomprüfungen Physik 10/2009 – 02/2010
Vordiplom Physik 10/2002
Gasthörer der Informatik an der Fernuniversität Hagen 10/1999 – 09/2000

Klinische/medizinische Ausbildung

Assistenzarzt

Chirurgie, Spital für das Freiamt, Muri, Schweiz seit 03/2010

Praktisches Jahr

Innere Medizin, Universitätsspital, Zürich, Schweiz 03/2008 – 07/2008
Orthopädie, Schulthess-Klinik, Zürich, Schweiz 12/2007 – 03/2008
Chirurgie, Kantonsspital, Luzern, Schweiz 08/2007 – 12/2007

Famulatur

Orthopädie, Clinique Mutualiste, Lyon, Frankreich 07/2007 – 08/2007
Anästhesie, Ev.-Luth. Diakonissenanstalt, Flensburg 09/2005 – 10/2005
Innere Medizin, Uniklinikum, Aachen 02/2005 – 03/2005

8 Literaturverzeichnis

Aihara T, Takahashi K, Ono Y, Moriya H. Does the morphology of the iliolumbar ligament affect lumbosacral disc degeneration? *Spine* 27: 1499-1503, 2002

Aihara T, Takahashi K, Yamagata M, Moriya H, Shimada Y. Does the iliolumbar ligament prevent anterior displacement of the fifth lumbar vertebra with defects of the pars? *J Bone Joint Surg Br* 82: 846-850, 2000

Akutsu N, Milbury CM, Burgeson RE, Nishiyama T. Effect of type XII or XIV collagen NC-3 domain on the human dermal fibroblast migration into reconstituted collagen gel. *Exp Dermatol* 8: 17-21, 1999

Alberts B. Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*. Eds. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Garland Science 4:1066-1125, 2002

Alexander, R. elastic energy stores in running vertebrates. *Am Zool* 24: 85-94, 1984

Asher R, Perides G, Vanderhaeghen JJ, Bignami A. Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyaluronate-protein complex. *J Neurosci Res* 28: 410-421, 1991

Basadonna PT, Gasparini D, Rucco V. Iliolumbar ligament insertions. In vivo anatomic study. *Spine* 21: 2313-2316, 1996

Benjamin M, Evans EJ. Fibrocartilage. *J Anat* 171: 1-15, 1990

Benjamin M, Evans EJ, Copp L. The histology of tendon attachments to bone in man. *J Anat* 149: 89-100, 1986

Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat* 199: 503-526, 2001

Benjamin M, McGonagle D. Histopathologic changes at "synovio-entheseal complexes" suggesting a novel mechanism for synovitis in osteoarthritis and spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 56: 3601-3609, 2007

Benjamin M, Qin S, Ralphs JR. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J Anat* 187 (Pt 3): 625-633, 1995

Benjamin M, Ralphs JR. Tendons and ligaments--an overview. *Histol Histopathol* 12: 1135-1144, 1997

Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 193 (Pt 4): 481-494, 1998

Benjamin M, Redman S, Milz S, Buttner A, Amin A, Moriggl B, Brenner E, Emery P, McGonagle D, Bydder G. Adipose tissue at entheses: the rheumatological implications of its distribution. A potential site of pain and stress dissipation? *Ann Rheum Dis* 63: 1549-1555, 2004

Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load *J Anat* 208: 471-490, 2006

Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr Opin Rheumatol* 13: 128-134, 2001

Boszczyk BM, Boszczyk AA, Boos W, Korge A, Mayer HM, Putz R, Benjamin M, Milz S. An immunohistochemical study of the tissue bridging adult spondylolytic defects-the presence and significance of fibrocartilaginous entheses. *Eur Spine J* 15(6): 965-971, 2006

Broadhurst N. The iliolumbar ligament syndrome. *Aust Fam Physician* 18: 522, 1989

Broudeur P, Larroque CH, Passeron R, Pellegrino J. Les aspects nouveaux du syndrome iliolumbaire, 440 observations de syndesmo-periostite iliolumbaire. *Lyon Med* 17: 4708-33, 1981.

