

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

IN VITRO UND IN VIVO UNTERSUCHUNGEN  
ZUR FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG DER CATHEPSINE B, K UND L  
BEI DER SYSTEMISCHEN 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 Silvia Bohne

aus Rahden

Magdeburg 2006

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Bohne, Silvia:

In vitro und in vivo Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Cathepsine B, K und L bei der systemischen AA- und AL-Amyloidose- 2006. - 108 Bl.: 31 Abb., 3 Tab.

## Kurzreferat

Die Cathepsine B, K und L könnten als ubiquitär exprimierte lysosomale Proteasen auch an Bildung und Entstehung von Amyloid beteiligt sein. Sie wurden immunhistochemisch neben humanem AA- und AL-Amyloid nachgewiesen und sind im Stande, SAA und AA-Amyloidproteine zu spalten.

In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob Cathepsin B, K und L in der Lage sind, AL-Amyloid zu spalten. Mit immunhistochemischen Färbungen wurde die Lokalisation von Cathepsin B, K und L, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Verlauf der experimentellen systemischen Amyloidose bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen untersucht.

Cathepsin B, K und L spalteten in vitro sowohl aufgereinigte Amyloidproteine als auch native Amyloidablagerungen. Mit Cathepsin K konnte eine komplette Auflösung der AL-Amyloidproteine demonstriert werden.

Es ließ sich kein zeitlicher oder räumlicher Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und Amyloidablagerungen feststellen. Makrophagen hingegen waren regelhaft neben Amyloidablagerungen zu finden. Sie veränderten im Verlauf von Entzündungsreaktion und Amyloidbildung ihren Phänotyp. Alle drei Cathepsine ließen sich bei allen drei Mausstämmen in Makrophagen neben Amyloidablagerungen immunhistochemisch nachweisen.

Damit spalten Cathepsin B, K und L Vorläufer-, Amyloidproteine und native Ablagerungen der zwei häufigsten systemischen Amyloidosen und sind in einer räumlichen und zeitlichen Verteilung nachweisbar, die eine Beteiligung an Amyloidentstehung und Regression ermöglichen würde.

## Schlüsselwörter

Amyloidose, Cysteinproteasen, Cathepsine, Makrophagen, F4/80

# Abkürzungen

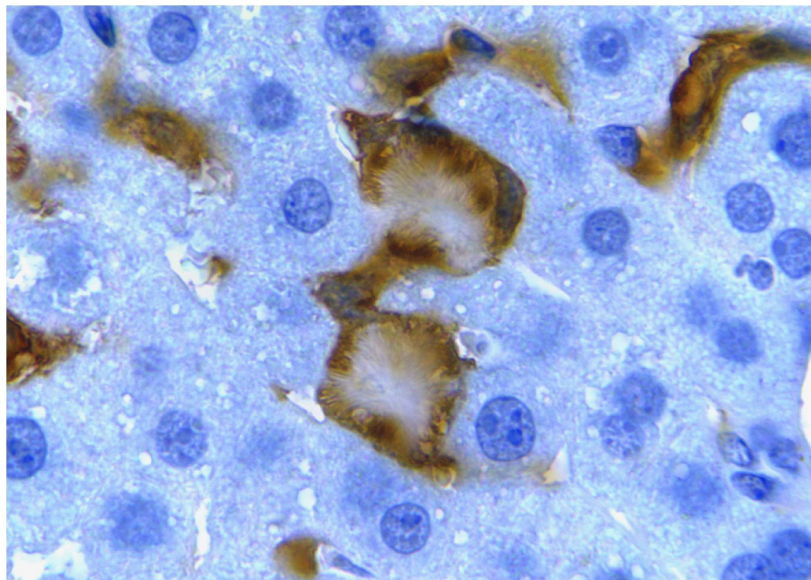
AA	Amyloid A
AEF	Amyloid enhancing factor
AGE	nicht-enzymatisch glykosilierte Endprodukte
ApoE	Apolipoprotein E
B	Balb/c-Maus
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'Indolyphosphat p-Toluidinsalz
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongioforme Enzephalopathie
CathB	Cathepsin B
CathK	Cathepsin K
CathL	Cathepsin L
CR	Kongorotfärbung
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
MGUS	Monoklonale Gammopathie unspezifischer Signifikanz
N	Nude-Maus
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RAGE	Rezeptor für nicht-enzymatisch glykosilierte Endprodukte
S	SCID-Maus
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P-component
SDS	Sodiumduodecylsulphat
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TBST	Tris-Base-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Dokumentationsblatt</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Systemische Amyloidosen . . . . .	7
1.1.1	Definition . . . . .	7
1.1.2	Struktur des Amyloids . . . . .	7
1.1.3	Klassifikation . . . . .	8
1.1.4	Epidemiologie und Klinik der systemischen Amyloidosen . . .	10
1.1.5	Pathogenese . . . . .	14
1.2	Cathepsine . . . . .	20
1.2.1	Cathepsin B und L . . . . .	20
1.2.2	Cathepsin K . . . . .	21
1.3	Amyloid und proteolytische Enzyme . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Material . . . . .	28
3.1.1	Gewebe . . . . .	28
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien . . . . .	28
3.1.3	Antikörper . . . . .	30
3.2	Methoden . . . . .	31
3.2.1	Präparation der Amyloidproteine . . . . .	31
3.2.2	Gelfiltration . . . . .	31
3.2.3	Aminosäuresequenzierung . . . . .	32

