

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

(Direktor: Prof. Dr. med. A. Roessner)

**Die Bedeutung von Cysteinproteasen (Cathepsin
B, H, L und S) für die Pathogenese der AA- und AL
Amyloidose**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr.med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Steffi Vöckler

aus Bad Soden

Magdeburg 2007

Dokumentationsblatt

Zur Dissertation „Die Bedeutung von Cysteinproteasen (Cathepsin B, H, L und S) für die Pathogenese der AA- und AL Amyloidose.“, vorgelegt von Steffi Vöckler, geboren in Magdeburg. - 2007 - 85 Bl. : 19 Abb., 12 Tab.

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. Albert Roessner)

Kurzreferat:

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Hypothese, dass Cysteinproteasen in unterschiedlicher Weise an der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose beteiligt sind. Es wurde immunhistochemisch die Expression von Cathepsin B, H, L und S in Gewebeproben (Leber, Niere, Milz) von 10 AA- und 8 AL Amyloidosefällen untersucht. Als Kontrollen dienten 5 Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Erkrankung ohne generalisierte Amyloidose. Das Vorkommen von Amyloid wurde mittels Kongorotfärbung geprüft. Die Klassifikation der Amyloidosen erfolgte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen AA Amyloid, Amyloid P-Component, β 2-Mikroglobulin, κ und λ -Leichtketten und Transthyretin. In allen 18 Sektionsfällen konnten in allen 3 untersuchten Organen Cathepsin B, H, L und S positive Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei Cath B positivem AA Amyloid und Cath B positivem AL Amyloid, wobei in den Fällen mit AA Amyloidose signifikant mehr Cath B positives Amyloid vorhanden war als in den Fällen mit AL Amyloidose. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Cysteinproteasen in der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose eine Rolle spielen.

Schlüsselwörter: AA- und AL Amyloidose, Cysteinproteasen: Cathepsin B, H, L und S, Immunhistochemie

Inhaltsverzeichnis

	Dokumentationsblatt	2
	Inhaltsverzeichnis	3
	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	9
1.1	Geschichte des Amyloids	9
1.2	Definition des Amyloids und der Amyloidosen	10
1.2.1	Klassifikation und Einteilung der Amyloidosen	12
1.3	AA Amyloidose	13
1.3.1	Pathogenese	14
1.3.2	Diagnostik	17
1.3.3	Therapie	18
1.4	AL Amyloidose	19
1.4.1	Pathogenese	20
1.4.2	Diagnostik	22
1.4.3	Therapie	23
1.5	Cysteinproteasen	25
1.5.1	Cathepsin B	26
1.5.2	Cathepsin H	26
1.5.3	Cathepsin L	27
1.5.4	Cathepsin S	27
1.5.5	Bedeutung der Cysteinproteasen	27
1.6	Ziel der Arbeit	29
2.	Material und Methoden	31
2.1	Autopsiekollektiv	31
2.2	Material/Reagenzien und Instrumente	33
2.2.1	Materialien und Reagenzien für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen	33
2.2.2	Verwendete Instrumente	33
2.2.3	Primärantikörper für die Immunhistochemie	33
2.2.3.1	Primärantikörper für die immunhistochemische Klassifizierung des Amyloids	33

2.2.3.2	Primärantikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Cathepsin B, H, L und S	35
2.2.4	Detektionssysteme für die Immunhistochemie	36
2.2.5	Eindeckmaterial	36
2.3	Histochemische und immunhistochemische Färbungen	36
2.3.1	Verwendete Färbe- und Pufferlösungen	37
2.3.1.1	Gebrauchslösungen für die Kongorotfärbung	37
2.3.1.2	Tris Puffer	37
2.3.1.3	Pufferlösung für die Verdünnung der Primärantikörper	37
2.3.1.4	Färbelösung für die Immunhistochemie	37
2.3.2	Kongorotfärbung	38
2.3.3	Immunhistochemie	38
2.3.4	Kontrollen	39
2.4	Auswertung	39
2.5	Statistik	40
3.	Ergebnisse	40
3.1	Auswertung der Kongorotfärbung in AA Amyloidose	40
3.1.1	Leber	40
3.1.2	Niere	40
3.1.3	Milz	40
3.2	Auswertung der Kongorotfärbung in AL Amyloidose	43
3.2.1	Leber	43
3.2.2	Niere	43
3.2.3	Milz	44
3.3	Auswertung der Kongorotfärbung der Kontrollen	46
3.4	Immunhistochemischer Nachweis der Cathepsine B, H, L und S in der Leber, Niere und Milz	46
3.4.1	Cathepsin B	46
3.4.1.1	Nachweis von Cathepsin B in und neben Amyloidablagerungen	47
3.4.1.2	Cathepsin B positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid	47
3.4.1.3	Zusammenfassung	48
3.4.1.4	Statistische Auswertung der Immunhistologie	50

3.4.2	Cathepsin H	50
3.4.2.1	Nachweis von Cathepsin H in und neben Amyloidablagerungen	51
3.4.2.2	Cathepsin H positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid	51
3.4.2.3	Zusammenfassung	52
3.4.2.4	Statistische Auswertung der Immunhistochemie	52
3.4.3	Cathepsin L	53
3.4.3.1	Nachweis von Cathepsin L in und neben Amyloidablagerungen	53
3.4.3.2	Cathepsin L positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid	54
3.4.3.3	Zusammenfassung	54
3.4.3.4	Statistische Auswertung der Immunhistochemie	55
3.4.4	Cathepsin S	55
3.4.4.1	Nachweis von Cathepsin S in und neben Amyloidablagerungen	56
3.4.4.2	Cathepsin S positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid	56
3.4.4.3	Zusammenfassung	57
3.4.4.4	Statistische Auswertung der Immunhistochemie	57
3.5	Expression von Cathepsin B, H, L und S in mehrkernigen Riesenzellen	59
3.5.1	AA Amyloidose	59
3.5.2	AL Amyloidose	59
3.6	Zusammenfassung	60
3.6.1	Expression der Cathepsine B, H, L und S in AA- und AL Amyloidose	60
3.6.2	Expression der Cathepsine B, H, L und S in mehrkernigen Riesenzellen	61
4.	Diskussion	63
4.1	AA- und AL Amyloidose	63
4.2	Methode	63
4.3	Morphologischer Nachweis der Cathepsine B, H, L und S	63
4.4	Räumliches Verteilungsmuster der Cysteinproteasen	64

4.4.1	Vergleich der Immunreaktion direkt im AA- und AL Amyloid	64
4.5	Biologische Bedeutung proteolytischer Prozesse in der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose	66
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	73
	Danksagung	81
	Erklärung der Autorin	82
	Lebenslauf der Autorin	83
	Publikationen	85

Abkürzungsverzeichnis

AA	Amyloid A
ABC	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
AEF	Amyloid enhancing factor
AK	Antikörper
AL	Amyloid Leichtkette
Apo E	Apolipoprotein E
AP	Alkalische Phosphatase
ASCT	autologe Stammzelltransplantation
ATTR	Amyloid Transthyretin
Cath	Cathepsin
COPD	chronisch obstruktive Bronchitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
Dex	Dexamethason
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
d. h.	das heisst
D. m. Typ II	Diabetes mellitus Typ II
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAB	Fettaspirationsbiopsie
HCL	Chlorwasserstoff
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HDM	Hochdosis- Chemotherapie mit Melphalan
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzerkrankung
M-Dex	Melphalan/Dexamethason
min.	Minute
MP	Melphalan/Prednisolon
mRNA	Messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
µm	Mikrometer
MKR	mehrkernige Riesenzellen
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase-Methode
PCR	Polymerase -Kettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P-Komponente
sec.	Sekunde
Std.	Stunde
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
Tris	Tri-(hydroxymethyl-)aminomethan
u. a.	unter anderem
u./o.	und/oder
u. U.	unter Umständen
VAD	Vincristin, Adriamycin, Dexamethason
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Geschichte des Amyloids

Der Wiener Pathologe K. Rokitansky beschrieb als einer der Ersten im Jahre 1842 eine pathologische Organveränderung, die heute als Amyloidose bezeichnet wird. Er beschrieb die makroskopischen Veränderungen der Leber und Milz als „speckig und wächsern“ [Mathis 1969]. Rudolf Virchow wurde durch seine Veröffentlichung: „Mittheilung über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen“ zum berühmtesten Beschreiber des Amyloids und war sein Namensgeber. Er behandelte Organproben einer Milz mit Salpetersäure und wässriger Jodlösung, was zu einer gelblich-roten Färbung führte. Nach dem Hinzufügen von Schwefelsäure zeigte sich eine starke, violette Färbung, die auch nach Behandlung pflanzlicher Stärke beobachtet wird und er war somit der Überzeugung, Cellulose nachgewiesen zu haben. Er gab der pathologischen Veränderung den Namen Amyloid (griechisch: amydon, lateinisch: amyllum für Cellulose) [Sipe und Cohen 2000]. Heute wissen wir, dass der von Rudolf Virchow beobachtete Farbumschlag auf die in allen Amyloiden enthaltenen Glykosaminoglykane zurückzuführen ist. 1859 zeigten N. Friedreich und A. Kekule mit Hilfe von chemischen Versuchen, dass „... bei weitem die Hauptmasse jener wachsartigen Substanz ein dem Eiweiß oder Fibrin ähnlicher Körper sei...“ [Friedreich und Kekule 1859].

Laut H. P. Missmahl beschrieb H. Bennhold erstmals 1922 die Kongophilie von Amyloid, was ein großer Fortschritt war, da alle vorherigen Versuche, Amyloid spezifisch anzufärben, fehlschlagen [Missmahl 1957].

Durch licht-, elektronenmikroskopische, histopathologische Untersuchungsmethoden sowie die Röntgenbeugungsspektren konnte man das Amyloid immer besser beschreiben. P. Divry entdeckte 1927 die Doppelbrechung in Amyloidsubstanzen. H. P. Missmahl und M. Hartwig stellten fest, dass in Kongorot gefärbtem Amyloid die Doppelbrechung noch besser zu sehen ist und eine charakteristische grün-gelbe Polarisationsfarbe aufweist [Missmahl und Hartwig 1953].

Später zeigten ultrastrukturelle Untersuchungen, dass Amyloid aus starren Fibrillen mit gleichem Durchmesser und variabler Länge besteht, die sich wiederum aus in paralleler oder antiparalleler β - Faltblattstruktur angeordneten Amyloidproteinen zusammensetzen [Sipe und Cohen 2000].

1.2 Definition des Amyloids und der Amyloidosen

Heute definiert man Amyloid als pathologische Proteinablagerung, die durch folgende Eigenschaften charakterisiert ist: 1. eine typische apfelgrüne Polarisationsfarbe im polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polaren nach einer Kongorotfärbung, 2. charakteristische Infrarot- und Röntgenbeugungsspektren und 3. das Vorhandensein von starren Fibrillen mit einem Durchmesser von zirka 10 nm und einer variablen Länge [Glenner 1980a und 1980b, Röcken und Shakespeare 2002]. Das Amyloidfibrillenprotein zeigt eine antiparallele β - Faltblattstruktur, wobei die Kongophilie auf diese zurückzuführen ist [Missmahl und Hartwig 1953, Glenner 1980a und 1980b]. Es gibt verschiedene Amyloidtypen, die sich in ihrer Pathogenese und in der Primärstruktur des abgelagerten Amyloidproteins voneinander unterscheiden. Gemeinsamkeiten sind der fibrilläre Aufbau, die Amyloid P- Komponente, das Apolipoprotein E, Proteoglykane und Glukosaminoglykane [Kisilevsky 1992, Gallo et al. 1994].

Die Amyloidproteine leiten sich von Vorläuferproteinen ab, welche physiologisch im Organismus vorkommen. Bis heute wurden mehr als 26 verschiedene Proteine identifiziert, die Amyloid bilden können (Tab.1). Im Vergleich der einzelnen Vorläuferproteine konnte bisher keine Ähnlichkeit in Struktur und Funktion nachgewiesen werden. Jedoch eine Gemeinsamkeit ist das Vermögen, unter bestimmten Bedingungen ihre Struktur so zu ändern, dass es zur Bildung und Ablagerung von Amyloid kommt [Glenner 1980a und 1980b, Röcken und Shakespeare 2002, Röcken et al. 2006]. Die Amyloidose kennzeichnet den Organschaden, der durch die Amyloidablagerung zu Struktur- und Funktionsstörungen u./o. Größenzunahme von Organen führen kann [Saeger und Röcken 1998].

Amyloid-protein	Vorläuferprotein	Amyloidose/Grunderkrankung
AA	Serum Amyloid A	Reaktive (entzündlich) Amyloidose, Familiäres Mittelmeerfieber, Idiopathisch
AL	Immunglobulin Leichtkette	Idiopathisch, Myelom- und Makroglobulinämie- assoziiert, Familiäre Amyloidose
AH	Immunglobulin Schwerkette	Multiplere Myelom, AL Amyloidose
AApo A-I	Apolipoprotein A-I	Familiäre Amyloid-Polyneuropathie
AApo A-II	Apolipoprotein A-II	Atherosklerose-assoziierte Amyloidose
ATTR	Transthyretin	Hereditäre renale Amyloidose
AGel	Gelsolin	Familiäre Amyloidpolyneuropathie (Portugiesischer Typ), Senile kardiovaskuläre Amyloidose
ACys	Cystatin C	Familiäre Amyloidpolyneuropathie (Finnischer Typ) gittrige Hornhautdystrophie
ALys	Lysozym	Familiäre viszerale Amyloidose
AFib	Fibrinogen	Familiäre Amyloidose (Island- Typ)
A β	A β -Vorläuferprotein (A β PP)	Hereditäre systemische Amyloidose
A β 2M	β 2-Mikroglobulin	senile Demenz vom Alzheimer-Typ, Trisomie 21
APrP	Prion Protein	Hereditäre zerebrale Amyloidose, (Holländischer-Typ)
AKer	Keratoepithelin	chronische Hämodialyse, Gelenke
ALac	Lactoferrin	Creutzfeld-Jakob Erkrankung, Kuru Krankheit
ATau	Tau Protein	spongiforme Enzephalopathie
ADan	ADanPP (oder Bri-D)	Kornea, gittrige Hornhautdystrophie
ABri	AbriPP (oder Bri-L)	Korneales Amyloid (Trichiasis)
ASeg	Semenogilin I	Hirn
ACal	(Pro)Calcitonin	Hereditäre Amyloidose, ophtho-oto-encephalica (Dänischer Typ)
AANF	Antrionatriuretisches Peptid	Familiäre Demenz (Britischer Typ)
APin	FLJ20513-assoziiertes Protein	Samenblase
AMed	Lactadherin	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
AIAPP	Inselamyloid Polypeptid	Lokales Vorhofamyloid, Vorhofflimmern
AIns	Insulin	Pindborg Tumor
APro	Prolactin	Amyloid in der Media der Aorta
		Langerhansinseln, Lokale Inselamyloidose (Diabetiker), Insulinom
		Iatrogen
		Hypophyse, Hypophysenadenom

Tabelle 1: Amyloidproteine und ihre Vorläuferproteine [Röcken et al. 2006]

1.2.1 Klassifikation und Einteilung der Amyloidosen

Amyloidosen können chemisch, nach klinischen Merkmalen, ätiologisch, nach dem Verteilungstyp sowie nach dem Organbefall eingeteilt werden. Die verschiedenen Amyloidosen werden durch ihre Amyloidfibrillenproteine unterschieden. Jedem Amyloidsyndrom sind entsprechende Krankheitsbilder zugeordnet (Tab.1). Eine weitere Einteilung in reaktiv-entzündliche, erworbene, hereditäre, tumorassoziierte, endokrine, senile, iatrogene und idiopatische Formen, zeigt die Vielfalt der Amyloidosen [Glennner 1980a und 1980b, Ston 1990, Kisilevsky 1991, Cornwell et al. 1995, Röcken et al. 2006].

Zusätzlich unterscheidet man den Verteilungstyp, wobei man die lokale (organ-limitierte) von einer generalisierten (systemischen) Amyloidose abgrenzt.

Nach M. B. Pepys zählt beispielsweise die AA-, AL-, A β 2M- und die senile Amyloidose zu den erworbenen systemischen Amyloidosen [Pepys 2001]. Eine andere Einteilung erfolgt nach der zu Grunde liegenden Erkrankung. Hierbei entstehen reaktive und entzündliche Amyloidosen, z.B. die AA Amyloidose, als Folge einer chronisch-entzündlichen Erkrankung. Die AL Amyloidose zählt somit zu den tumorassoziierten Amyloidosen auf dem Boden myeloproliferativer Erkrankungen. Amyloidablagerungen in Hypophysen-, Schilddrüsen- und Pankreastumoren werden zu den endokrinen Formen der Amyloidosen gezählt.

R. W. Carrell und D. A. Lomas zählen die Amyloidose zu den „konformationellen Erkrankungen“. Diese sind gekennzeichnet durch einen pathologischen Mechanismus, bei dem ein autologes, physiologisch vorkommendes Protein so in Struktur und Größe verändert wird, dass es zur pathologischen Selbstaggregation und Ablagerung im Gewebe kommt, wobei Teile dieser Proteine in richtiger Tertiärstruktur verbleiben und in ihrer physiologischen Form freigesetzt werden. Laut R. W. Carrell und D. A. Lomas zählen u. a. auch die bovine spongiforme Enzephalopathie, der Morbus Alzheimer, die Creuzfeld-

Jacob-Krankheit und die Kuru-Krankheit zu den konformationellen Erkrankungen [Carrell und Lomas 1997].

Die AA- und AL Amyloidose sind Bestandteil der hier beschriebenen Untersuchung.

1.3 AA Amyloidose

Die AA Amyloidose zählt in der klinischen Pathologie neben der AL Amyloidose und der hereditären und nichthereditären ATTR Amyloidose zu den häufigsten generalisierten, systemischen Amyloidosen [Röcken und Ernst 2006]. Dieser Typ der Amyloidose tritt meistens infolge persistierender Entzündungsaktivität auf. Eine Vielfalt an Krankheitsbildern können bei chronischen Entzündungen eine AA Amyloidose als Folgeleiden entwickeln [Röcken et al. 2006]:

- entzündlich- rheumatische Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Spondylitis ankylosans, Arthritis psoriatica, Polymyalgia rheumatica mit Arteriitis temporalis, adulter Morbus Still, M. Behcet)
- andere chronische Entzündungen (Sarkoidose, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, chronische Pankreatitis, Sprue, M. Whipple, Mukoviszidose)
- hereditäre Fiebresyndrome (Familiäres Mittelmeerfieber, Tumornekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Fiebersyndrom, Familial-Cold-Autoinflammatory-Syndrom, Muckle-Wells-Syndrom, Hyperimmunglobulinämie D mit periodischem Fiebersyndrom)
- chronisch- infektiöse Erkrankungen (Tuberkulose, Bronchiektasen, Osteomyelitis, Dekubitus, Chronische Pyelonephritis bei Paraplegikern, HIV-infektion, Lepra)

Maligne Erkrankungen wie beispielsweise das Nierenzellkarzinom, das Hodgkin- und Non-Hodgkin- Lymphom und das Mesotheliom können ebenfalls selten einmal zu einer AA Amyloidose führen. Auch bei der Rosai-Dorfmann-Erkrankung tritt sie gelegentlich auf. In 5 % der Fälle

mit AA Amyloidose wurden keine Grunderkrankungen gefunden [Röcken et al. 1999, Röcken et al. 2000, Röcken und Shakespeare 2002, Zhu et al. 2004, Röcken et al. 2006a].