Broudeur P, Larroque CH, Passeron R, Pellegrino J. [Iliolumbar syndrome. A syndesmoperiostitis of the iliac crest. Clinical, radiologic and therapeutic summary. Diagnosis with lumbar sciatica. 440 cases]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 49: 693-698, 1982

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution *Clin Orthop Relat Res* 250-272, 1992

Calabro A, Hascall VC, Caterson B. Monoclonal antibodies directed against epitopes within the core protein structure of the large aggregating proteoglycan (aggrecan) from the swarm rat chondrosarcoma. *Arch Biochem Biophys* 298: 349-360, 1992

Caterson B, Christner JE, Baker JR, Couchman JR. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. *Fed Proc* 44: 386-393, 1985

Chen X, Macica C, Nasiri A, Judex S, Broadus AE. Mechanical regulation of PTHrP expression in entheses. *Bone* 41: 752-759, 2007

Chow DH, Luk KD, Leong JC, Woo CW. Torsional stability of the lumbosacral junction. Significance of the iliolumbar ligament. *Spine* 14: 611-615, 1989

Cotta ad. Ein Beitrag zur Verkalkung des Ligamentum iliolumbale. Arch Orthop Unfallchir 56: 277-307, 1964

Evanko SP, Vogel KG. Proteoglycan synthesis in fetal tendon is differentially regulated by cyclic compression in vitro. Arch Biochem Biophys 307: 153-164, 1993

Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ. Fibrocartilage in the attachment zones of the quadriceps tendon and patellar ligament of man. J Anat 171: 155-162, 1990

Eyre D. Collagen of articular cartilage. Arthritis Res 4: 30-35, 2002

Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? Eur Cell Mater 12: 57-63, 2006

Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. J Cell Biol 151: 779-788, 2000

Farina G, Lemaire R, Korn JH, Widom RL. Cartilage oligomeric matrix protein is overexpressed by scleroderma dermal fibroblasts. Matrix Biol 25: 213-222, 2006

Fick R. Verbindungen der Wirbelsäule mit dem Becken. In: Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke. Erster Teil: Anatomie der Gelenke. Ed. Fick R. Gustav Fischer, 110-115, 1904

Franchi M, Trire A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. ScientificWorldJournal 7: 404-420, 2007

Fujiwara A, Tamai K, Yoshida H, Kurihashi A, Saotome K, An HS, Lim TH. Anatomy of the iliolumbar ligament. Clin Orthop Relat Res 167-172, 2000

Gregory MC. The clinical features of thin basement membrane nephropathy. Semin Nephrol 25: 140-145, 2005

Guerassimov A, Duffy C, Zhang Y, Banerjee S, Leroux JY, Reimann A, Webber C, Delaunay N, Vipparti V, Ronbeck L, Cartman A, Arsenault L, Rosenberg LC, Poole AR. Immunity to cartilage Link Protein in patients with juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol 24: 959-964, 1997

Hanson P, Sonesson B. The anatomy of the iliolumbar ligament. Arch Phys Med Rehabil 75: 1245-1246, 1994

Hedlund H, Hedbom E, Heineg rD, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP, Svensson O. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. J Biol Chem 274: 5777-5781, 1999

Heinegard D, Oldberg A. Glycosylated Matrix Proteins. In: *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, 189-209, 1993

Henle J. Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Erster Band: Knochenlehre des Menschen. Ed Henle J. Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn: 116-117, 1871

Hessle H, Engvall E. Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 259: 3955-3961, 1984

Hirschberg GG, Froetscher L, Naeim F. Iliolumbar syndrome as a common cause of low back pain: diagnosis and prognosis. *Arch Phys Med Rehabil* 60: 415-419, 1979

Hjorten R, Hansen U, Underwood RA, Telfer HE, Fernandes RJ, Krakow D, Sebald E, Wachsmann-Hogiu S, Bruckner P, Jacquet R, Landis WJ, Byers PH, Pace JM. Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* 41: 535-542, 2007

Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H. Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum* 29: 400-410, 1986

Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 71: 481-539, 1991

Jordan JM. Cartilage oligomeric matrix protein as a marker of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 70: 45-49, 2004

Jozsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports* 7: 113-118, 1997

Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports* 7: 107-112, 1997

Kapandji I. Band 3: Rumpf und Wirbelsaeule. In: *Funktionelle Anatomie der Gelenke. Schematisierte und kommentierte Zeichnungen zur menschlichen Biomechanik*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 48:1-244, 1985

Kielty CM, Shuttleworth CA. Synthesis and assembly of fibrillin by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Sci* 106 (Pt 1): 167-173, 1993

Kiernan JA. In: *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. Butterworth-Heinemann: 390-418, 1999