Das Auftreten der mit AA Amyloidose assoziierten Erkrankungen zeigt deutliche geografische Unterschiede. In den westlichen Ländern sind in den letzten Jahrzehnten die entzündlich- rheumatischen Erkrankungen mit 66-76% die häufigste Ursache einer AA Amyloidose. In Ländern mit einem hohen Aufkommen des familiären Mittelmeerfiebers wie z.B. in der Türkei ist dieses die Hauptursache der AA Amyloidose. In der dritten Welt und auf dem indischen Subkontinent sind Tuberkulose und Lepra hauptsächlich Ursache der Erkrankung.

Bei der AA Amyloidose sind parenchymatöse Organe, wie Leber, Milz und Niere am häufigsten betroffen [Röcken und Shakespeare 2002, Röcken und Sletten 2003, Röcken et al. 2006a].

1.3.1 Pathogenese

Es wird angenommen, dass eine hohe Serumkonzentration des Vorläuferproteins Serum Amyloid A (SAA), Konformationsveränderungen und proteolytische Vorgänge an der Pathogenese der AA Amyloidose beteiligt sind.

SAA ist ein physiologisch vorkommendes Akut-Phase-Protein. Es existieren 4 menschliche Isoformen. SAA1 und SAA2 werden von der Leber synthetisiert und sind Apolipoproteine. Sie binden an Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor(TNF)- α stimulieren die hepatische Synthese des SAA. Während einer Akut-Phase-Reaktion steigt der Plasmaspiegel des SAA um das 1000- fache an [Husby et al. 1994]. Eine erhöhte Syntheserate oder eine Akkumulation durch verringerten Abbau kann solche Konzentrationserhöhungen hervorrufen. Es gilt als gesichert, dass das wiederholte Ansteigen der Serumkonzentration dieses Akut-Phase-Proteins im Rahmen chronisch rezidivierender entzündlicher Erkrankungen an der Entstehung der AA Amyloidose beteiligt bzw. Voraussetzung ist. Es wurde noch keine AA Amyloidose ohne Akut-

Phase-Reaktion oder ohne erhöhten SAA-Spiegel diagnostiziert [Röcken und Shakespeare 2002].

J. D. Gillmore und Kollegen untersuchten Patienten mit AA Amyloidose und stellten im Vergleich zu Patienten mit einem dauerhaft hohen Plasmaspiegel (50 mg/l), einen Rückgang der Amyloidablagerung bei Patienten fest die durchschnittlich einen SAA-Plasmaspiegel < 10 mg/l hatten [Gillmore et al. 2001].

Es wird auch ein Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel der Apolipoproteine und Lipoproteine, wie zum Beispiel HDL, angenommen. Das an HDL gebundene SAA (HDL_{SAA}) wird im Amyloid abgelagert. Auch die Tatsache, dass HDL im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel in der Leber und Milz beteiligt ist und AA Amyloid sehr häufig in diesen Organen zu finden ist, spricht für eine Verbindung zwischen HDL, SAA und AA Amyloid. Immunhistochemisch und per Sequenzanalyse wurde gezeigt, dass Apolipoprotein I (Apo I) und Apolipoprotein E (ApoE) in AA Amyloidablagerungen vorhanden sind. Apo I und II können SAA von den HDL verdrängen. HDL_{SAA} bindet an Makrophagen, und Makrophagen wiederum können in vitro Amyloidfibrillen aus SAA bilden [Kluve-Beckerman et al. 1999, Röcken und Shakespeare 2002].

Bei der AA Amyloidose als konformationelle Erkrankung wird vermutet, dass eine Änderung der Sekundärstruktur des SAA zur Proteinaggregation und somit Amyloidfibrillenbildung führt.

Wenn SAA an „amyloid enhancing factor“ (AEF), Glykosaminoglykane und Basalmembranproteine bindet, kommt es zu einer Konformationsveränderung bis hin zu einer β - Faltblattstruktur, die die Bildung von Amyloid begünstigt [Kisilevsky et al. 1995, Kisilevsky und Fraser 1996].

Das Amyloidfibrillenprotein der AA Amyloidose ist ein proteolytisches Spaltprodukt des Vorläuferproteins SAA, so dass man davon ausgehen kann, dass proteolytische Vorgänge eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Das AA Amyloidfibrillenprotein besteht aus 2/3 des N-terminalen Endes des SAA, und am C-terminalen Ende fehlen zwischen 18 und 83 Aminosäuren. Proteolytische Spaltung am N-

terminalen Ende des SAA könnten Amyloidbildung verhindern und am C-terminalen Ende die Entstehung von AA Amyloid fördern.

Wird die Proteolyse als wichtiger Mechanismus in der Pathogenese der AA Amyloidose angenommen, dann lassen sich verschiedene Hypothesen aufstellen [Röcken und Shakespeare 2002]. Eine pathophysiologisch relevante Proteolyse kann vor, während und nach der Bildung von Amyloid stattfinden. Eine Proteolyse vor der Bildung des Amyloids ist z.B. dann besonders bedeutsam, wenn dadurch aus einem nichtamyloidogenen Vorläuferprotein ein amyloidogenes Peptid freigesetzt wird. Dies gilt z. B. für den Morbus Alzheimer, aber nicht für die AA Amyloidose, da intaktes SAA Amyloid bilden kann [Yamada et al. 1995a].

Eine Proteolyse während oder nach der Bildung von Amyloid kann die Amyloidogenese fördern, verzögern oder den Abbau vorantreiben. Bei der AA Amyloidose findet sich stets ein intaktes N-terminales Ende, so dass eine Proteolyse innerhalb der N-terminalen Hälfte möglicherweise einer Bildung von Amyloid entgegensteht. Eine Proteolyse am C-terminalen Ende könnte ein ohnehin amyloidogenes Protein noch amyloidgener machen. Eine Proteolyse, nachdem Amyloid gebildet worden ist, kann u. U. bedeutungslos sein und nur die Länge des Amyloidproteins geringfügig modifizieren oder aber den Abbau des Amyloids fördern.

Zurzeit ist ungewiss, ob die Abspaltung des C-terminalen Fragments des SAA vor oder nach der Amyloidbildung erfolgt. Auch welche Proteasen und unter welchen Voraussetzungen die Proteolyse stattfindet, ist nicht geklärt.

G. Merlini und V. Bellotti vermuten drei Mechanismen, die zur Konformationsänderung der Proteine führen: Ein Protein neigt selbst mit fortschreitendem Alter und dauerhafter Erhöhung im Serum zur pathologischen Konformation oder es erfolgt ein Aminosäureaustausch in dem Protein oder ein proteolytischer Prozess des Vorläuferproteins führt zur Amyloidablagerung [Merlini und Bellotti 2003].

1.3.2 Diagnostik

Die Diagnose „Amyloid“ bzw. AA Amyloidose kann histologisch und immunhistochemisch gesichert werden. Die Klassifikation des Amyloidproteins und der Verdacht durch entsprechende Vorerkrankung oder positive Familienanamnese sollten die weitere Diagnostik bestimmen. Nach der Basisdiagnostik (Anamnese inklusive Familienanamnese, körperlichen Untersuchung, entsprechenden Blutuntersuchungen, EKG, Röntgenthorax) erfolgt die spezifische Diagnostik, im Falle der AA Amyloidose die 24 Stunden Urinanalyse. Die organbezogene Diagnostik beinhaltet Echokardiographie, Untersuchung zur Orthostase und Abdomensonographie. Eine spezielle Diagnostik wäre die Molekulargenetik.

Amyloid kann an jedem amyloidhaltigen Gewebe diagnostiziert werden. Hierzu werden Gewebeproben wie, z. B. die Fettaspirationsbiopsie (FAB), Biopsien aus der Mundhöhle und dem Gastrointestinaltrakt, Suralnervbiopsien, Muskelbiopsien, Rektumbiopsien, Biopsien aus dem Herzen und parenchymatösen Organen, wie Niere, Leber, Milz und Lunge gewonnen [Röcken et al. 1996, Röcken et al. 2006a].

In diesen Biopsien wird mit der alkalischen-alkoholischen Kongorotfärbung und der anschließenden Beurteilung der Gewebeschnitte unter dem Polarisationsmikroskop zwischen gekreuzten Polaren das Amyloid nachgewiesen. Alternativ können die kongogefärbten Schnittpräparate auch im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Amyloid zeigt sich hier in einer gelb-orangen Fluoreszenzfarbe [Linke 2000]. Anschließend wird immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen die entsprechenden Amyloidfibrillenproteine die Klassifikation vorgenommen [Puchtler 1985; Röcken 2003].

Weitere Möglichkeiten der Klassifizierung sind die Amyloidproteinextraktion und die Sequenzierung der Primärstruktur und molekularbiologische Verfahren [Röcken und Shakespeare 2002, Röcken et al. 2006a].

Für die Diagnose ist die Anamnese des Patienten von Bedeutung, da aus ihr eventuell Rückschlüsse auf die Grunderkrankung und den entsprechenden Amyloidosetyp gezogen werden können.

Wie auch bei jeder anderen Erkrankung ist eine frühe Diagnose und Therapie, und im Fall der Amyloidosen die Klassifikation, sehr wichtig, um ein Fortschreiten und Folgeschäden der Krankheit zu verhindern.

1.3.3 Therapie

Bei der Behandlung der AA Amyloidose steht die Therapie der ihr zu Grunde liegenden Erkrankung im Vordergrund. Ziel der Therapie ist die Synthesehemmung und Unterdrückung des Amyloidvorläuferproteins SAA [Obici et al. 2005]. Bei den entzündlich-rheumatischen Erkrankungen sind das die DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) wie z.B. Alkylanzien (Chlorambucil und Cyclophosphamid), Methotrexat und TNF- α -Blocker (Infliximab, Etanercept und Adalimumab). Niedrigdosiertes Cortison als zusätzliche Maßnahme kann zur schnellen Reduktion hoher Krankheitsaktivität führen. Bei dem familiären Mittelmeerfieber mit und ohne begleitende AA Amyloidose ist Colchizin die Standardtherapie. Es wurden positive Effekte im Verlauf einer AA Amyloidose bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen unter einer Colchizinthherapie in Kombination mit Sulfasalazinen beschrieben. Aufgrund der zu geringen Datenlage stellt dies keine Therapieoption dar. Obwohl mögliches Therapieversagen und toxische Nebenwirkung bekannt sind, gelten die Alkylanzien heute als Standardtherapie der AA Amyloidose im Rahmen entzündlich-rheumatischer Erkrankungen. Man setzt heute auch im Falle einer terminalen Niereninsuffizienz, ausgelöst durch AA Amyloidose im Rahmen einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung, Dialyseverfahren und Nierentransplantationen ein. Wenn Tuberkulose die Ursache einer AA Amyloidose ist, sollte entsprechend antibiotisch behandelt werden. Es wird eine 5-Jahres-Überlebensrate von 40% bei einer Nierenamyloidose angegeben. Durch intensivierete antiinflammatorische Behandlung und Verbesserung der Therapie der Grunderkrankungen

erwartet man bessere Überlebensraten in der Zukunft [Röcken et al. 2006a].

1.4 AL Amyloidose

Die AL Amyloidose wird auch als Amyloid-Leichtketten Amyloidose bezeichnet. Immunglobulin Leichtketten bestehen aus einem variablen N-terminalen und einem konstanten C-terminalen Ende. Bei den Immunglobulin Leichtketten unterscheidet man 2 Subtypen, κ - und λ -Leichtkette [Maniatis 1998]. Das Amyloidprotein besteht überwiegend aus Anteilen der variablen Regionen der beiden Leichtketten. 75% der AL Amyloidosen leiten sich von den λ - Leichtketten ab [Gertz und Rajkumar 2002]. Die AL Amyloidose ist eine der häufigsten systemischen Amyloidosen und tritt lokalisiert und systemisch auf. Bei 80% der Patienten mit AL Amyloidose findet sich eine monoklonale Gammopathie, bei 20% ein Plasmozytom oder Multiples Myelom. Bei 10% der Patienten mit Multiplem Myelom findet sich eine AL Amyloidose [Röcken et al. 2006a]. M. A. Gertz und M. D. Rajkumar teilen die Patienten mit AL Amyloidose in die mit Multiplem Myelom und in die Patienten ohne Multiples Myelom ein. Diese Einteilung richtet sich nach dem Anteil der Plasmazellen im Knochenmark, nach Vorhandensein von osteolytischen Herden und ob eine renale Insuffizienz vorliegt oder nicht [Gertz und Rajkumar 2002]. Tritt die AL Amyloidose ohne eine ihr zu Grunde liegende Erkrankung auf, spricht man von einer primären AL Amyloidose [Saeger und Röcken 1998]. Eine Untersuchung von M. A. Gertz und Kollegen ergab eine Inzidenz von 8 pro 1 Million/Jahr und ein Durchschnittsalter von 62 Jahren [Gertz et al. 2002]. Bei der Auswertung von Studien berichten C. Röcken und Kollegen in den „Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der extrazerebralen Amyloidosen“ über eine Inzidenz von 5-13 Personen pro Million im Jahr in der nordamerikanischen Bevölkerung [Röcken et al. 2006a].

Die lokalisierten, organlimitierten AL Amyloidablagerungen findet man z.B. in der Lunge, im Augenlid, in der Haut, in der Urethra und in der Cervix uteri. Oft liegen diese Amyloidablagerungen in einer tumorartigen

Form vor und werden mit der Diagnose Neoplasie chirurgisch entfernt [Saeger und Röcken 1998, Olsen et al.1999]. Folgende Gewebe und Organe sind bei der systemischen, generalisierten AL Amyloidose betroffen: Submucosa des Darms, periphere Nerven, Skelettmuskulatur, Zunge, Schilddrüse, Herz, Niere, Lunge, Pankreas, Leber und Milz. Durch den Befall dieser Organe treten am häufigsten das nephrotische Syndrom mit und ohne Niereninsuffizienz, die Hepatomegalie mit möglicher Leberfunktionsstörung, Aszites, Kachexie bis zum Leberversagen, die restriktive Kardiomyopathie, die Herzinsuffizienz, das Karpaltunnelsyndrom, die orthostatische Hypotension und die periphere Neuropathie auf. Bei Beteiligung des Gastrointestinaltraktes kann es zu abdominellen Beschwerden, Diarrhoe, Völlegefühl und zu Gewichtsverlust kommen. Eine Beteiligung der Zunge (Makroglossie) ist für die AL Amyloidose pathognomonisch [Strege et al.1998, Gertz und Rajkumar 2002, Röcken et al. 2006a].

Eine idiopathische oder generalisierte AL Amyloidose besitzt stets eine schlechte Prognose. Es wird eine mittlere Überlebenszeit von 12-15 Monaten nach Diagnosestellung angegeben [Saeger und Röcken 1998].

1.4.1 Pathogenese

Allen AL Amyloidosen liegt zugrunde, dass es nach Expansion eines Plasmazellklons im Knochenmark zur Bildung von monoklonalen Leichtketten oder Leichtkettenfragmenten kommt, die sich unter bestimmten Bedingungen im Interstitium verschiedener Organe in Fibrillen anordnen und dann als extrazelluläres Amyloid zu Störungen der Organfunktion führen [Röcken et al. 2006a].

Untersuchungen zeigen, dass die Amyloidfibrillenproteine aller bis heute bekannten AL Amyloidosesubtypen Teile des N-terminalen Endes der Immunglobulin Leichtketten aufweisen. Die Entstehung von AL Amyloid scheint ein multifaktorieller Prozess zu sein, wobei die Eigenschaften des Proteins (Primärstruktur und Konzentration), der Einfluss anderer Substanzen (Apolipoproteine, Glykosaminoglykane und Amyloid P-

Komponente) und Umweltbedingungen (pH Wert) eine Rolle spielen [Olsen et al.1999].

Es wird angenommen, dass eine konformationelle Änderung, eine Proteolyse oder eine Glykosilierung des Vorläuferproteins an der Pathogenese der AL Amyloidose beteiligt sind [Bellotti und Merlini 1996a].

M. A. Gertz und Kollegen nehmen an, dass eine bestimmte Primärstruktur der Immunglobulin Leichtketten, bei Patienten, die an AL Amyloidose erkranken werden, für die Bildung von AL Amyloid verantwortlich ist [Gertz und Rajkumar 2002].

Es wurden Immunglobulin Leichtketten aus dem Urin von Patienten mit AL Amyloidose extrahiert und in Mäuse injiziert. Diese Mäuse entwickelten AL Amyloid. Unter Verwendung von Immunglobulin Leichtketten von Patienten mit multiplem Myelom bildete sich kein AL Amyloid [Solomon et al.1992]. Somit ist es denkbar, dass diese „amyloidogenen Immunglobulin Leichtketten“ durch Veränderungen in der Primärstruktur mehr dazu neigen, ihre Konformation zu ändern und die für das Amyloidfibrillenprotein typische β - Faltblattstruktur annehmen [Gertz und Rajkumar 2002]. In vitro konnten AL Amyloidfibrillenproteine nach Verdauung von gereinigten monoklonalen Leichtketten durch Pepsin nachgewiesen werden. Bei der AL Amyloidose ist das Verhältnis zwischen κ und λ Leichtketten 1:3, womit man annehmen könnte, dass λ Leichtketten eher geneigt sind, eine β - Faltblattstruktur einzugehen [Gertz et al. 2002].

Der λ VI Leichtkettensubtyp scheint auf jeden Fall mit der AL Amyloidose assoziiert zu sein, durch einen Austausch von Aminosäuren kommt es zu Strukturveränderungen des Proteins und somit entsteht das „amyloidogene“ Potenzial [Bellotti und Merlini 1996a und 1996b].