Kiter E, Karaboyun T, Tufan AC, Acar K. Immunohistochemical demonstration of nerve endings in iliolumbar ligament. *Spine*, 35: E101-4, 2010

Knese KH. Die Knochenbildung an Sehnen und Bandansätzen im Bereich ursprünglicher chondraler Apophysen. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 49: 142-187, 1958

Kuon W, Kuhne M, Busch DH, Atagunduz P, Seipel M, Wu P, Morawietz L, Fernahl G, Appel H, Weiss EH, Krenn V, Sieper J. Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthritis. J Immunol 173: 4859-4866, 2004

Lander AD. Proteoglycans. In: Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Eds. Kreis T, Vale R. 351-356, 1999

Lapadula G, Covelli M, Numo R, Pipitone V. Iliolumbar ligament ossification as a radiologic feature of reactive arthritis. J Rheumatol 18: 1760-1762, 1991

Lauder RM, Huckerby TN, Brown GM, Bayliss MT, Nieduszynski IA. Age-related changes in the sulphation of the chondroitin sulphate linkage region from human articular cartilage aggrecan. Biochem J 358: 523-528, 2001

Leong JC, Luk KD, Chow DH, Woo CW. The biomechanical functions of the iliolumbar ligament in maintaining stability of the lumbosacral junction. Spine 12: 669-674, 1987

Li NL, Zhang DQ, Zhou KY, Cartman A, Leroux JY, Poole AR, Zhang YP. Isolation and characteristics of autoreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients. Cell Res 10: 39-49, 2000

Lui PP, Fu SC, Chan LS, Hung LK, Chan KM. Chondrocyte Phenotype and Ectopic Ossification in Collagenase-induced Tendon Degeneration. J Histochem Cytochem 57: 91-100, 2009

Maigne JY, Maigne R. Trigger point of the posterior iliac crest: painful iliolumbar ligament insertion or cutaneous dorsal ramus pain? An anatomic study. Arch Phys Med Rehabil 72: 734-737, 1991

Mainoldi F. [Calcification of the iliolumbar ligaments with bilateral transverse enlarged apophysis.]. Ann Radiol Diagn (Bologna) 24: 224-233, 1952

Mayne R. Preparation and applications of monoclonal antibodies to different collagen types. Clin Biochem 21: 111-115, 1988

McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. Lancet 352: 1137-1140, 1998

Milz S, Benjamin M, Putz R. Molecular Parameters Indicating Adaptation to Mechanical Stress in Fibrous Connective Tissue. Advances in Anatomy, Embryology

and Cell Biology. In: *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Eds. Beck FF, Clascá F, Korf H-W, Marani E, Sano Y, Zilles K. Springer, 1-74, 2005a

Milz S, Boszczyk BM, Boszczyk AA, Putz R, Benjamin M. Die Enthesis. Physiologische Morphologie, molekulare Zusammensetzung und pathoanatomische Veränderungen. *Orthopade* 34: 526-532, 2005b

Milz S, Eckstein F, Putz R. The thickness of the subchondral plate and its correlation with the thickness of the uncalcified articular cartilage in the human patella. *Anat Embryol (Berl)* 192: 437-444, 1995

Milz S, Schluter T, Putz R, Moriggl B, Ralphs JR, Benjamin M. Fibrocartilage in the transverse ligament of the human atlas. *Spine* 26: 1765-1771, 2001a

Milz S, Valassis G, Buttner A, Maier M, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M. Fibrocartilage in the transverse ligament of the human acetabulum. *J Anat* 198: 223-228, 2001b

Naeim F, Froetscher L, Hirschberg GG. Treatment of the chronic iliolumbar syndrome by infiltration of the iliolumbar ligament. *West J Med* 136: 372-374, 1982

Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem* 53: 3-11, 2005

Nash P, Mease PJ, Braun J, van der HD. Seronegative spondyloarthropathies: to lump or split? *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2: ii9-13, 2005

Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lawler J. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics* 24: 435-439, 1994

Ogata S, Uthoff HK. Acromial enthesopathy and rotator cuff tear. A radiologic and histologic postmortem investigation of the coracoacromial arch. *Clin Orthop Relat Res* 39-48, 1990

Olivieri I, Padula A, Pierro A, Barozzi L, Ferri S, Pavlica P. Iliolumbar ligament ossification in undifferentiated seronegative spondyloarthropathy. *Clin Rheumatol* 16: 212-214, 1997

Olsen BR, Ninomiya Y. Collagens. In: *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. Eds. Kreis T, Vale R. 380-408, 1999

Park MC, Park YB, Lee SK. Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 37: 200-204, 2008

Pauwels F. Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates. Springer Verlag, New York 1965.