Da alle AL Amyloidfibrillenproteine aus Teilen der N-terminalen variablen Region und Teilen der konstanten Region der Immunglobulin Leichtketten bestehen, nehmen auch Bellotti und Kollegen an, dass die Proteolyse eine wichtige Rolle bei der Bildung von AL Amyloid spielt. Es wird noch diskutiert, ob die proteolytische Spaltung vor oder nach der Ablagerung stattfindet. Bellotti und Kollegen beschreiben einen

proteolytischen Vorgang bei globulären Proteinen, der dazu führt, dass sich ihre Sekundär- und Tertiärstruktur so ändert, dass sich ein Schutz vor weiterer Spaltung verringert und es zur Fibrillenbildung kommt. Dieses Phänomen konnte bisher bei dem β_2 Mikroglobulin und anderen amyloidogenen Proteinen gezeigt werden, aber nicht im Fall der AL Amyloidose. Die Bildung von AL Amyloidfibrillenproteinen ist wahrscheinlich auf eine Konformationsänderung der Immunglobulin Leichtketten zurückzuführen. Dadurch werden diese Leichtketten anfälliger für die proteolytische Spaltung als ihre nichtpathogenen Korrelate, und es kommt zur Amyloidentstehung, wobei diese neue Konformation die Proteine vor einer vollständigen Hydrolyse schützt [Bellotti et al. 2000].

1.4.2 Diagnostik

Wie auch bei der AA Amyloidose wird die AL Amyloidose histologisch im Biopsiematerial des betroffenen Organs gesichert. Auch hier werden die Kongorotfärbung und die immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Bei den folgenden diagnostischen Kriterien sollte man unbedingt eine Organbeteiligung ausschließen [Röcken et al. 2006a]: Eine Proteinurie $> 500\text{mg/Tag}$, hauptsächlich aus Albumin bestehend, und ein Serumkreatinin von $> 2\text{mg/dl}$, in Abwesenheit einer anderen Nierenerkrankung, deuten auf eine Nierenbeteiligung hin, wenn AL Amyloid bereits in anderen Organen nachgewiesen wurde. Eine Hepatomegalie ohne Herzinsuffizienz u./o. eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase auf mehr als das 1,5- fache sollten an eine AL Amyloidose der Leber denken lassen. Bei Diarrhoen u./o. Gewichtsverlust $> 10\%$ des Körpergewichts könnte eine gastrointestinale Beteiligung vorliegen.

Um den Verdacht zu erhärten, führt man eine Immunfixationselektrophorese im Serum und 24- Stunden- Sammelurin durch. Beim Nachweis von freien monoklonalen Immunglobulin Leichtketten im Serum oder Urin wird die Verdachtsdiagnose histologisch an subkutanen Fettgewebsproben und

Knochenmarksstanzen bestätigt. Fast 99% der Patienten mit AL Amyloidose weisen monoklonale Immunglobulin Leichtketten im Serum oder Urin oder Plasmazellklone im Knochenmark auf [Gertz und Rajkumar 2002]. Als letzte Möglichkeit wird aus dem betroffenen Organ direkt eine Gewebeprobe entnommen und histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Wenn bei einem Patienten eine AL Amyloidose diagnostiziert wurde und er kein Multiples Myelom hat, beträgt die Wahrscheinlichkeit an einem solchen zu erkranken 1: 250 [Gertz und Rajkumar 2002]. Man sollte bei einer histomorphologisch nachgewiesenen AL Amyloidose eine myeloproliferative Erkrankung ausschließen. Beispielsweise kann eine AL Amyloidose der klinischen Manifestation eines Multiplen Myeloms zeitlich voranschreiten [Saeger und Röcken 1998].

Eine der Haupttodesursachen bei Patienten mit AL Amyloidose ist kardialer Genese (progressive Kardiomyopathie mit Herzversagen, plötzlicher Herztod durch ventrikuläre Arrhythmien). Deshalb ist es wichtig, bei der Diagnostik der AL Amyloidose eine Dopplerechokardiographie durchzuführen, um prognostische Einschätzungen vorzunehmen und entsprechend die Therapiemöglichkeiten individuell anzupassen [Gertz und Rajkumar 2002, Thierry et al. 2004].

Um das gesamte Ausmaß einer systemischen Amyloidose zu erfassen, sollte immer interdisziplinär gearbeitet werden, um eine optimale Therapie festlegen zu können [Röcken et al. 2006a].

1.4.3 Therapie

Die Therapiestrategien der AL Amyloidose sind unterschiedlich und abhängig von Lokalisation und Ausmaß der Erkrankung.

Im Vordergrund der Behandlung der generalisierten AL Amyloidose steht die Chemotherapie zur Remissionsinduktion der Plasmazellerkrankung. Man sollte Alter und Allgemeinzustand des Patienten, Grund- und Nebendiagnosen sowie das Ausmaß der Organbeteiligung in die Therapieplanung mit einbeziehen.

Nach heutigem Stand stehen zur Initialtherapie standarddosierte Chemotherapieschemata und die Hochdosischemotherapie mit Melphalan und autologer Stammzelltransplantation als Möglichkeit zur Verfügung. Es werden verschiedene Kombinationen an Zytostatika und Cortikoiden eingesetzt [Röcken et al. 2006a]: Melphalan/Prednisolon (MP), Melphalan/Dexamethason (M-Dex), Vincristin, Adriamycin, Dexamethason (VAD) und Dexamethason (Dex). Die andere Therapieoption ist die Hochdosis- Chemotherapie mit Melphalan (HDM) und autologe Stammzelltransplantation (ASCT). In Studien wurde eine gute Wirksamkeit dieser Therapiestrategie, durch ein signifikant längeres Überleben der Patienten mit hämatologischem Ansprechen (Normalisierung der Zellzusammensetzung des Knochenmarks) gezeigt. Auch ein Rückgang der Leichtketten im Serum und Urin wurde beobachtet [Comenzo et al. 1996 und 1998, Comenzo und Gertz 2002, Röcken et al. 2006a]. Zurzeit laufen Studien zur Behandlung mit Bortezomib. Dieser Proteasomeninhibitor beeinflusst die Plasmazellerkrankung [Röcken et al. 2006a]. Bei der AL Amyloidose ist die Behandlung mit Colchizin obsolet [Kyle et al. 1997].

Die organlimitierte (lokale) AL Amyloidose wird chirurgisch mittels Exzision oder Lasertherapie therapiert. Die lokale AL Amyloidose neigt zu Rezidiven, hat aber generell eine gute Prognose.

Als letzte Möglichkeit in Abhängigkeit von Alter und Allgemeinzustand des Patienten kommt die Organtransplantation in Frage. M. A. Gertz und S. V. Rajkumar berichten über eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50% nach einer Herztransplantation bei Patienten mit AL Amyloidose [Gertz und Rajkumar 2002].

Das mediane Überleben der Patienten mit systemischer, generalisierter AL Amyloidose liegt ohne Therapie bei 13 Monaten. Bei führendem kardialen Befall sind es weniger als 9 Monate. Das Überleben nach oben genannter Therapie hängt von der Remission der Plasmazellerkrankung ab [Comenzo et al. 1998, Röcken et al. 2006a].

1.5 Cysteinproteasen

Proteasen werden auch als Peptidasen bezeichnet, d.h. eiweißspaltende Enzyme. Sie kommen extra- und intrazellulär vor. Proteasen werden nach ihrer Wirkung bzw. ihrem Angriffsort in Endo- und Exopeptidasen unterschieden und nach ihrem Katalysemechanismus in Serin-, Aspartat-, Cystein-, Threonin- und Metalloproteinasen. Exopeptidasen, die Polypeptide an ihren N- bzw. C-terminalen Enden spalten, werden als Amino- oder Carboxypeptidasen bezeichnet. Endopeptidasen spalten Peptidbindungen innerhalb eines Polypeptids. Cathepsin B, H, L und S sind Endopeptidasen und stammen aus der Familie der Papain-ähnlichen lysosomalen Cysteinproteinasen, da ein Cysteinrest im aktiven Zentrum für die katalytische Aktivität verantwortlich ist [Storer und Menard 1994, Kirschke et al. 1995, Rawlings und Barrett 2000]. Die Bezeichnung Cathepsin stammt aus dem Griechischen von kathepsin, was Zerkochen oder Verdauen bedeutet. Nach N. D. Rawlings und A. J. Barrett erfolgt die Einteilung der lysosomalen Cysteinproteasen in verschiedene Clans und 20 verschiedene Familien [Rawlings und Barrett 1994].

Die Cathepsine B, H, L und S haben ihr pH Optimum im sauren Bereich und finden sich z.B. in Lysosomen. Cathepsin B, H und L sind irreversibel inaktiv bei einem pH-Wert über 7. Cathepsin B (Cath B) hat neben der Endopeptidaseaktivität eine Carboxypeptidaseaktivität und Cathepsin H (Cath H) eine Aminopeptidaseaktivität [Barrett und Kirschke 1981, Kirschke et al. 1995].

Endopeptidasen vom Serin-, Cystein- und Metalloproteinasentyp kommen in Bakterien wie auch in höheren Organismen vor [Barrett und Rawlings 1991]. Lysosomale Cysteinproteasen wurden aus Pflanzen, Viren, Bakterien, Tieren und menschlichem Gewebe isoliert [Henskens et al. 1996].

Lysosomale Cysteinproteasen sind vor allem für die Degradation von Proteinen verantwortlich, die von der Zelle aufgenommen werden oder aus anderen Kompartimenten der Zelle stammen. Cysteinproteasen kommen aber auch außerhalb von Lysosomen vor. Makrophagen,

Fibroblasten u.a. Zellen können die Proenzyme sezernieren, die dann erst extrazellulär aktiviert werden. Die extrazelluläre Enzymaktivität wird über den pH-Wert und Enzyminhibitoren kontrolliert [Kirschke et al. 1995]. Neben der Hauptfunktion, der lysosomalen Proteindegradation, sind die Cysteinproteasen an anderen spezifischen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, wie der Prohormon- und Antigenregulation und –präsentation, Atherosklerose, Lungenemphysem, Tumorstadium und –metastasierung. Man vermutet auch eine Beteiligung an der Apoptose [Chapman et al. 1997, Roth et al. 2000, Turk et al. 2000].

1.5.1 Cathepsin B

Cath B kommt ubiquitär bei Säugern in fast allen Organen und Geweben vor. Es wird beispielsweise von Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten und Tumorzellen freigesetzt. Die Cysteinprotease wurde im Zellkern, Zytoplasma, der Plasmamembran und extrazellulär nachgewiesen. Cath B wird als inaktives Proenzym sezerniert, das bei neutralem pH-Wert stabil ist [Kirschke et al. 1995]. Es hat eine breite Substratspezifität und ist an zahlreichen Prozessen, wie extrazellulärer Degradation von Matrixproteinen und intrazellulärem Proteinumsatz, aktiv beteiligt [Berquin und Sloane 1996]. Extrazelluläres Cath B ist an entzündlichen Bronchialerkrankungen und an Knochen- und Gelenkerkrankungen beteiligt [Buttle 1994, Burnett et al. 1995].

1.5.2 Cathepsin H

Cath H ist ebenfalls eine ubiquitär vorkommende lysosomale Protease mit einem breiten Substratspektrum. Sie besitzt eine Endoaminopeptidaseaktivität. Bis jetzt ist noch keine andere Amino-peptidase in Lysosomen identifiziert worden. Cath H ist irreversibel inaktiv bei einem pH-Wert von 7. Das Vorläuferprotein ist unter physiologischen Bedingungen stabil. Cath H ist an Antigenprozessen beteiligt und überexprimiert in Tumorgewebe und

Arthritiden [Kirschke et al. 1976, Hironobu et al. 1992, Kirschke et al. 1995].

1.5.3 Cathepsin L

Die Hauptfunktion des Cathepsin L (Cath L) scheint die Degradation von Proteinen im Lysosomen zu sein, es ist aber auch außerhalb der Zelle als Proenzym aktiv. Die Cysteinprotease wird ebenfalls von Makrophagen, Fibroblasten, und Osteoklasten freigesetzt. Cath L ist aktiv bei einem pH-Wert von 3,0- 6,5 und irreversibel inaktiv bei einem pH-Wert über 7. Das Proenzym ist unter physiologischen Bedingungen stabil. Das Enzym ist an der Aktivierung vom Proplasminogenaktivator, der Spaltung von Matrixproteinen, der Inhibierung von normalen Antigenprozessen und an proliferativen Prozessen beteiligt [Kirschke et al. 1995]. Die Synthese und Sekretion von Cath L wird durch maligne Transformation und Wachstumsfaktoren stimuliert. Cath L-mRNA wird vom Mammakarzinom, Ovar, Kolon, und von der Nebenniere und Blasen tumoren exprimiert [Chauhan 1991, Kirschke et al. 1995].

1.5.4 Cathepsin S

Cathepsin S (Cath S) S ist eine lysosomale Cysteinprotease mit geringer Gewebeverteilung [Kirschke und Wiederanders 1994]. Das Enzym ist bei einem pH-Wert von 7,5 stabil und aktiv. Das Enzym ist vor allem in der Milz, in Alveolarmakrophagen, im Herzen sowie im Ileum, in der Schilddrüse, im Gehirn und im Ovar nachgewiesen worden [Kirschke et al. 1995].

Das Enzym ist ein wichtiger Regulator der Antigen-, MHC-II-Komplex- und CD1-Präsentation [Riese et al. 1996, Honey und Rudensky 2003].

1.5.5 Bedeutung der Cysteinproteasen

Die Beteiligung an Krankheitsprozessen der Cysteinproteasen scheint sich laut Kirschke und Kollegen nach der Aktivierung der Enzyme

außerhalb der Lysosomen, d.h. nach der Sezernierung durch Zellen oder Translokation in andere Zellkompartimente, abzuspielen. Die Sekretion von Vorläuferproteinen der lysosomalen Cysteinproteasen von normalen Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten u. a. ist durch ein Gleichgewicht zwischen aktiven Proteinase und ihren Inhibitoren geregelt. Eine Änderung dieses Gleichgewichts führt dann zur Überexpression von Cysteinproteasen u./o. Verringerung der Synthese der Inhibitoren, und somit zur unkontrollierten Proteolyse. Diese Überproteolyse kann dann zu Entzündungen, Arthritiden, Tumorwachstum, viralen und bakteriellen Infektionen oder neurologischen Erkrankungen führen. Man geht davon aus, dass Cysteinproteasen an der Entstehung von vielen Funktionsstörungen des menschlichen Körpers beteiligt sind [Kirschke et al. 1995, Henskens et al. 1996].

1.6 Ziel der Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Hypothese, dass Proteasen in unterschiedlicher Weise an der Pathologie und Pathogenese der systemischen Amyloidosen beteiligt sind. Da es im Organismus jedoch sehr viele verschiedene Proteasen gibt, von denen aller Voraussicht nach nur einige tatsächlich eine Bedeutung haben, sollte mit den nachfolgend beschriebenen Studien eine Auswahl potenziell bedeutsamer Proteasen getroffen werden.

Für die hier durchgeführten Studien wurden Cathepsine gewählt, weil sie

- 1) in Lysosomen vorliegen und Lysosomen offensichtlich an der Pathologie systemischer Amyloidosen beteiligt sind. Im Mausmodell wurden SAA und AA Amyloidproteine in Lysosomen aktivierter Monozyten immunhistochemisch nachgewiesen. APP und A β , Vorläuferproteine der senilen Demenz vom Alzheimer Typ, akkumulieren in Lysosomen und dadurch entsteht die Ablagerung von Amyloid in Blutgefäßen von Mäusen [Chronopoulos et al. 1994, Frackowiak et al. 2004]. Beta 2 Mikroglobulin als Vorläuferprotein der A β 2M Amyloidose wurde in Lysosomen von Makrophagen nachgewiesen und Amyloidfibrillen wurden ebenfalls intrazellulär gefunden [Garcia-Garcia et al. 1999].
- 2) ubiquitär im Organismus vorkommen und sich deshalb auch bei systemischen, in zahlreichen Organen und Geweben manifestierenden Amyloidosen am Krankheitsprozess beteiligen könnten.
- 3) weil in vorangegangenen Studien bereits andere Proteasegruppen (z. B. Matrixmetalloproteasen) untersucht worden waren. Matrixmetalloproteinasen (MMP) -1, -2 und -3 wurden immunhistochemisch in AA Amyloidablagerungen nachgewiesen. In vitro Degradationsexperimente zeigten, dass MMP-1,-2 und -

3 SAA und AA Amyloidfibrillenproteine spalten können
[Müller et al. 2000, Stix et al. 2001].

Bevor für eine Protease eine pathophysiologische Bedeutung diskutiert und weiter geprüft werden kann, muss zunächst ihre räumliche Beziehung zum Amyloid nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb histologisch und immunhistochemisch untersucht, ob die Cathepsine B, H, L und S in und um AA- und AL Amyloid nachweisbar waren.

2. Material und Methoden

2.1 Autopsiekollektiv

In dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg wurden die in der Arbeit verwendeten Gewebeproben aus einem fortlaufenden Autopsiekollektiv (3277 Fälle) aus den Jahren 1991 bis 2001 ausgewählt. Basierend auf einer Studie von D. Müller und Kollegen wurden die entsprechenden Fälle herausgesucht [Müller et al. 2000]. Auswahlkriterien waren vorbeschriebene generalisierte AA- und AL Amyloidose oder chronisch-entzündliche Erkrankungen, die als Grunderkrankung der AA Amyloidose bekannt sind, wie beispielsweise die Rheumatoide Arthritis und Tuberkulose. Patienten mit einer generalisierten ATTR Amyloidose wurden ausgeschlossen.

Von 18 ausgewählten Sektionsfällen wurden 10 Patienten mit generalisierter AA Amyloidose und 8 Patienten mit AL Amyloidose untersucht (siehe Tab.2). Als Kontrolle dienten Gewebeproben von fünf Patienten mit einer chronischen entzündlichen Erkrankung ohne generalisierte Amyloidose.

Die Klassifikation der Amyloidosen erfolgte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen AA Amyloid, Amyloid P- Komponente, β 2-Mikroglobulin, κ - und λ Leichtketten und Transthyretin.

Es wurden Gewebeproben von der Niere, Milz und Leber ausgewählt. Von den 18 Amyloidosefällen konnten 16 Proben der Niere, 15 der Milz und 18 Proben der Leber untersucht werden. Bei den 5 Kontrollfällen wurden 5 Proben der Niere, 5 der Milz und 4 Proben der Leber für die Untersuchung benutzt.

Die Patienten mit einer AA Amyloidose waren durchschnittlich im Alter von 56,7 Jahren, die mit einer AL Amyloidose durchschnittlich im Alter von 62,8 Jahren verstorben. Im Kontrollkollektiv waren die Patienten durchschnittlich im Alter von 64,8 Jahren verstorben. Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten verhielt sich bei den Patienten mit

einer AA Amyloidose im Verhältnis 3:7, bei denen mit einer AL Amyloidose 5:3 und bei dem Kontrollkollektiv 3:2.

Todesursachen und Grunderkrankungen der verwendeten Fälle sind in Tab. 2 zusammengefasst.

	AA Amyloidose	AL Amyloidose	Kontrollen
Anzahl der Fälle	10	8	5
Grunderkrankungen (n)	Rheumatoide Arthritis (5) Rosai-Dorfmann-Krankheit (1) Plamozytom (1) Terminale Niereninsuffizienz (1) D. m. Typ II, Hypertonie, COPD (1) Primäre AA Amyloidose (1)	Plasmozytom (3) Non Hodgkin Lymphom (1) Primäre AL Amyloidose (3) Diabetes mellitus, KHK (1)	Rheumatoide Arthritis (4) Miliartuberkulose (1)
Todesursache (n)	Lungenembolie (3) Summatives Herzversagen (5) Nierenversagen (1) Akute Appendizitis (1)	Herzversagen (4) Gastrointestinale Blutung (2) Akuter Myokardinfarkt (2)	Akuter Myokardinfarkt, Lungenembolie (1) Herzversagen (2) Septischer Schock (1) Ischämische Kolitis (1)

Tabelle 2: Grunderkrankungen und Todesursachen der verwendeten Fälle

2.2 Material/Reagenzien und Instrumente

2.2.1 Materialien und Reagenzien für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen

Für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Materialien und Reagenzien verwendet: Xylol, Alkohol (100%, 96%, 85%, 75% und 80% unvergällt), dH₂O, Mayer's Hämatoxylin, EDTA 1 mM, pH 8,0 (Sigma, Deisenhofen) und Objektträger Superfrost und Superfrost Plus (Menzel-Gläser).

2.2.2 Verwendete Instrumente

Es wurden folgende Instrumente für die histochemische und immunhistochemische Färbungen benutzt: ein Mikroskop (OLYMPUS, Vanox AHBT 3), ein Mikrotom (Leica), ein Ofen (60° und 37°), eine Mikrowelle, ein Schüttler sowie eine Feinwaage.

2.2.3 Primärantikörper für die Immunhistochemie

2.2.3.1 Primärantikörper für die immunhistochemische Klassifizierung des Amyloids

Die Angaben über die verwendeten Primärantikörper zur immunhistochemischen Klassifizierung der Amyloidproteine sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Antigen (Klon)	Herkunftstier	Bezugsquelle	Verdünnung	Vorbehandlung
Amyloid A (mc1) monoklonal	Maus	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 400	
P Komponente polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 1600	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)
Präalbumin (Transthyreti) polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 600	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)
κ leichte Kette polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 10000	
λ leichte Kette polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 10000	
β2 Mikroglobulin polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, Denmark)	1 : 2000	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.) und in 3%igem H ₂ O ₂ (15 min.)

Tabelle 3: Primärantikörper für immunhistochemische Klassifizierung des Amyloids

2.2.3.2 Primärantikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Cathepsin B, H, L und S

Die Angaben über die verwendeten Primärantikörper zum immunhistochemischen Nachweis der Cathepsine B, H, L und S sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Antigen (Klon)	Herkunftstier	Bezugsquelle	Verdünnung	Vorbehandlung
Cathepsin B (3E1)	Maus	Quartett (Berlin)	1 : 50	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)
Cathepsin H (1D10)	Maus	Quartett (Berlin)	1 : 20	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)
Cathepsin L (N135)	Maus	Quartett (Berlin)	1 : 15	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)
Cathepsin S (N/A)	Maus	Quartett (Berlin)	1 : 15	Mikrowelle 450W in EDTA Puffer (1×12 und 1×8 min.)

Tabelle 4: Primärantikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Cathepsin B, H, L und S

2.2.4 Detektionssysteme für die Immunhistochemie

Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte nach der ABC (Avidin-Biotin Complex)- Methode [Hsu et al. 1981]. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes anti-Maus IgG/anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:200 verwendet (Alexis, Grünberg). Für den immunhistochemischen Nachweis von Amyloid A-, P- Komponente, Präalbumin, Cath B, H, L und S benutzte man für die Markierung dieses Brückenantikörpers den Vectastain ABC-alkalische Phosphatase- KIT in einer Verdünnung von 1:100 (Alexis, Grünberg). Bei der Immunreaktion mit anti- β 2 Mikroglobulin-Antikörper wurde das Ultra Tech HRP Streptavidin– Biotin Universal Detektionssystem (Immunotech, Marseilles, Frankreich) verwendet. Für die κ - und λ Leichtketten wurde der oben genannte Primärantikörper verwendet und dieser nach der ABC-Methode im Färbeautomaten mit dem DAB Basic Detektionssystem (Ventana, Straßburg, Frankreich) eingesetzt.

2.2.5 Eindeckmaterial

Für die Kongorotfärbung wurde Neutralbalsam und für die Immunhistochemische Färbung Glyceringelatine zum Eindecken der Schnitte verwendet.

2.3 Histochemische und Immunhistochemische Färbungen

Mit dem Mikrotom wurden 3 μ m dicke Schnitte von den Paraffinblöcken angefertigt. Von jeder Gewebeprobe wurden 8 bis 10 Serienschnitte angefertigt Für die Kongorotfärbungen wurden Objektträger Superfrost und für die Immunhistochemie Objektträger Superfrost Plus benutzt. Danach trockneten die Paraffinschnitte über Nacht im Ofen bei 60°C.

2.3.1 *Verwendete Färbe- und Pufferlösungen*

2.3.1.1 *Gebrauchslösungen für die Kongorotfärbung*

Für die Kongorotfärbung wurden die Kongogebrauchslösung 1, bestehend aus NaCl, 80% unvergälltem Alkohol und $\frac{1}{100}$ NaOH (1%), und die Kongogebrauchslösung 2, bestehend aus NaCl, 80% unvergälltem Alkohol, dem Kongorotfarbstoff und $\frac{1}{100}$ NaOH (1%), verwendet.

2.3.1.2 *Tris Puffer*

Der Tris Puffer wurde aus folgenden Reagenzien manuell hergestellt: 9 g Tris (FLUKA, Neu-Ulm), 68,5 Tris-HCl und 87,8 g NaCl (Merck, Darmstadt) in 1 l deionisiertem Wasser (dH₂O) im Verhältnis 1:10.

2.3.1.3 *Pufferlösung für die Verdünnung der Primärantikörper*

Diese Pufferlösung setzte sich aus 5 ml RPMI 1640-Nährlösung (GIBCO, Eggenstein), 45 ml dH₂O, 5 ml fetales Rinderserum FCS (GIBCO, Eggenstein), 0,05 g Natriumazid (Sigma, Deisenhofen) zusammen. Der pH-Wert wurde zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

2.3.1.4 *Färbelösung für die Immunhistochemie*

Die Reaktionsprodukte wurden mit Neufuchsin und 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid gefärbt. Die Färbelösung wurde aus 26 ml Stammlösung A [10,5 g 2-Amino-2-methyl-1,3-Propanediol (Merck, Darmstadt) in 500 ml dH₂O] und 71,5 ml Stammlösung B [0,05 M Trispuffer, welcher aus 6,1 g Tris (Merck, Darmstadt), 37 ml 1 N HCl, 12 g NaCl und 0,7 g Tetramisol (FLUKA, Neu-Ulm) besteht] sowie 20 mg Na-Nitrit in 500 µl dH₂O, 200 µl Neufuchsin (5 % in 2 N HCl) und 600 µl Substratlösung hergestellt. Für die Substratlösung wurden 40 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat in 600 µl Dimethylformamid (Laborchemie,

Apolda) gelöst. Die insgesamt ca. 100 ml Färbelösung wurde mit 2 N HCl auf pH 8,7 titriert.

2.3.2 Kongorotfärbung

Für die Kongorotfärbung [Puchtler et al. 1962] wurden die Paraffinschnitte fünf Minuten in Xylol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 85% und in 75%igem Alkohol) je 2 Minuten (min.) rehydriert, in dH₂O gespült, und 2 min. in Mayer's Hämatoxylin gefärbt. Nachdem die Schnitte 5 min. in Leitungswasser gebläut wurden, kamen sie 10 min. in die Kongogebrauchslösung 1 und 10 min. in die Kongogebrauchslösung 2. Die Gebrauchslösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch mit NaOH versetzt. Die Präparate wurden in 80%igem unvergälltem Alkohol 10 Sekunden (sec.) differenziert und in 100%igem Alkohol gespült. Nach zweimaligem Spülen in Xylol wurden die Präparate mit Neutralbalsam eingedeckt.

2.3.3 Immunhistochemie

Die Schnittpräparate wurden in Xylol entparaffiniert (3 x 5 min.), in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2 x 1 min. in 100%igen Alkohol, je 1 min. in 96%igen und 75%igen Alkohol) und in dH₂O gespült. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers, um die weitere Bearbeitung unter der Benutzung der Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode durchzuführen, wurden die Schnitte in einer Mikrowelle bei 450 W, 1 x 12 und 1 x 8 min. in EDTA Puffer vorbehandelt. Nach 10 min. Abkühlung wurden die Schnitte in H₂O und dH₂O gespült. Für den Nachweis von β 2 Mikroglobulin wurde eine zusätzliche Vorbehandlung der Schnittpräparate in 3%igem H₂O₂ für 15 min durchgeführt, und nochmals mit H₂O und dH₂O gespült. Es wurden die in Tabelle 3 und 4 aufgeführten Primärantikörper verwendet. Nach Spülen in Tris-Puffer wurden auf die Schnitte 100-200 μ l der entsprechenden Antikörper-RPMI-Pufferlösung aufgetragen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei

37°C im Brutschrank. Danach wurden die Schnitte in Tris-Puffer 3 x gespült und mit 100-200 µl biotinyliertem anti-Maus IgG/ anti-Kaninchen IgG benetzt. Hier erfolgte die Inkubation für 30 min. (15 min. für die Immunreaktion mit β 2 Mikroglobulin) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach gründlichem Spülen in Tris Puffer erfolgte eine Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit 100-200 µl Vectastain ABC alkalischer Phosphatase-KIT. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde anschließend gründlich in Tris-Puffer ausgespült. Für die alkalische Phosphatase diente Neufuchsin als Chromogen. Die dafür benötigte Färbelösung wurde, wie unter 2.3.1.4 beschrieben, manuell hergestellt und anschließend filtriert. Nach der Herstellung musste die Lösung sofort angewendet werden. Direkt aus dem Tris-Puffer wurden die Schnitte in die Küvette mit der Farblösung gestellt. Die Inkubation dauerte 25 min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach Ablauf der Zeit wurden Sie unter fließendem Leitungswasser gründlich gespült, bis das Wasser sich nicht mehr färbte. Weil die alkalische Phosphatase gast, wurden die Schnitte abgedeckt und im Wasser stehend über Nacht in den Kühlschrank gestellt, um Blasenbildung im eingedeckten Präparat zu vermeiden. Vor dem Eindecken wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und für 1 min. in warmem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckt.

2.3.4 Kontrollen

Als Positiv- und Negativkontrolle wurde ein invasives, duktales Mammakarzinom verwendet. Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper nicht aufgetragen.

2.4 Auswertung

Als Erstes wurde Amyloid am kongorotgefärbten Serienschnitt im Fluoreszenzmikroskop und im Durchlichtmikroskop mit

Polarisationsoptik nachgewiesen und die Lokalisation und Verteilung dokumentiert. Der nächste Schritt war die Auswertung der immunhistochemischen Färbung für Cath B, H, L und S. Dazu wurden die amyloidhaltigen Stellen in den Kongorot gefärbten Serienschnitten mit den immunhistochemisch gefärbten Folgepräparaten in Deckung gebracht. Alle positiv gefärbten Zellen in den 3 Organen Leber, Niere und Milz wurden dokumentiert. Die direkte Nachbarschaft immunreaktiver Zellen zu den Amyloidablagerungen, die Färbung innerhalb der Amyloidablagerung und immunreaktive Zellen ohne räumliche Beziehung zum Amyloid wurden dokumentiert. Die Bezeichnung „direkte Nachbarschaft“ beinhaltet, dass Cathepsin-positive Zellen direkt neben Amyloid oder im Amyloid nachweisbar waren. Die Auswertung beruhte auf den Kriterien Intensität und Quantität der Immunreaktion. Die Farbintensität wurde in 0, +/-, +, ++, +++ angegeben und die Quantität in 0, < 10%, 11- 50%, > 50%, in Bezug auf das gesamte Präparat. Zusätzlich wurden immunreaktive mehrkernige Riesenzellen dokumentiert.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test. Die Berechnung wurde mit dem SPSS Programm für Windows durchgeführt. Als signifikant wurden Ergebnisse betrachtet, für die eine Irrtumswahrscheinlichkeit < 5% besteht ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Kongorotfärbung in AA Amyloidose

3.1.1 Leber

In allen 10 Gewebeproben der Leber konnte AA Amyloid nachgewiesen werden. Dabei wurde in 9 Präparaten in den kleinen bis mittelgroßen Gefäßen der Portalfelder Amyloid gefunden. In einer Gewebeprobe wurde unregelmäßig sinusoidal und vaskulär, außerhalb der Portalfelder, Amyloid nachgewiesen. Vaskulär im Leberparenchym, außerhalb der Portalfelder, fand man in einer der 10 Lebergewebeproben Amyloidablagerungen (siehe Tab.5).

3.1.2 Niere

Es wurde in allen 8 Gewebeproben der Patienten Amyloid nachgewiesen. Bei 7 Patienten konnte glomeruläres, vaskuläres und tubulointerstitielles Amyloid nachgewiesen werden. In einem Fall wurde nur tubulointerstitielles Amyloid gefunden (siehe Tab.5).

3.1.3 Milz

Von 10 Patienten wurde die Milz untersucht, und in allen Gewebeproben Amyloid gefunden. In 8 Fällen konnte Amyloid perifollikulär und in 9 Fällen follikulär nachgewiesen werden. In der roten Pulpa der Milz befand sich Amyloid in allen Fällen vaskulär und perisinusoidal. Bei 9 Patienten mit AA Amyloidose wurde interstitiell Amyloid gefunden (siehe Tab.5).

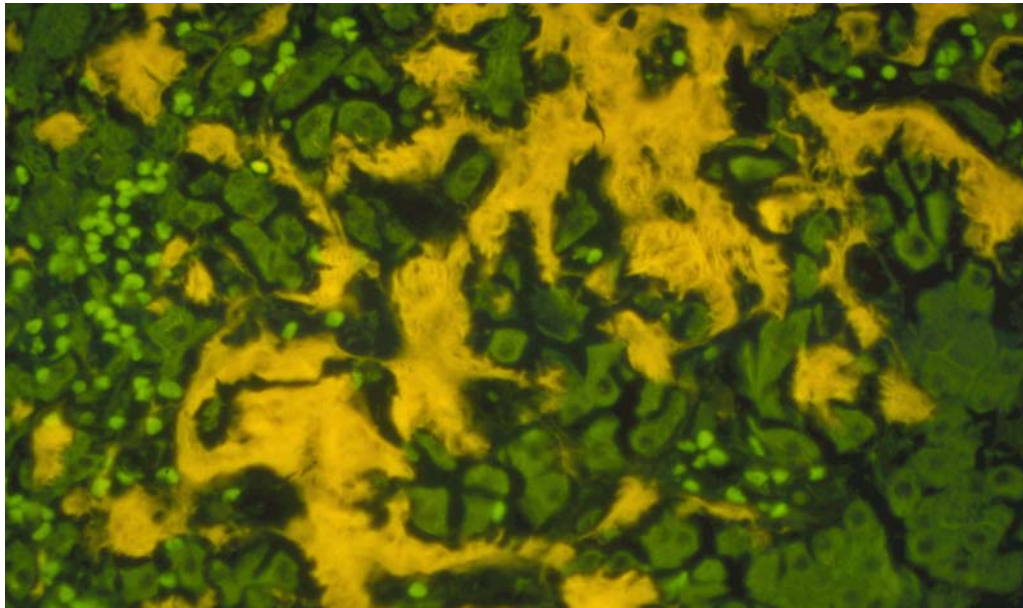


Abb. 1

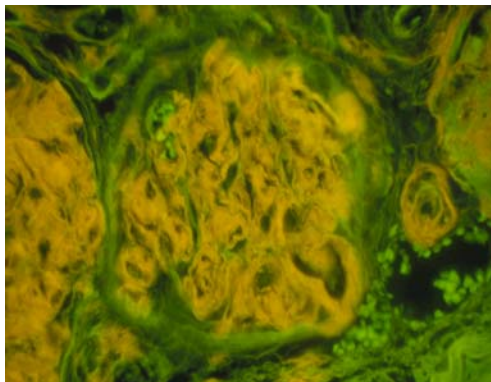


Abb. 2

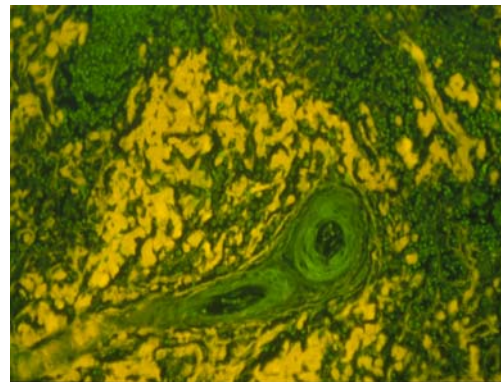


Abb. 3

Abb. 1-3: Kongorotfärbungen (Fluoreszenzmikroskop). Sinusoidales AA Amyloid der Leber, Originalvergr. x400 (Abb.1); Glomeruläres AA Amyloid der Niere, Originalvergr. x400 (Abb.2); folliculäres AA Amyloid der Milz, Originalvergr. x200 (Abb.3)

AA Amyloid												
Pat.Nr.			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leber	Par- enchym	vaskulär	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
		sinusoidal	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Portalfeld	vaskulär interstitiell	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Niere		glomerulär	+	+	+	+	+		+	+		-
		vaskulär	+	+	+	+	+	∅	+	+	∅	-
		tubulointerst	+	+	+	+	+		+	+		+
Milz	weiße Pulpa	parafollikulär	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
		vaskulär	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	rote Pulpa	interstitiell	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		vaskulär	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		perisinusoidal		+	+	+	+	+	+	+	+	+
				+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Nachweis von Amyloid, -: kein Amyloid; ∅ kein Gewebe verfügbar

Tabelle 5: Auswertung der Kongorotfärbung der AA Amyloidosen

3.2 Auswertung der Kongorotfärbung in AL Amyloidose

3.2.1 Leber

In allen 8 Lebergewebeproben wurde Amyloid nachgewiesen, wobei Amyloid in allen Fällen vaskulär in den Portalfeldern gefunden wurde. In 3 Fällen waren weiterhin interstitielle Ablagerungen in den Portalfeldern und außerhalb dieser vaskuläres und sinusoidales Amyloid zu sehen. Zusätzlich sind in einer der Leberproben vaskuläre und unregelmäßige, interstitielle Ablagerungen des Amyloids außerhalb der Portalfelder nachgewiesen worden (siehe Tab.6).