Pennal GF, Tile M, Waddell JP, Garside H. Pelvic disruption: assessment and classification. Clin Orthop Relat Res 12-21, 1980

Ploetz E. Funktioneller Bau und funktionelle Anpassung der Gleitsehnen. Zeitschr f Orthop u ihre Grenzgebiete 3: 212-234, 1938

Pool-Goudzwaard A, Hoek vD, Mulder P, Spoor C, Snijders C, Stoeckart R. The iliolumbar ligament: its influence on stability of the sacroiliac joint. Clin Biomech (Bristol , Avon) 18: 99-105, 2003

Reis ND, Keret D. Fracture of the transverse process of the fifth lumbar vertebra. Injury 16: 421-423, 1985

Riley GP, Goddard MJ, Hazleman BL. Histopathological assessment and pathological significance of matrix degeneration in supraspinatus tendons. Rheumatology (Oxford) 40: 229-230, 2001

Rucco V, Basadonna PT, Gasparini D. Anatomy of the iliolumbar ligament: a review of its anatomy and a magnetic resonance study. Am J Phys Med Rehabil 75: 451-455, 1996

Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. J Orthop Res 13: 585-593, 1995

Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. J Cell Biol 111: 1685-1699, 1990

Sato R, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, Takamura T, Bangirana A, Itoh H, Baba H. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front. J Neurosurg Spine 7: 174-183, 2007

Schochat T, Jackel WH. Rückenschmerzen aus epidemiologischer Sicht. Rehabilitation (Stuttg) 37: 216-223, 1998

Shaw HM, Benjamin M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. Scand J Med Sci Sports 17: 303-315, 2007

Sims JA, Moorman SJ. The role of the iliolumbar ligament in low back pain 18. Med Hypotheses 46: 511-515, 1996

Snijders CJ, Hermans PF, Niesing R, Jan KG, Pool-Goudzwaard A. Effects of slouching and muscle contraction on the strain of the iliolumbar ligament. *Man Ther* 13: 325-333, 2008

Snijders CJ, Hermans PF, Niesing R, Spoor CW, Stoeckart R. The influence of slouching and lumbar support on iliolumbar ligaments, intervertebral discs and sacroiliac joints. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 19: 323-329, 2004

Sodersten F, Ekman S, Eloranta ML, Heinegard D, Dudhia J, Hultenby K. Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon. *Matrix Biol* 24: 376-385, 2005

Throuvalas A. [Bilateral calcification of the iliolumbar ligament; three case reports.]. *J Radiol Electrol Arch Electr Medicale* 32: 904-905, 1951

Turner CH, Robling AG, Duncan RL, Burr DB. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif Tissue Int* 70: 435-442, 2002

Uthhoff HK. Prenatal development of the iliolumbar ligament. *J Bone Joint Surg Br* 75: 93-95, 1993

Viola M, Bartolini B, Sonaggere M, Giudici C, Tenni R, Tira ME. Fibromodulin interactions with type I and II collagens. *Connect Tissue Res* 48: 141-148, 2007

Vogel KG. Fibrocartilage in tendon: A response to compressive load. In: *Repetitive motion disorders of the upper extremity.* Eds. Gordon SL, Blair SJ, Fine LJ. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 205-215, 1995

Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol* 115: 267-293, 1989

Vuori IM. Dose-response of physical activity and low back pain, osteoarthritis, and osteoporosis. *Med Sci Sports Exerc* 33: S551-S586, 2001

Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470, 1998

Waldeyer W. Das Becken. Topographisch-Anatomisch mit besonderer Berücksichtigung der Chirurgie und Gynäkologie. Verlag von Friedrich Cohen (Bonn): 28-29, 1899

Walker BF. The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord* 13: 205-217, 2000

Watanabe H, Gao L, Sugiyama S, Doege K, Kimata K, Yamada Y. Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: protein sequence, gene structure and promoter sequence. *Biochem J* 308 (Pt 2): 433-440, 1995

Yamamoto I, Panjabi MM, Oxland TR, Crisco JJ. The role of the iliolumbar ligament in the lumbosacral junction. *Spine* 15: 1138-1141, 1990

Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg LC, Poole AR. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage Link Protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes. *Am J Pathol* 153: 1283-1291, 1998