3.2.2 Niere

In allen Nierengewebeproben der 8 Patienten wurde Amyloid nachgewiesen. Im Einzelnen fand man in 6 Fällen vaskuläres und in 4

Fällen glomeruläres Amyloid. Bei 3 Patienten zeigte sich zusätzlich tubulointerstitielles Amyloid (siehe Tab.6).

3.2.3 Milz

Von den 5 Patienten, von denen die Milz untersucht wurde, konnte in 4 Fällen vaskuläres Amyloid in der weißen und roten Pulpa nachgewiesen werden. In einem Fall fand man in der weißen Pulpa zusätzlich perifollikuläre Amyloidablagerungen und in der roten Pulpa interstitielles vaskuläres und perisinusoidales Amyloid (siehe Tab.6).

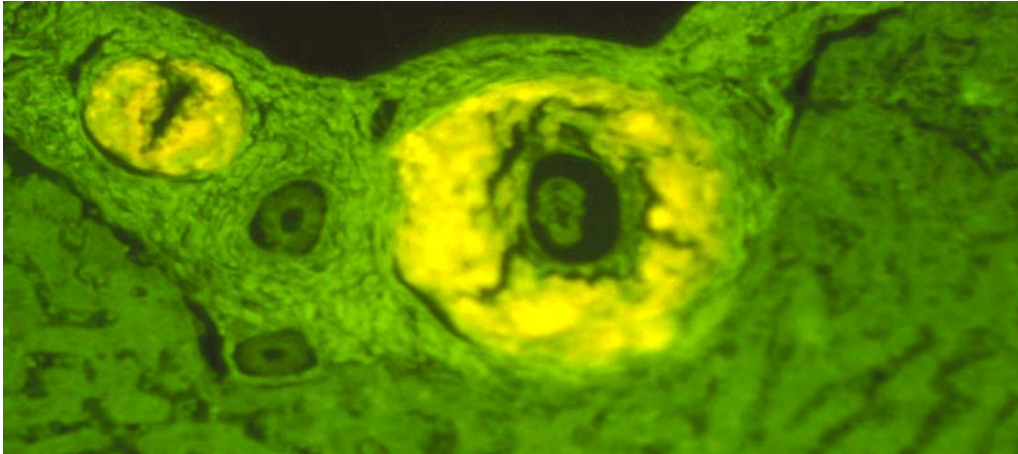


Abb. 4

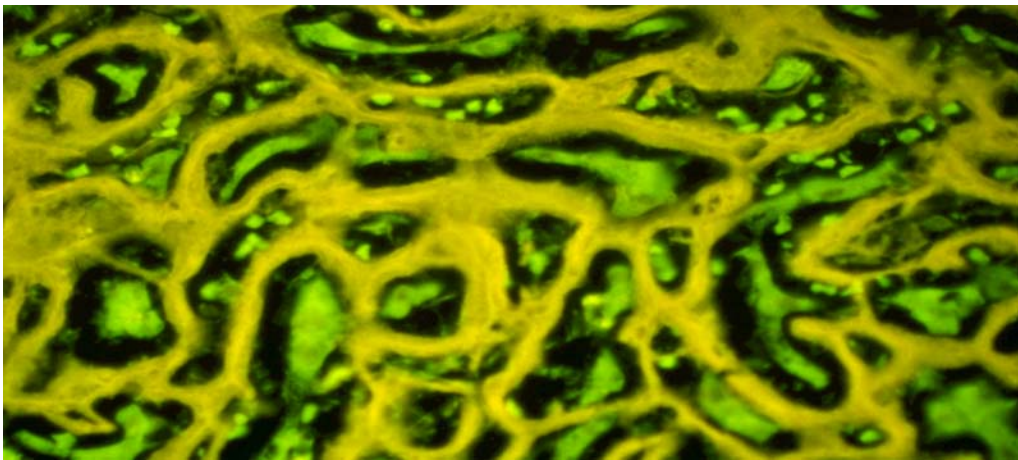


Abb. 5

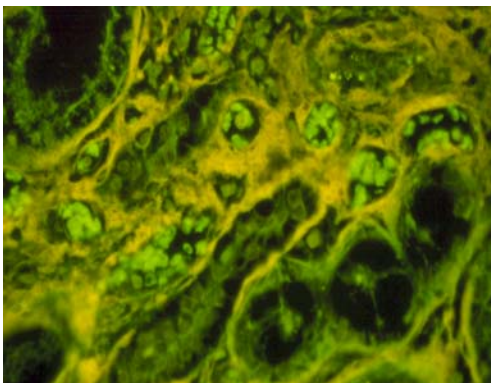


Abb. 6

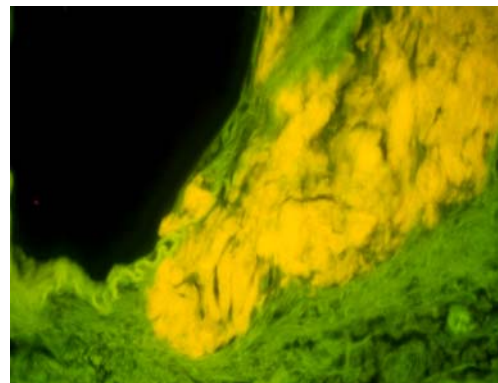


Abb. 7

Abb. 4-7: Kongorotfärbungen (Fluoreszenzmikroskop). Vaskuläres AL Amyloid der Leber, Originalvergr. x400 (Abb.4); sinusoidales AL Amyloid der Leber, Originalvergr. x400 (Abb.5); tubulointerstitielles AL Amyloid der Niere, Originalvergr. x400 (Abb.6); vaskuläres AL Amyloid der Milz, Originalvergr. x400 (Abb.7)

AL Amyloid			1	2	3	4	5	6	7	8
Pat.Nr.										
Leber	Par- enchym	vaskulär	-	+	+	-	-	-	+	+
		sinusoidal	-	-	+	-	-	-	+	+
	Portalfeld	vaskulär	+	+	+	+	+	+	+	+
		interstitiell	-	+	+	-	-	-	+	+
Niere		glomerulär	-	+	+	-	-	-	+	+
		vaskulär	+	-	-	+	+	+	+	+
		tubulointerst	+	-	-	-	-	-	+	+
Milz	rote	parafollikulär	-			-	-	-	+	
	Pulpa	vaskulär	+	∅	∅	+	+	+	+	∅
	weiße	interstitiell	-			-	-	-	+	
	Pulpa	vaskulär	+	∅	∅	+	+	+	+	∅
		perisinusoidal	-			-	-	-	+	

+: Nachweis von Amyloid; -: kein Amyloid; ∅ kein Gewebe verfügbar

Tabelle 6: Auswertung der Kongorotfärbung der AL Amyloidosen

3.3 Auswertung der Kongorotfärbung der Kontrollen

14 Gewebeproben von 5 Patienten dienten als Kontrollen. Die Gewebeproben setzten sich aus Niere (5), Milz (5) und Leber (4) zusammen. In keiner der Organproben konnte in der Kongorotfärbung polarisations- und fluoreszenzmikroskopisch Amyloid nachgewiesen werden.

3.4 Immunhistochemischer Nachweis der Cathepsine B, H, L und S in der Leber, Niere und Milz

3.4.1 Cathepsin B

Cath B wurde immunhistochemisch in allen drei Organen (Leber, Niere, Milz) und bei jedem Patienten (100%) mit AA- und AL Amyloidose sowie bei jedem Kontrollpatienten nachgewiesen. Im Allgemeinen wurde Cath

B in Hepatozyten, Kupfferzellen, Gallengangsepithelien, Gefäßendothelzellen, Myozyten und Fibroblasten der Leber sowie in Nierentubulusepithelien, Gefäßendothelien, Myofibroblasten und tubulointerstitiellen Zellen der Niere gefunden. In der Milz waren Retikuloendothelzellen, Makrophagen, Gefäßmyozyten, folliculäre und periarterielle (Zentralarterie) Zellen Cath B positiv.

Die immunhistochemische Färbung blieb aus, nachdem der monoklonale Primärantikörper durch RPMI- Pufferlösung ersetzt wurde.

3.4.1.1 Nachweis von Cathepsin B in und neben Amyloidablagerungen

In allen untersuchten Fällen mit AA Amyloidose zeigte sich eine direkte räumliche Beziehung der Cath B positiven Zellen zu den Amyloidablagerungen. In der Leber fand man bei 8 (100%), in der Niere bei 10 (100%) und in der Milz bei 10 (100%) Patienten Cath B positive Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Amyloid.

Cath B fand sich extrazellulär in AA Amyloid der Leber bei 4 Patienten (40%) und in der Milz bei 6 Patienten (60%).

Bei den Patienten mit AL Amyloidose grenzten in der Leber in 8 (100%), in der Niere in 5 (63%) und in der Milz in 3 Fällen (60%) immunreaktive Zellen unmittelbar an das Amyloid.

Extrazelluläres Cath B fand sich in AL Amyloid der Leber und Milz bei je einem Patienten (siehe Tab.7).

3.4.1.2 Cathepsin B positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid

Im Einzelnen befanden sich in den 8 Fällen mit AL Amyloidose folgende Cath B positive Zellen direkt neben dem Amyloid oder waren von Amyloid umschlossen: Hepatozyten, Kupfferzellen, Gefäßendothelzellen, mehrkernige Riesenzellen, Fibroblasten und perivaskuläre Zellen der Leber, Tubulusepithelzellen, Gefäßmyozyten, glomeruläre und tubulointerstitielle Zellen der Niere sowie

Gefäßmyozyten, perivaskuläre Bindegewebszellen, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen der Milz.

Bei den Patienten mit AA Amyloidose zeigten sich die gleichen Zellen Cath B positiv und zusätzlich fand man positive Myozyten in der Leber und positive mehrkernige Riesenzellen in der Niere.

3.4.1.3 Zusammenfassung

Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung zusammen. Man kann ihr entnehmen, bei wie vielen Patienten mit AA- und AL Amyloidose sich Cath B positive Zellen in und neben dem Amyloid befanden sowie in wie vielen Fällen Cath B extrazellulär in Amyloid nachgewiesen wurde.

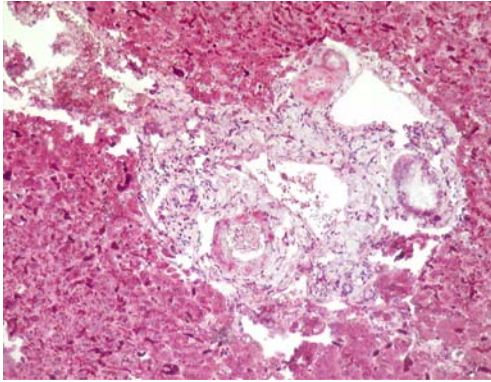


Abb. 8

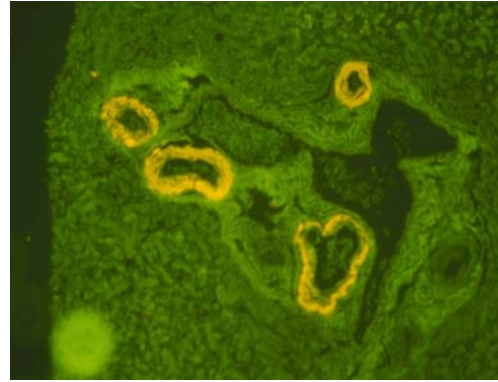


Abb. 9

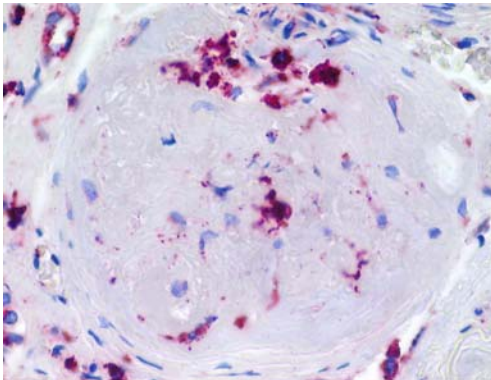


Abb. 10

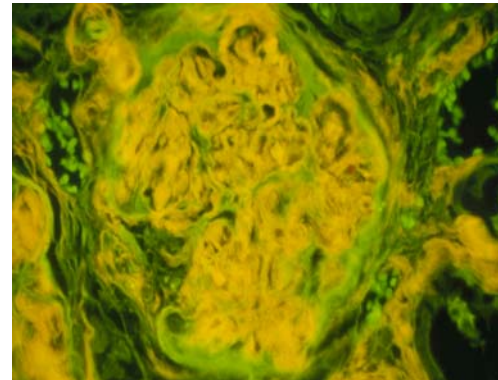


Abb. 11

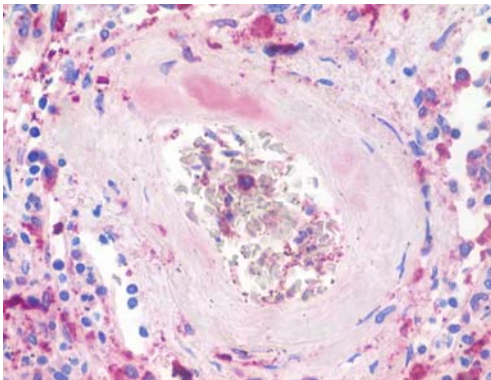


Abb. 12

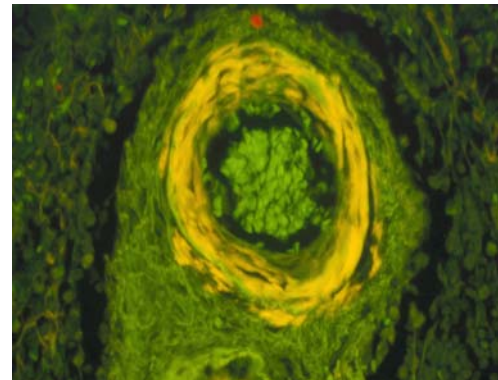


Abb. 13

Abb. 8-13: Cath B positives AA Amyloid Leber, anti-Cath B Antikörper (AK), Hämaun-Gegenfärbung, Originalvergr. x100 (Abb.8); vaskuläres AA Amyloid Leber, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x100 (Abb.9); Cath B positive Zellen neben AA Amyloid Niere, anti-Cath B AK, Hämaun-Gegenfärbung, Originalvergr. x400 (Abb.10); glomeruläres AA Amyloid Niere, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x400 (Abb.11); Cath B positives AA Amyloid Milz, anti-Cath B AK, Hämaun-Gegenfärbung, Originalvergr. x400 (Abb.12); vaskuläres AA Amyloid Milz, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x400 (Abb.13)

	Cathepsin B positive Zellen in und/oder neben Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]	Cathepsin B positives Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]
AA Amyloid		
Niere	8/8	0/8
Leber	10/10	4/10
Milz	10/10	6/10
Summe	28/28	10/28
AL Amyloid		
Niere	5/8	0/8
Leber	8/8	1/8
Milz	3/5	1/5
Summe	16/21	2/21

Tabelle 7: Immunhistologie: Cathepsin B

3.4.1.4 Statistische Auswertung der Immunhistologie

Die statistische Berechnung erbrachte mit Hilfe des χ^2 -Tests einen signifikanten Unterschied bei dem Vergleich von Cath B positivem AA Amyloid und Cath B positivem AL Amyloid, wobei in den Fällen mit AA Amyloidose signifikant mehr Cath B positives Amyloid vorhanden war als in den Fällen mit AL Amyloidose ($p=0,02$). Kein signifikanter Unterschied ergab sich für die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse der Cath B positiven Zellen neben und in dem AA- und AL Amyloid.

3.4.2 Cathepsin H

Cath H wurde mit der immunhistochemischen Färbung in allen drei Organen (Leber, Niere, Milz) und bei jedem Patienten (100%) mit AA- und AL Amyloidose sowie bei jedem Kontrollpatienten nachgewiesen. Cath H fand sich in Hepatozyten, Kupferzellen, Gallengangsepithelien

und Gefäßendothelzellen der Leber sowie in Nierentubulusepithelzellen, tubulointerstitiellen Zellen, Gefäßendothelzellen, glomerulären Zellen, vaskulären und perivaskulären Bindegewebszellen der Niere. In der Milz waren Makrophagen, folliculäre und periarterielle Zellen sowie Zellen in der roten Pulpa Cath H positiv.

Auch hier blieb die immunhistochemische Färbung aus, nachdem der monoklonale Primärantikörper durch RPMI- Pufferlösung ersetzt wurde.

3.4.2.1 Nachweis von Cathepsin H in und neben Amyloidablagerungen

Bei Patienten mit AA Amyloidose wurden Cath H positive Zellen in 23 Gewebeproben (82%) direkt neben Amyloidablagerungen gefunden. Im Einzelnen grenzten in der Leber bei 10 (100%), in der Niere bei 5 (63%) und in der Milz bei 8 (80%) Patienten Cath H positive Zellen unmittelbar an AA Amyloid.

In keinem der Organe (Leber, Niere und Milz) der Patienten mit generalisierter AA Amyloidose konnten Cath H positive Amyloidablagerungen nachgewiesen werden.

Bei den Patienten mit AL Amyloidose grenzten in 14 Gewebeproben (67%) Cath H positive Zellen direkt an AL Amyloid. In der Leber waren in 6 (75%), in der Niere in 6 (75%) und in der Milz in 2 Fällen (40%) immunreaktive Zellen unmittelbar neben dem Amyloid nachweisbar.

Die AL Amyloidablagerungen der Leber, Niere und Milz zeigten sich bei allen Patienten Cath H negativ (siehe Tab.8).

3.4.2.2. Cathepsin H positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid

Direkt neben dem Amyloid oder von Amyloid umschlossen, zeigten sich bei den 10 Patienten mit AA Amyloidose und den 8 mit AL Amyloidose Cath H positive Hepatozyten, Kupfferzellen, Gefäßendothelzellen und Gallengangsepithelzellen der Leber, Tubulusepithelzellen, Gefäßmyozyten, glomeruläre Zellen, tubulointerstitielle Zellen der Niere sowie folliculäre Zellen, perivaskuläre Bindegewebszellen,

Makrophagen, Zellen der roten Pulpa und mehrkernige Riesenzellen der Milz.

3.4.2.3. Zusammenfassung

Die Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung für Cath H. Man kann ihr entnehmen, bei wie vielen Patienten mit AA- und AL Amyloidose sich Cath H positive Zellen in und neben dem Amyloid befanden sowie das Cath H nicht extrazellulär in Amyloid nachgewiesen wurde.

	Cathepsin H positive Zellen in und/oder neben Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]	Cathepsin H positives Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]
AA Amyloid		
Niere	5/8	0/8
Leber	10/10	0/10
Milz	8/10	0/10
Summe	23/28	0/28
AL Amyloid		
Niere	6/8	0/8
Leber	6/8	0/8
Milz	2/5	0/5
Summe	14/21	0/21

Tabelle 8: Immunhistologie: Cathepsin H

3.4.2.4 Statistische Auswertung der Immunhistochemie

Die statistischen Berechnungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Nachweis Cath H positiver Zellen in und

neben AA- und AL Amyloid. Da weder in AA- noch in AL Amyloid Cath H extrazellulär gefunden wurde, besteht auch hier kein Unterschied.

3.4.3 Cathepsin L

In allen drei Organen (Leber, Niere, Milz) wurde mit der immunhistochemischen Färbung Cath L in allen Gewebeproben der Patienten (100%) mit AA- und AL Amyloidose sowie bei jedem Kontrollpatienten nachgewiesen. Man fand Cath L in Hepatozyten, Kupferzellen, Gallengangsepithelien, Gefäßendothelzellen und in Fibroblasten der Leber sowie in Nierentubulusepithelien, tubulointerstitiellen Zellen, Gefäßendothelzellen, glomerulären Zellen der Niere. In der Milz waren sinusoidale Epithelzellen, folliculäre und periarterielle Zellen sowie Zellen in der roten Pulpa Cath L positiv. Nachdem der monoklonale Primärantikörper durch RPMI- Pufferlösung ersetzt wurde, blieb die immunhistochemische Reaktion aus.

3.4.3.1 Nachweis von Cathepsin L in und neben Amyloidablagerungen

In 27 Gewebeproben (96%) der Patienten mit AA Amyloidose zeigten sich Cath L positive Zellen direkt neben Amyloidablagerungen. Im Einzelnen grenzten in der Leber bei 9 (90%), in der Niere bei 8 (100%) und in der Milz bei 10 (100%) Patienten Cath L positive Zellen unmittelbar an AA Amyloid.

In allen drei Organen (Leber, Niere und Milz) der Patienten mit generalisierter AA Amyloidose war der Nachweis von Cath L in extrazellulären Amyloidablagerungen negativ.

Bei den Patienten mit AL Amyloidose grenzten in 18 der Gewebeproben (86%) Cath L positive Zellen direkt an AL Amyloid. In der Leber waren in 8 (100%), in der Niere in 5 (63%) und in der Milz in 5 Fällen (100%) immunreaktive Zellen unmittelbar neben Amyloid nachweisbar.

Bei keinem der Patienten befand sich Cath L direkt in den AL Amyloidablagerungen der Leber, Niere und Milz (siehe Tab.9).

3.4.3.2 Cathepsin L positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid

Im Einzelnen befanden sich bei den 10 Patienten mit AA Amyloidose und den 8 mit AL Amyloidose Hepatozyten, Kupfferzellen, interstitielle Zellen und Gallengangsepithelzellen der Leber, Tubulusepithelzellen, glomeruläre Zellen und tubulointerstitielle Zellen der Niere sowie parafollikuläre und follikuläre Zellen, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen und Zellen der roten Pulpa in der Milz direkt neben Amyloid oder waren von Amyloid umschlossen.

3.4.3.3 Zusammenfassung

Die Tabelle 9 zeigt eine Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung für Cath L. Man kann ihr entnehmen, bei wie vielen Patienten mit AA- und AL Amyloidose sich Cath L positive Zellen in und neben dem Amyloid befanden und dass Cath L nicht extrazellulär in Amyloid nachgewiesen wurde.

	Cathepsin L positive Zellen in und/oder neben Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]	Cathepsin L positives Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]
AA Amyloid		
Niere	8/8	0/8
Leber	9/10	0/10
Milz	10/10	0/10
Summe	27/28	0/28
AL Amyloid		
Niere	5/8	0/8
Leber	8/8	0/8
Milz	5/5	0/5
Summe	18/21	0/21

Tabelle 9: Immunhistologie: Cathepsin L

3.4.3.4 Statistische Auswertung der Immunhistochemie

Der immunhistochemischen Nachweis von Cath L positiven Zellen in AA- und AL Amyloid erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Amyloidformen.

3.4.4 Cathepsin S

Der immunhistochemische Nachweis von Cath S gelang in allen drei Organen (Leber, Niere, Milz) der Patienten (100%) mit AA- und AL Amyloidose sowie der Kontrollpatienten. Es zeigte sich Cath S in Hepatozyten, Kupferzellen, Gallengangsepithelien und in sinusoidalen Epithelzellen der Leber sowie in Nierentubulusepithelzellen, tubulointerstitiellen Zellen und glomerulären Zellen der Niere. Folgende Cath S positiven Zellen fand man in der Milz: sinusoidale Epithelzellen, folliculäre und periarterielle Zellen sowie Zellen in der roten Pulpa.

Eine negative immunhistochemische Reaktion zeigte sich, nachdem der monoklonale Primärantikörper durch RPMI- Pufferlösung ersetzt wurde.

3.4.4.1 Nachweis von Cathepsin S in und neben Amyloidablagerungen

Cath S positive Zellen, in direkter Nachbarschaft zu Amyloidablagerungen, wurden in 23 Gewebeproben (82%) der Patienten mit AA Amyloidose gefunden. Im Einzelnen grenzten in der Leber bei 9 (90%), in der Niere bei 5 (63%) und in der Milz bei 9 (90%) Patienten Cath S positive Zellen unmittelbar an AA Amyloid.

In keinem der drei Organe (Leber, Niere und Milz) der Patienten mit generalisierter AA Amyloidose konnte Cath S positives extrazelluläres Amyloid nachgewiesen werden.

Bei den Patienten mit AL Amyloidose grenzten in 18 der Gewebeproben (86%) Cath S positive Zellen direkt an AL Amyloid. In der Leber waren in 8 (100%), in der Niere in 5 (63%) und in der Milz in 5 Fällen (100%) immunreaktive Zellen unmittelbar neben dem Amyloid nachweisbar.

Extrazelluläres Cath S in AL Amyloid der Niere und Milz fand sich bei keinem der Patienten (siehe Tab.10). In der Leber war bei einem Patienten Amyloid Cath S positiv.

3.4.4.2 Cathepsin S positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu AA- und AL Amyloid

Cath S positiv und direkt neben Amyloid oder von Amyloid umschlossen waren bei den 10 Patienten mit AA Amyloidose und bei den 8 mit AL Amyloidose Hepatozyten, Kupfferzellen, Gallengangsepithelzellen perivaskuläre Zellen, interstitielle Zellen (in AA Amyloid weniger) und sinusoidale Zellen (vor allem im AA Amyloid) der Leber, Tubulusepithelzellen, glomeruläre Zellen, tubulointerstitielle Zellen der Niere sowie parafollikuläre und follikuläre Zellen, mehrkernige Riesenzellen und Zellen der roten Pulpa der Milz.

3.4.4.3 Zusammenfassung

Die Tabelle 10 zeigt eine Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung für Cath S. Man kann ihr entnehmen bei wie vielen Patienten mit AA- und AL Amyloidose sich Cath S positive Zellen in und neben dem Amyloid befinden sowie dass Cath S in einem Fall extrazellulär in Amyloid nachgewiesen wurde.

	Cathepsin S positive Zellen in und/oder neben Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]	Cathepsin S positives Amyloid [Anzahl positiver Fälle/Anzahl untersuchter Fälle]
AA Amyloid		
Niere	5/8	0/8
Leber	9/10	0/10
Milz	9/10	0/10
Summe	23/28	0/28
AL Amyloid		
Niere	5/8	0/8
Leber	8/8	1/8
Milz	3/5	0/5
Summe	16/21	1/21

Tabelle 10: Immunhistologie Cathepsin S

3.4.4.4 Statistische Auswertung der Immunhistochemie

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen AA- und AL Amyloidose in der Immunhistologie für Cath S.

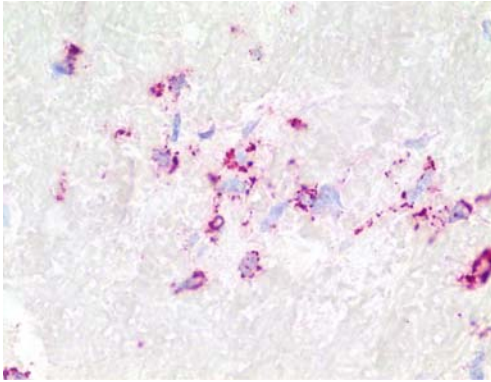


Abb. 14

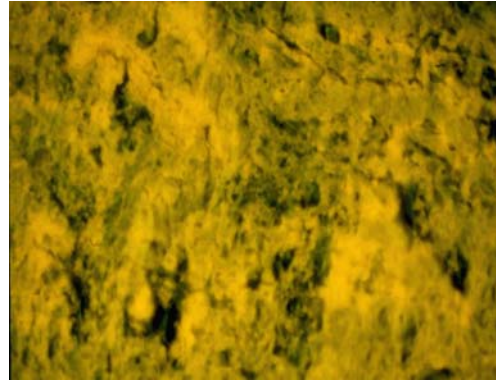


Abb. 15

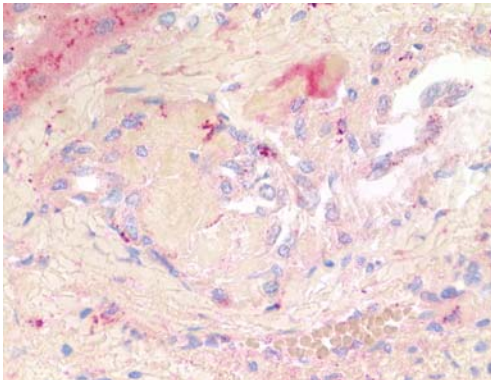


Abb. 16

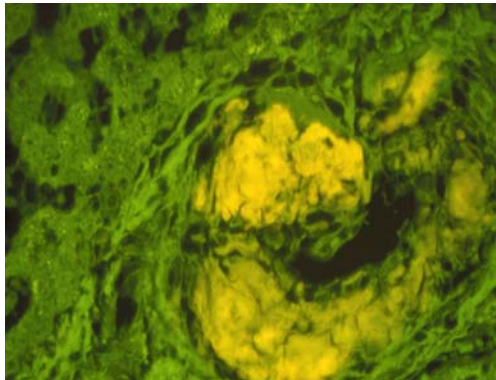


Abb. 17

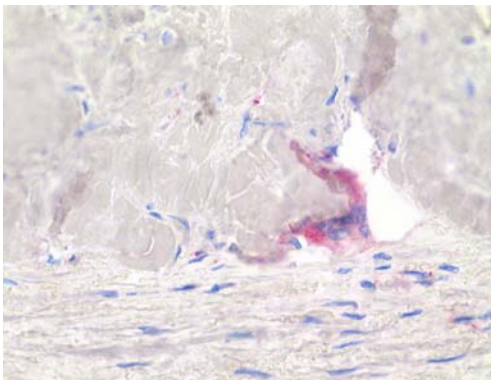


Abb. 18

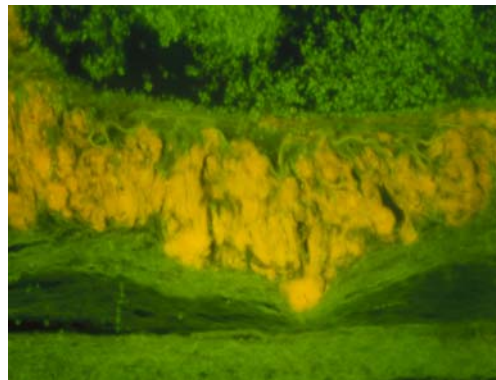


Abb. 19

Abb. 14-19: Cath H positive Zellen neben AL Amyloid Niere, anti-Cath H AK, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergr. x400 (Abb.14); generalisierte AL Amyloidablagerung Niere, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x400 (Abb.15); Cath L positive Zellen neben AA Amyloid Leber, anti-Cath L AK, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergr. x400 (Abb.16); vaskuläres AA Amyloid Leber, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x400 (Abb.17); Cath S positives AL Amyloid Milz, anti-Cath S AK, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergr. x400 (Abb.18); vaskuläres AL Amyloid Milz, Kongorotfärbung (Fluoreszenzmikroskop), Originalvergr. x400 (Abb.19)

3.5 Expression von Cathepsin B, H, L und S in mehrkernigen Riesenzellen

3.5.1 AA Amyloidose

Bei den Patienten mit AA Amyloidose wurden in der Leber, Niere und Milz Cath positive mehrkernige Riesenzellen (MKR) gefunden. Wie aus der Tabelle 9 hervorgeht, exprimierten die MKR am häufigsten Cathepsin B in Leber, Niere und Milz. Am wenigsten zeigten sich Cathepsin H positive MKR.

In den 40 Gewebeproben der Leber befanden sich 4 Organproben mit Cath B-, 1 mit Cath H-, 2 mit Cath L- und 1 mit Cath S positiven MKR.

Von den 32 Nierengewebeproben wurden 3 mit Cath B-, 1 mit Cath L- und 1 mit Cath S positiven MKR gefunden.

Die Riesenzellen waren in den 40 Milzgewebeproben in 5 Organproben Cath B-, in 3 Cath H- und in 2 Cath S positiv.

Mit 40% (in der Leber), 30% (in der Niere) und 50% (in der Milz) exprimieren MKR am häufigsten Cath B.

3.5.2 AL Amyloidose

Bei allen Patienten mit AL Amyloidose wurden am häufigsten Cath L- und S positive MKR in der Leber gefunden. Bei beiden Cathepsinen waren in 38% der Patienten positive MKR nachweisbar.

Von den 32 Lebergewebeproben wurden in 8 Organproben Cathepsin positive MKR gefunden. Im Einzelnen waren in 2 Proben Cath B-, in 3 Cath L- und in 3 Cath S positive MKR nachweisbar (siehe Tab.11).

In der Niere wurden keine MKR gefunden, die Cathepsin B, H, L und S exprimierten.

In den 20 Milzgewebeproben zeigten sich einmal Cath B positive und einmal Cath S positive Riesenzellen.

3.6 Zusammenfassung

3.6.1 *Expression der Cathepsine B, H, L und S in AA- und AL Amyloidose*

In den 18 Sektionfällen, wovon 10 eine generalisierte AA Amyloidose und 8 eine generalisierte AL Amyloidose aufwiesen, konnten in allen 3 untersuchten Organen (Leber, Niere, Milz) Cathepsin B, H, L und S positive Zellen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich in der Lokalisation dieser Zellen in Bezug auf die Amyloidablagerung Unterschiede. Am häufigsten wurden Cath B und L positive Zellen direkt neben und im AA Amyloid gefunden (siehe Tab.11). Die Gewebeproben mit AL Amyloidose zeigten am häufigsten Cath B, L, und S positive Zellen direkt neben und im AL Amyloid (siehe Tab.11). In extrazellulären Amyloidablagerungen wurde Cath B am häufigsten gefunden. Dieses Cath B positive Amyloid konnte man in AA -, und AL Amyloid der Leber und Milz nachweisen.

	Organ	n	AA Amyloidose		AL Amyloidose		
			zellulär neben/im Amyloid n (%)	extrazell. Im Amyloid n (%)	n	zellulär neben/im Amyloid n (%)	extrazell. Im Amyloid n (%)
CathB	Niere	8	8 (100)	0	8	5 (63)	0
	Leber	10	10 (100)	4 (40)	8	8 (100)	1 (13)
	Milz	10	10 (100)	6 (60)	5	3 (60)	1 (20)
	Summe	28	28 (100)	10 (36)	21	16 (76)	2 (10)
*p=0,02							
CathH	Niere	8	5 (63)	0	8	6 (75)	0
	Leber	10	10 (100)	0	8	6 (75)	0
	Milz	10	8 (80)	0	5	2 (40)	0
	Summe	28	23 (82)	0	21	14 (67)	0
CathL	Niere	8	8 (100)	0	8	5 (63)	0
	Leber	10	9 (90)	0	8	8 (100)	0
	Milz	10	10 (100)	0	5	5 (100)	0
	Summe	28	27 (96)	0	21	18 (86)	0
CathS	Niere	8	5 (63)	0	8	5 (63)	0
	Leber	10	9 (90)	0	8	8 (100)	1 (13)
	Milz	10	9 (90)	0	5	5 (100)	0
	Summe	28	23 (82)	0	21	18 (86)	1 (5)

* Vergleich Cath-positiven AL und AA Amyloidablagerungen (χ^2 Test)

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse

3.6.2 Expression der Cathepsine B, H, L und S in mehrkernigen Riesenzellen

Hier zeigten sich in der Leber und Milz am häufigsten Cath B und L positive MKR in den Fällen mit AA- und AL Amyloidose. Cath S und H positive MKR konnten auch nachgewiesen werden. Hierbei wurde Cath

S in beiden Amyloidoseformen und Cath H nur bei den AA Amyloidosefällen in der Leber und der Milz gefunden (siehe Tab.12).

AA Amyloidose		Leber				Niere				Milz			
Patient Nr. / Cathepsin		B	H	L	S	B	H	L	S	B	H	L	S
1		■		■		■		■		■			■
2						■			■	■			
3													
4		■								■	■	■	■
5										■	■		
6						kein Material							
7													
8		■				■							
9						kein Material				■	■		

AL Amyloidose		Leber				Niere				Milz			
Patient Nr. / Cathepsin		B	H	L	S	B	H	L	S	B	H	L	S
1		■		■	■								
2										kein Material			
3										kein Material			
4		■		■	■								
5				■	■								
6										■			■
7													
8										kein Material			

Schwarzes Feld: Nachweis der Protease in MKR;
offenes Feld: keine Immunreaktion

Tabelle 12: Expression der Cathepsine B, H, L und S in mehrkernigen Riesenzellen

4. Diskussion

4.1 AA- und AL Amyloidose

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Hypothese, dass Proteasen in unterschiedlicher Weise an der Pathologie und Pathogenese systemischer Amyloidosen beteiligt sind. Da es im Organismus jedoch sehr viele verschiedene Proteasen gibt, von denen aller Voraussicht nach nur einige tatsächlich eine Bedeutung haben, sollte mit den nachfolgend beschriebenen Studien morphologisch geprüft werden, ob und welchen der hier untersuchten Cathepsinen B, H, L und S potenziell eine Bedeutung zukommen könnte.

4.2 Methode

Hier wurde eine Studie durchgeführt, in der ein morphologischer Nachweis von Cysteinproteasen (Cath B, H, L und S) in Leber-, Niere- und Milzgewebeproben von Patienten mit AA- und AL Amyloidose erfolgte. Da in jeder der 63 Gewebeproben grundsätzlich alle Cathepsine nachweisbar waren, deren zelluläre Verteilung der zu erwartenden Expression der Cysteinproteasen entspricht und die Negativkontrollen sich auch stets negativ verhielten, wird generell von einem spezifischen Nachweis der Cathepsine B, H, L und S ausgegangen. Die Sensitivität des Nachweises kann allerdings durch Autolyse beeinträchtigt worden sein. In anderen Studien, in denen nicht wechselnd stark autolytisches Gewebe verwendet wurde, wurden die Cathepsine ebenfalls in Leber, Niere und Milz nachgewiesen [Mason et al. 1989, Kirschke et al. 1995, Riese et al. 1996, Kirsche et al. 1997], so dass die Autolyse nicht grundsätzlich den Nachweis verhindert hat.

4.3 Morphologischer Nachweis der Cathepsine B, H, L und S

In der vorliegenden Arbeit wurde jede Protease in jedem Organ der Individuen mit und ohne Amyloid nachgewiesen. Es zeigte sich kein

Unterschied zwischen den Patienten mit AA- und AL Amyloidose bezüglich des allgemeinen Vorhandenseins oder Fehlens einer bestimmten Protease. D. h. es war keine der Cysteinproteasen in einem Organ der Fälle mit AA- und AL Amyloidose überexprimiert oder fehlte ganz. Daraus lässt sich schließen, dass die AA- oder AL-Amyloidose nicht durch eine generelle Überexpression oder eine generell fehlende Expression einer bestimmten Cysteinprotease verursacht wird.

4.4 Räumliches Verteilungsmuster der Cysteinproteasen

Demgegenüber konnten aber sehr wohl Unterschiede in der räumlichen Verteilung einzelner Cathepsine in Bezug zum AA- und AL Amyloid nachgewiesen werden.

Cath B fand sich als einzige Cysteinprotease extrazellulär im Amyloid.

Cath B ist beteiligt an der Degradation von extrazellulärer Matrix und Prozessen wie Zellwachstum, maligner Transformation und Entzündung. S. Petanceska und Kollegen wiesen per in situ Hybridisierung nach, dass Cath B im Rattenhirn in der Lage ist extrazelluläre Matrix zu spalten [Petanceska et al. 1994]. Cath B spaltet Matrixproteine extrazellulär. Beispielsweise Fibroblasten und Tumorzellen sezernieren Cath B in den Extrazellulärraum [Wolters und Chapman 2000, Bühling et al. 2004].

Im Vergleich zu Cath H, L und S wurde Cath B am häufigsten zellulär in und neben dem Amyloid nachgewiesen. Bei der Verteilung der übrigen Cathepsin positiven Zellen in und neben Amyloid zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Es wurde in jedem Organ der Amyloidosefälle Cathepsin positive Zellen gefunden.

4.4.1 Vergleich der Immunreaktion direkt im AA- und AL Amyloid

Cath B wurde als einzige Cysteinprotease direkt innerhalb des AA- und AL Amyloids nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Amyloidosen. In den AA

Amyloidosefällen waren 10 Gewebeproben von 28 positiv und in den AL Amyloidosefällen nur 2 von 21 Proben positiv.

Dieser Unterschied kann möglicherweise in den verschiedenen Grunderkrankungen und damit auch den unterschiedlichen Pathomechanismen der beiden Amyloidosen begründet sein. Die AA Amyloidose tritt infolge chronisch entzündlicher Erkrankungen wie RA, M. Crohn und Tuberkulose auf. Im Gegensatz zur AL Amyloidose ist die AA Amyloidose stets mit einer chronisch- rezidivierenden oder persistierenden Akut-Phase-Reaktion vergesellschaftet. Cath B wird verstärkt bei entzündlichen Prozessen exprimiert. In purulenten Sputumproben von Patienten mit Bronchiektasen wurde ein erhöhter Cath B- Spiegel und ein verringerter Cystatin C- Spiegel, ein Cath B Inhibitor, gefunden, so dass man von einer positiven Korrelation der Cath B Aktivität und dem Maß einer Entzündung ausgeht [Buttle et al. 1990]. Eine erhöhte Aktivität von Cath B und Cath D konnte im Gewebe mit experimentell induzierter granulomatöser Entzündung der Lunge in Ratten nachgewiesen werden [Lesser et al. 1989]. G. Keyszer und Kollegen untersuchten immunhistochemisch und mit Hilfe von PCR unter anderem die Expression von Cath B in RA und in Osteoarthritis (OA) und zeigten, dass Cath B in RA im Vergleich zu OA mehr exprimiert wird [Keyszer et al. 1998]. In Gelenkflüssigkeiten von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie RA, seronegativer Spondylarthritis, OA, undifferenzierter Arthritis und Gicht wurden Cath B und Cystatin C per ELISA nachgewiesen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression bei Patienten mit RA. In einer anderen Studie [Hashimoto et al. 2001] hatte Cath B eine 19-fach höhere Aktivität in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit RA im Vergleich zu Patienten mit OA. Zusätzlich spaltete Cath B in der Synovia Kollagen und die Spaltung war in Anwesenheit eines Inhibitors herabgesetzt, so dass vermutet wird, dass Cath B bei der RA an der Gelenkdestruktion beteiligt ist. J. S. Mort und Kollegen wiesen eine extrazelluläre Aktivität von Cath B in rheumatoider Synovia nach [Mort et al. 1984]. Im Rattenmodell konnte eine Hochregulation von Cysteinproteasen in rheumatisch-entzündlichen Fußgelenken beobachtet werden [Biroc et al. 2001].

Aufgrund dieser Studien könnte man vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von Cath B in RA und den Nachweis von Cath B in AA Amyloid gibt, da RA als entzündlich-rheumatische Erkrankung eine der häufigsten Grunderkrankungen der AA Amyloidose ist.

Es wird deutlich, dass die Expression von Cath B im Rahmen von Entzündungsreaktionen hoch reguliert wird, es, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in räumlicher Beziehung zu AA Amyloid steht und in der Lage ist SAA und AA Amyloidproteine zu spalten. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass Cath B eine potenzielle Bedeutung in der Pathogenese der AA Amyloidose aufweist. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu prüfen, wie Cath B in den Stoffwechsel der AA Amyloidose eingreift, ob es intrazellulär oder extrazellulär die Amyloidbildung begünstigt oder verhindern kann. Auf diese Untersuchungen wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

4.5 Biologische Bedeutung proteolytischer Prozesse in der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose

Man geht davon aus, dass eine intrazelluläre Proteolyse des Vorläuferproteins oder eine Proteolyse nach der Sekretion aus der Zelle oder eine Proteolyse nach der Amyloidablagerung stattfindet [Bellotti und Merlini 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cath B, H, L, und S neben AA- und AL Amyloid nachweisbar waren. Cath B wurde extrazellulär direkt in den Amyloidablagerungen gefunden. D. h. diese räumliche Beziehung stützt die Annahme, dass diese Proteasen im „Amyloid-Stoffwechsel“ eine Funktion haben könnten. Aufgrund dieser Arbeit wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. S. Bohne und Kollegen konnten an Hand von in vitro Degradationsversuchen zeigen, dass die lysosomalen Cysteinproteasen Cath B, K und L intaktes natives AL Amyloid und AL Amyloidproteine abbauen können und lieferten einen weiteren Beweis dafür, dass Cysteinproteasen

möglicherweise an der Pathologie der AL Amyloidosen beteiligt sind, und Amyloid nicht proteaseresistent ist. Trotz des Beweises, dass Cathepsine AL Amyloid in vitro degradieren können, fehlte bis dahin der in vivo geführte Beweis. Man ging davon aus, dass die Instabilität der Cysteinproteasen unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert) für den Abbau von Amyloid limitierend sein könnte [Bohne et al. 2004].

C. Röcken und Kollegen führten Degradationsexperimente durch und wiesen nach, dass Cath B und Cath L SAA und AA Amyloidproteine spalten. Sie identifizierten die Stellen der Aminosäuresequenz des SAA und AA Amyloids, an denen Cath B und Cath L spalten und ordneten die gebildeten Fragmente z. T. bekannten AA Amyloidproteinen zu. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten auch, dass Cath B vorwiegend eine Carboxypeptidaseaktivität aufweist und dass die C-terminal unterschiedlich langen AA Amyloidproteine z.B. durch den Einfluss von Cath B entstanden sein könnten. Dass die Cysteinproteasen AA Amyloidproteine spalten können, zeigt, dass keine Substrathemmung erfolgt, wenn SAA gespalten wird und AA Amyloidproteine entstehen [Röcken et al. 2005].

Auf die Proteolyse von SAA und AA Amyloid haben viele Faktoren Einfluss. Sie ist abhängig von dem Expressionsmuster und der pH-Stabilität der entsprechenden Protease, der Substratkonzentration und der Interaktion mit anderen Komponenten wie z.B. Heparansulfat. Bindet SAA an Heparansulfat, ändert sich die Sekundärstruktur so, dass es zur β -Faltblattstruktur kommt. Heparansulfat wiederum kann Cath B binden und es verringert sich die Exopeptidaseaktivität [Almeida et al. 2001] und damit könnte es dem kompletten Abbau von SAA und AA Amyloidproteinen entgegenwirken.

In weiterführenden Tierexperimenten und in vitro Degradationsversuchen zeigten C. Röcken und Kollegen, dass Cath B, K und L tatsächlich auch in vivo an der Pathologie der AA Amyloidose beteiligt sind. Cath L bildete SAA Spaltprodukte. Cath K zeigte eine endoproteolytische Aktivität und bildete keine AA Amyloid-ähnlichen Peptide, spaltete aber SAA. Cath B hatte keinen Einfluss auf die Menge des abgelagerten Amyloids. Aufgrund der Ergebnisse wird davon

ausgegangen, dass Cath K und Cath L Auswirkungen auf die Menge des abgelagerten Amyloids haben. Cath B beeinflusst nicht die Menge, sondern möglicherweise nur die Größe des Amyloidproteins [Röcken et al. 2006b].

Degradationsversuche von K. Migita und Kollegen haben ebenfalls gezeigt, dass die Proteolyse ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese der Amyloidose ist. Es wurde eine Monozyten-vermittelte Proteolyse des Vorläuferproteins der AA Amyloidose SAA in vitro gezeigt. Die Aktivierung dieser Monozyten durch IL-1 β und IFN- γ behinderte die Proteolyse des SAA so, dass es zu einem unvollständigen Abbau kam. Solche Mechanismen könnten eine Rolle spielen in der AA Amyloidbildung oder im Abbau von AA Amyloidproteinen [Migita et al. 2001]

Einen weiteren Beweis, dass die Proteolyse eine bedeutende Rolle im amyloidogenen Stoffwechsel spielt und es von Bedeutung ist, wo sie stattfindet, liefern T. Yamada und Kollegen. Sie zeigten, dass Cath D, eine lysosomale Aspartatprotease, in der Lage ist, SAA in vitro am amyloidogenen Abschnitt des N-terminalen Endes zu spalten und so die Amyloidentstehung verhindert [Yamada et al. 1995b]. Weiterführende Experimente im Mausmodell zeigten, dass nach Einsatz eines Aspartatproteaseinhibitors (Pepstatin) eine beschleunigte Amyloidbildung stattfand [Yamada et al. 1996], was die Hypothese, dass proteolytische Spaltungen am N-terminalen Ende der Amyloidbildung entgegenwirken, unterstützt.

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Betrachtung der Amyloidentstehung und des Mitwirkens der Cysteinproteasen im amyloidogenen Stoffwechsel ist der Ort des Geschehens. Bei der Bildung und Ablagerung von Amyloid kommt es zu einem Umbau der extrazellulären Matrix, an dem sich ebenfalls Cysteinproteasen beteiligen könnten. H. A. Chapman und Kollegen beschreiben ein Mitwirken der Cysteinproteasen am extrazellulären Matrixumbau [Chapman et al. 1997]. Cath B, H, und L wurden in Makrophagen nachgewiesen und diese sind in der Lage, Cysteinproteasen (Cath B, L, und S) zu synthetisieren und in den

Extrazellulärraum zu sezernieren, wo sie am Matrixumbau aktiv beteiligt sind [Reddy et al. 1995, Bühling et al. 2002].

D. Müller und Kollegen wiesen die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) -1, -2 und -3 immunhistochemisch in AA Amyloid nach und später zeigten weiterführende Untersuchungen, dass sie in der Lage sind, SAA und Amyloidfibrillenproteine (AFP) zu spalten [Müller et al. 2000, Stix et al. 2001]. MMPs spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der extrazellulären Matrix und haben ihr pH-Optimum im neutralen Bereich. Was ein Beweis sein könnte, dass MMPs SAA und AA Amyloidfibrillenproteine extrazellulär spalten.

Eine proteolytische Spaltung kann auch intrazellulär in Makrophagen, höchstwahrscheinlich endosomal oder lysosomal, stattfinden [Kluve-Beckermann et al. 2002]. Makrophagen wurden neben Amyloid nachgewiesen und sie synthetisieren ein breites Spektrum an Proteasen. Somit könnte man davon ausgehen, dass sie an der Spaltung des Vorläuferproteins und Degradation von Amyloidablagerungen beteiligt sind. Makrophagen sind beteiligt an der Immunabwehr bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Sarkoidose, Tuberkulose, Morbus Crohn und Rheumatoider Arthritis, welche Beispiele für Grunderkrankungen der AA Amyloidose sind [Bühling et al. 2001, Bohne et al. 2004].

C. Röcken und Kollegen zeigten in einer Studie, dass Cath K exprimierende MKR neben AA und AL Amyloid immunhistochemisch nachweisbar waren. Es wurden Degradationsversuche mit Cath K durchgeführt. Cath K hat AA Amyloidproteine bei einem pH-Wert von 5,5 degradiert und die Spaltung blieb in Gegenwart von Cysteinproteaseinhibitoren aus. Auch kommt es auf die räumliche Beziehung an. Es wird davon ausgegangen, dass MKR eine Rolle spielen, nachdem Amyloid abgelagert wurde, weil es auch viele Patienten in dieser Studie mit Amyloidablagerungen ohne MKR gab. Weil Cath K in diesen Untersuchungen nur mit MKR assoziiert nachweisbar war, könnte man vermuten, dass es nicht direkt an der Bildung von Amyloid beteiligt ist. In anderen Studien zeigte sich

ebenfalls eine räumliche Verbindung zwischen Amyloidabbau und MKR [Wright et al. 1972, Bühling et al. 2001, Röcken et al. 2001].

In dieser Arbeit wurden ebenfalls Cathepsin exprimierende MKR nachgewiesen. Bei der Auswertung zeigte sich, dass Cath B-, L- und S positive MKR in AA- und AL Amyloid gefunden wurden, wobei Cath B und Cath L am häufigsten in diesen Zellen in der Leber und Milz nachgewiesen wurden. Das lässt vermuten, dass diese Cathepsine in Zusammenhang mit MKR am „Amyloidstoffwechsel“ beteiligt sein können.

Der alleinige immunhistochemische Nachweis, dass die Cysteinproteasen Cath B, H, L und S eine räumliche Beziehung zu AA-AL Amyloidablagerungen aufweisen, beweist nicht die Beteiligung an der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose. Wie jedoch aus den oben genannten Studien hervorgeht, ist eine biologische Bedeutung der Proteasen in der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose aufbauend auf den hier vorgestellten morphologischen Untersuchungen anschließend bewiesen worden.

5. Zusammenfassung

Die AA- und AL Amyloidosen zählen in der klinischen Pathologie neben der hereditären und nichthereditären ATTR Amyloidose zu den häufigsten generalisierten, systemischen Amyloidosen [Röcken und Ernst 2006]. Die AA Amyloidose tritt meistens infolge chronischer Entzündungsaktivität auf. D. h. eine Vielfalt an Krankheitsbildern können eine AA Amyloidose als Folgeleiden entwickeln [Röcken et al. 2006a]. Bei der AL Amyloidose kommt es nach Expansion eines Plasmazellklons im Knochenmark zur Bildung von monoklonalen Leichtketten oder Leichtkettenfragmenten, die sich unter bestimmten Bedingungen im Interstitium verschiedener Organe in Fibrillen anordnen und dann als extrazelluläres Amyloid zu Störungen der Organfunktion führen [Röcken et al. 2006a].

Da beide Amyloidproteine Spaltprodukte der Vorläuferproteine sind, ist anzunehmen, dass proteolytische Vorgänge an der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose beteiligt sind. Um einer bestimmten Protease eine Bedeutung an einem pathophysiologischen Prozess zuzusprechen, muss der Nachweis einer räumlichen Beziehung erbracht werden. Ziel dieser Arbeit war die Hypothese zu stützen, dass Cath B, H, L und S an der Pathologie und Pathogenese der AA- und AL Amyloidose beteiligt sind. Es wurde histologisch und immunhistochemisch untersucht, ob diese Cathepsine in und direkt neben AA- und AL Amyloid nachweisbar waren.

Aus einem Autopsiekollektiv (3277) wurden 18 Sektionsfälle herausgesucht, 10 Patienten mit generalisierter AA Amyloidose, 8 mit AL Amyloidose und 5 Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Erkrankung ohne generalisierte Amyloidose. Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten an Gewebeproben von Leber, Milz und Niere.

In allen 18 Sektionsfällen konnten in allen 3 untersuchten Organen Cathepsin B, H, L und S positive Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei Cath B positivem AA Amyloid und Cath B positivem AL Amyloid, wobei in den Fällen mit AA Amyloidose signifikant mehr Cath B positives Amyloid vorhanden war als

in den Fällen mit AL Amyloidose. Was den direkten Nachweis von Cath B im Amyloid angeht, scheint die Protease unterschiedlich exprimiert zu werden. Grund dafür könnten die verschiedenen Vorläuferproteine und Grunderkrankungen sein.

In dieser Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass Cath B direkt im Amyloid und Cath H, L und S positive Zellen neben Amyloid vorkommen. Diese Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass Cath B, H, L und S in der Pathogenese der AA- und AL Amyloidose eine Rolle spielen. In Folgestudien wurde gezeigt, dass Cath B, H und L AA- und AL Amyloidproteine spalten können, was ein weiterer Beweis für eine biologische Bedeutung dieser Proteasen im amyloidalen Stoffwechsel ist.

6. Literaturverzeichnis

Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*; 276:944-51 (2001)

Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol*; 80 Pt C:535-561 (1981)

Barrett AJ, Rawlings ND. Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans*; 19(3):707-715 (1991)

Bellotti V, Mangione P, Merlini G. Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol*; 130(2-3):280-289 (2000)

Bellotti V, Merlini G. Current concepts on the pathogenesis of systemic amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*; 11 Suppl 9:53-62 (1996a)

Bellotti V, Merlini G. Toward understanding the molecular pathogenesis of monoclonal immunoglobulin light-chain deposition. *Nephrol Dial Transplant* ; 11(9):1708-1711 (1996b)

Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol*; 389:281-294 (1996)

Biroc SL, Gay S, Hummel K, Magill C, Palmer JT, Spencer DR, Sa S, Klaus JL, Michel BA, Rasnick D, Gay RE. Cysteine protease activity is up-regulated in inflamed ankle joints of rats with adjuvant-induced arthritis and decreases with in vivo administration of a vinyl sulfone cysteine protease inhibitor. *Arthritis Rheum*; 44(3):703-711 (2001)

Bohne S, Sletten K, Menard R, Bühling F, Vöckler S, Wrenger E, Roessner A, Rocken C. Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K, and L. *J Pathol*; 203(1):528-537 (2004)

Bühling F, Reisenauer A, Gerber A, Kruger S, Weber E, Bromme D, Roessner A, Ansorge S, Welte T, Röcken C. Cathepsin K--a marker of macrophage differentiation? *J Pathol*; 195(3):375-382 (2001)

Bühling F, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, Bromme D, Welte T. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol*; 164(6):2203-2216 (2004)

Bühling F, Waldburg N, Kruger S, Röcken C, Wiesner O, Weber E, Welte T. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S during human fetal lung development. *Dev Dyn*; 225(1):14-21 (2002)

Bühling F, Waldburg N, Reisenauer A, Heimburg A, Golpon H, Welte T. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. *Eur Respir J*; 23:620-628 (2004)

Burnett D, Abrahamson M, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Buttle DJ. Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch Biochem Biophys*; 317(1):305-310 (1995)

Buttle DJ, Burnett D, Abrahamson M. Levels of neutrophil elastase and cathepsin B activities, and cystatins in human sputum: relationship to inflammation. *Scand J Clin Lab Invest*; 50(5):509-516 (1990)

Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet*; 350(9071):134-138 (1997)

Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*; 59:63-88 (1997)

Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM. Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res*; 51(5):1478-1481 (1991)

Chronopoulos S, Laird DW, Ali-Khan Z. Immunolocalization of serum amyloid A and AA amyloid in lysosomes in murine monocytoid cells: confocal and immunogold electron microscopic studies. *J Pathol*; 173(4):361-369 (1994)

Comenzo RL, Gertz MA. Autologous stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis. *Blood*; 99(12):4276-4282 (2002)

Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, Sanchorawala V, Reisinger J, Dubrey S, Dember LM, Berk JL, Akpek G, LaValley M, O'hara C, Arkin CF, Wright DG, Skinner M. Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL (amyloid light-chain) amyloidosis: survival and responses in 25 patients. *Blood*; 91(10):3662-3670 (1998)

Comenzo RL, Vosburgh E, Simms RW, Bergethon P, Sarnacki D, Finn K, Dubrey S, Faller DV, Wright DG, Falk RH, Skinner M. Dose-intensive melphalan with blood stem cell support for the treatment of AL amyloidosis: one-year follow-up in five patients. *Blood*; 88(7):2801-2806 (1996)

Cornwell GG, III, Johnson KH, Westermark P. The age related amyloids: a growing family of unique biochemical substances. *J Clin Pathol*; 48(11):984-989 (1995)

Frackowiak J, Sukontasup T, Potempska A, Mazur-Kolecka B. Lysosomal deposition of Abeta in cultures of brain vascular smooth muscle cells is enhanced by iron. *Brain Res*; 1002(1-2):67-75 (2004)

Friedreich N, Kekule A. Zur Amyloidfrage IV. *Virchow Archiv (Pathol Anat)*; 16: 50-65 (1859)

Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura NH, Ghiso J, Frangione B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am J Pathol*; 145(3):526-530 (1994)

Garcia-Garcia M, Argiles, Gouin-Charnet A, Durfort M, Garcia-Valero J, Mourad G. Impaired lysosomal processing of beta2-microglobulin by infiltrating macrophages in dialysis amyloidosis. *Kidney Int*; 55(3):899-906 (1999)

Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney. *Kidney Int*; 61(1):1-9 (2002)

Gertz MA, Rajkumar SV. Primary systemic amyloidosis. *Curr Treat Options Oncol*; 3(3):261-271 (2002)

Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*; 358(9275):24-29 (2001)

Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med*; 302(23):1283-1292 (1980a)

Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med*; 302(24):1333-1343 (1980b)

Hashimoto Y, Kakegawa H, Narita Y, Hachiya Y, Hayakawa T, Kos J, Turk V, Katunuma N. Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*; 283(2):334-339 (2001)

Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 377(2):71-86 (1996)

Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol*; 3(6):472-482 (2003)

Hsu TC, Pathak S, Samaan N, Hickey RC. Chromosome instability in patients with medullary carcinoma of the thyroid. *JAMA*; 246(18):2046-2048 (1981)

Husby G, Marhaug G, Dowton B, Sletten K, Sipe JD: Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid 1*: 119-137 (1994)

Keyszer G, Redlich A, Haupl T, Zacher J, Sparmann M, Engethum U, Gay S, Burmester GR. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum*; 41(8):1378-1387 (1998)

Kirschke H, langner J, Wiederanders B, Ansorge S, Bohley P., Hanson H. Cathepsin H: An endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta biol. Med. Germ.*, band 36, 185-199 (1976)

Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*; 2(14):1581-1643 (1995)

Kirschke H, Clausen T, Gohring B, Gunther D, Heucke E, Laube F, Lowe E, Neef H, Papesch H, Peinze S, Plehn G, Rebmann U, Rinne A, Rudrich R, Weber E. Concentrations of lysosomal cysteine proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J Cancer Res Clin Oncol*; 123(7):402-406 (1997)

Kirschke H, Wiederanders B. Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Methods Enzymol*; 244:500-511 (1994)

Kisilevsky R. Amyloid and amyloidoses: differences, common themes, and practical considerations. *Mod Pathol*; 4(4):514-518 (1991)

Kisilevsky R. Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor, and amyloid deposition. *J Intern Med*; 232(6):515-516 (1992)

Kisilevsky R, Gruys E, Shirahama T. Does amyloid enhancing factor (AEF) exist? Is AEF a single biological entity? *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2, 128-133 (1995)

Kisilevsky R, Fraser P. Proteoglycans and amyloid fibrillogenesis. *Ciba Found Symp*; 199:58-67 (1996)

Klueve-Beckerman B, Liepnieks JJ, Wang L, Benson MD. A cell culture system for the study of amyloid pathogenesis. Amyloid formation by peritoneal macrophages cultured with recombinant serum amyloid A. *Am J Pathol*; 155(1):123-133 (1999)

Klueve-Beckerman B, Manaloor JJ, Liepnieks JJ. A pulse-chase study tracking the conversion of macrophage-endocytosed serum amyloid A into extracellular amyloid. *Arthritis Rheum*; 46(7):1905-1913 (2002)

Koga H, Mori N, Yamada H, Nishimura Y, Tokuda K, Kato K, Imoto T. Endo- and aminopeptidase activities of rat cathepsin H. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 40(4):965-970 (1992)

Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Therneau TM. A trial of three regimens for primary amyloidosis: colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone, and colchicine. *N Engl J Med*; 336(17):1202-1207 (1997)

Lesser M, Chang JC, Galicki NI, Edelman J, Cardozo C. Cathepsin B and D activity in alveolar macrophages from rats with pulmonary granulomatous inflammation or acute lung injury. *Agents Actions*; 28(3-4):264-271 (1989)

- Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch*; 436(5):439-448 (2000)
- Maniatis A. Pathophysiology of paraprotein production. *Ren Fail*; 20(6):821-828 (1998)
- Mason RW, Bartholomew LT, Hardwick BS. The use of benzyloxycarbonyl[125I]iodotyrosylalanyldiazomethane as a probe for active cysteine proteinases in human tissues. *Biochem J*; 263(3):945-949 (1989)
- Mathis H, Rokitansky, Virchow and Heschl on the problem of amyloidosis. (a historical study). *Zentralbl Allg Pathol*; 111(2):103-107 (1968)
- Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*; 349(6):583-596 (2003)
- Migita K, Yamasaki S, Shibatomi K, Ida H, Kita M, Kawakami A, Eguchi K. Impaired degradation of serum amyloid A (SAA) protein by cytokine-stimulated monocytes. *Clin. Exp. Immunol* 123: 408-411 (2001)
- Missmahl HP. Polarization microscopic contribution to Congo red staining of amyloid. *Z Wiss Mikrosk*; 63(3):133-139 (1957)
- Missmahl HP, Hartwig M. Optical polarization studies of amyloid substance. *Virchows Arch*; 324(4):489-508 (1953)
- Mort JS, Recklies AD, Poole AR. Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum*; 27(5):509-515 (1984)
- Müller D, Roessner A, Röcken C. Distribution pattern of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and alpha 2-macroglobulin in cases of generalized AA- and AL amyloidosis. *Virchows Arch*; 437(5):521-527 (2000)
- Obici L, Perfetti V, Palladini G, Moratti R, Merlini G. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta*; 1753(1):11-22 (2005)
- Olsen KE, Sletten K, Sandgren O, Olsson H, Myrvold K, Westermark P. What is the role of giant cells in AL-amyloidosis? *Amyloid*; 6(2):89-97 (1999)
- Pepys MB. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 356(1406):203-210 (2001)

Petanceska S, Burke S, Watson SJ, Devi L. Differential distribution of messenger RNAs for cathepsins B, L and S in adult rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 59(3): 729-738 (1994)

Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN. A review of light, polarization and fluorescence microscopic methods for amyloid. *Appl Pathol*; 3(1-2):5-17 (1985)

Rawlings ND, Barrett AJ. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*; 244:461-486 (1994)

Rawlings ND, Barrett AJ. . MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; 28(1) 323-325 (2000)

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; 34(Database issue):D270-D272 (2006)

Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92(9):3849-3853 (1995)

Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*; 4(4):357-366 (1996)

Röcken C, Ernst J. Amyloid diagnostics in rheumatic diseases. *Pathologe*. (2006)

Röcken C, Ernst J, Hund E, Michels H, Perz J, Saeger W, Sezer O, Spuler S, Willig F, Schmidt HH. [Interdisciplinary guidelines on diagnosis and treatment for extracerebral amyloidoses--published by the German Society of Amyloid Diseases (www.amyloid.de)]. *Dtsch Med Wochenschr*; 131(27 Suppl 2):S45-S66 (2006a)

Röcken C, Fandrich M, Stix B, Tannert A, Hortschansky P, Reinheckel T, Saftig P, Kahne T, Menard R, Ancsin J, Buhling F. Cathepsin protease activity modulates amyloid load in extracerebral amyloidosis. *J Pathol* 2006; 210(4):478-487 (2006b)

Röcken C, Menard R, Buhling F, Vöckler S, Raynes J, Stix B, Kruger S, Roessner A, Kahne T. Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann Rheum Dis*; 64(6):808-815 (2005)

Röcken C, Radun D, Glasbrenner B, Malferteiner P, Roessner A. Generalized AA-amyloidosis in a 58-year-old Caucasian woman with an 18-month history of gastrointestinal tuberculosis. *Virchows Arch* 1999; 434(1):95-100.

- Röcken C, Schwotzer EB, Linke RP, Saeger W. The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice. *Histopathology*; 29(4):325-335 (1996)
- Röcken C, Shakespeare A. Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis. *Virchows Arch*; 440(2):111-122 (2002)
- Röcken C, Sletten K. Amyloid in surgical pathology. *Virchows Arch*; 443(1):3-16 (2003)
- Röcken C, Stix B, Bromme D, Ansorge S, Roessner A, Bühling F. A putative role for cathepsin K in degradation of AA and AL amyloidosis. *Am J Pathol*; 158(3):1029-1038 (2001)
- Röcken C, Tautenhahn J, Bühling F, Sachwitz D, Vöckler S, Goette A, Burger T. Prevalence and pathology of amyloid in atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 26(3):676-677 (2006)
- Röcken C, Wieker K, Grote HJ, Muller G, Franke A, Roessner A. Rosai-Dorfman disease and generalized AA amyloidosis: a case report. *Hum Pathol*; 31(5):621-624 (2000)
- Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J*; 14(13):2075-2086 (2000)
- Saeger W, Röcken C. [Amyloid: microscopic demonstration, classification and clinical correlation]. *Pathologe* 1998; 19(5):345-354.
- Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*; 130(2-3):88-98 (2000)
- Solomon A, Weiss DT, Pepys MB. Induction in mice of human light-chain-associated amyloidosis. *Am J Pathol*; 140(3):629-637 (1992)
- Stix B, Kahne T, Sletten K, Raynes J, Roessner A, Röcken C. Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. *Am J Pathol*; 159(2):561-570 (2001)
- Stone MJ. Amyloidosis: a final common pathway for protein deposition in tissues. *Blood*; 75(3):531-545 (1990)
- Storer AC, Menard R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*; 244:486-500 (1994)
- Strege RJ, Saeger W, Linke RP. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidoses. Report of 43 cases in an unselected autopsy series. *Virchows Arch*; 433(1):19-27 (1998)
- Thierry A, Bridoux F, Goodman H, Belmouaz S, Abou AR, Desport E, Jaccard A, Touchard G. [Immunoglobulin light chain amyloidosis: recent

molecular, clinical and therapeutic approach]. *Nephrologie*; 25(4):111-118 (2004)

Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*; 1477(1-2):98-111 (2000)

Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*; 378(3-4):141-150 (1997)

Wolters PJ, Chapman HA. Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir Res*; 1(3): 170-177 (2000)

Yamada T, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Benson MD. In vitro degradation of serum amyloid A by cathepsin D and other acid proteases: possible protection against amyloid fibril formation. *Scand J Immunol*; 41(6):570-574 (1995a)

Yamada T, Liepnieks J, Benson MD, Kluge-Beckerman B. Accelerated amyloid deposition in mice treated with the aspartic protease inhibitor, pepstatin. *J Immunol*; 157(2):901-907 (1996)

Yamada T, Liepnieks JJ, Kluge-Beckerman B, Benson MD. Cathepsin B generates the most common form of amyloid A (76 residues) as a degradation product from serum amyloid A. *Scand J Immunol*; 41(1):94-97 (1995)

Zhu LC, Sidhu GS, Yee HT, Cassai ND, Goldfarb DS, Wiczorek RL. AA-type amyloidosis associated with non-Hodgkin's lymphoma: a case report. *Hum Pathol*; 35(8):1041-1044 (2004)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in dem unter seiner Leitung stehenden Institut durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. Röcken für die Bereitstellung des Themas, der mir stets geduldig und fachkompetent beratend zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Kügler und Frau Miethke für die Einarbeitung in die immunhistochemische Methodik bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau Fähse für ihre Hilfe bei der Literaturrecherche.

Ich danke meinen Eltern und Robby von ganzem Herzen, die mich immer wieder motivierten.

Erklärung der Autorin

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Bedeutung von Cysteinproteasen (Cathepsin B, H, L und S) für die Pathogenese der AA- und AL Amyloidose

selbstständig angefertigt und bei der Abfassung keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde unter dem Direktorat von Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner, Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität durchgeführt.

Die Abfassung der Dissertation verletzt die Rechte Dritter nicht.

Ich habe die Dissertation an keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule/Universität zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Bad Soden, den 1. Mai 2007

Steffi Vöckler

Lebenslauf der Autorin

Persönliche Daten:

Steffi Vöckler
 Goethestr. 6 B
 39108 Magdeburg
 geb. am 09.07.1976 in
 Magdeburg, ledig

Schulbildung:

1983 - 1990 Grundschole Wilhelm Pieck,
 Brandenburg
 1990 - 1996 Bertold Brecht Gymnasium,
 Brandenburg

Studium:

WS 96/97 bis SS 04 Studium der Humanmedizin an der
 medizinischen Fakultät der Otto-von-
 Guericke-Universität in Magdeburg

August 1999 Abschluss der ärztlichen Vorprüfung
 August 2000 Abschluss des 1. Staatsexamens
 September 2002 Abschluss des 2. Staatsexamens
 April 2004 Abschluss des 3. Staatsexamens

Famulaturen:

Februar 2000 Innere Medizin an der Otto-von-Guericke
 Universität Magdeburg
 Februar 2001 Pathologie an der Otto-von-Guericke
 Universität Magdeburg
 September 2001 Chirurgie im Kreiskrankenhaus Rastatt
 (Baden-Württemberg)
 März 2002 Praxis für Allgemeinmedizin in
 Brandenburg

Praktische Jahr:

2003/2004

1. Tertial: Innere Medizin; Klinik für Nephrologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2. Tertial: Visceralchirurgie, Städtisches Klinikum Magdeburg
3. Tertial: Pathologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Ärztliche Tätigkeit:

Okt. 2004 bis Dez. 2005

Lungenklinik Lostau, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Lostau

Jan. 2006 bis Sept. 2006

Pfeiffersche Stiftungen; Klinik für Innere Medizin, Magdeburg

Seit Dez. 2006

Markuskrankenhaus; Klinik für Innere Medizin, Frankfurt am Main

Bad Soden, den 1. Mai 2007

Steffi Vöckler

Publikationen

Vöckler S, Roessner A, Röcken C, Die Expression von Cysteinproteasen bei AA Amyloidose. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (2002)

Bohne S, Sletten K, Menard R, Bühling F, Vöckler S, Wrenger E, Roessner A, Röcken C. Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K, and L. *J Pathol*; 203(1):528-537 (2004)

Röcken C, Menard R, Bühling F, Vöckler S, Raynes J, Stix B, Kruger S, Roessner A, Kahne T. Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann Rheum Dis*; 64(6):808-815 (2005)

Röcken C, Tautenhahn J, Bühling F, Sachwitz D, Vöckler S, Goette A, Burger T. Prevalence and pathology of amyloid in atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 26(3):676-677 (2006)