3.2.4	Gelelektrophorese . . . . .	32
3.2.5	Coomassieblau-Färbung . . . . .	33
3.2.6	Perjodsäure-Schiff-Reaktion . . . . .	33
3.2.7	Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers	33
3.2.8	Westernblot und Immundetektion . . . . .	34
3.2.9	Herstellung der humanen Cathepsine . . . . .	35
3.2.10	Degradationsexperimente mit monomeren Amyloidproteinen	35
3.2.11	Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen nichtfixierten Gefrierschnitten . . . . .	36
3.2.12	Auswertung der Degradationsexperimente . . . . .	37
3.2.13	Induktion der AA-Amyloidose bei der Maus . . . . .	38
3.2.14	Kongorotfärbung . . . . .	39
3.2.15	AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung . . . . .	39
3.2.16	Immunhistochemie . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Degradationsexperimente . . . . .	41
4.1.1	Charakterisierung der AL-Amyloidproteine . . . . .	41
4.1.2	Charakterisierung des Anti-AL-Antikörpers . . . . .	43
4.1.3	Degradationsexperimente mit AL-Amyloidproteinen . . . . .	43
4.1.4	Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten	47
4.2	AA-Amyloidose der Maus . . . . .	50
4.2.1	Amyloidentwicklung bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen .	50
4.2.2	Neutrophile Granulozyten . . . . .	53
4.2.3	Makrophagen . . . . .	53
4.2.4	Expression und Lokalisation von Cathepsin K . . . . .	59
4.2.5	Expression und Lokalisation von Cathepsin B . . . . .	62
4.2.6	Expression und Lokalisation von Cathepsin L . . . . .	63
4.2.7	Unterschiede zwischen Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen . .	64
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
5.1	Degradationsexperimente . . . . .	70
5.1.1	Degradationsexperimente mit monomeren Amyloidproteinen	70
5.1.2	Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten	71

5.2	AA-Amyloidose der Maus . . . . .	75
5.2.1	Bildung von Amyloid . . . . .	76
5.2.2	Neutrophile Granulozyten . . . . .	77
5.2.3	Makrophagen . . . . .	77
5.2.4	Cathepsine . . . . .	82
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>C</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>D</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>E</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>106</b>
<b>F</b>	<b>Erklärung</b>	<b>107</b>
<b>G</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>



Kupferzellen um Amyloidablagerungen; Leber; Immunfärbung mit F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-Gegenfärbung; 1600-fache Vergrößerung

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Systemische Amyloidosen

#### 1.1.1 Definition

Amyloid beschreibt Ablagerungen eines autologen Proteins, die durch charakteristische Eigenschaften definiert werden:

1. den Nachweis starrer Fibrillen von circa 10 nm Durchmesser,
2. spezifische färberische Eigenschaften: Apfelgrüne Polarisationsfarbe im polarisierten Licht nach Kongorotfärbung und
3. charakteristische Infrarot und Röntgenbeugungsspektren.

Amyloidosen sind definiert als Erkrankungen, die durch Ablagerung von Amyloid ausgelöst werden. Die Amyloidablagerungen können dabei lokal, organlimitiert oder generalisiert auftreten. Dementsprechend werden lokale und systemische Amyloidosen unterschieden [124].

#### 1.1.2 Struktur des Amyloids

Es werden obligate und fakultative Bestandteile des Amyloids unterschieden. Obligater Bestandteil ist das Amyloidprotein, welches sich zu anti-parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen zusammenlagert und Filamente ausbildet. Zwei bis mehrere Filamente bilden die Amyloidfibrille, die das grundlegende Strukturelement des Amyloids darstellt [67, 68].

Weitere obligate Bestandteile sind Amyloid P-component [177], Apolipoprotein E [25], Proteoglykane und Glykosaminoglykane [89]. Die exakte Organisation dieser Komponenten ist nicht genau bekannt. Nach einem Modell bildet Amyloid



P-component Pentamere, welche den Kern der Amyloidfibrille bilden. Darum herum lagert sich zunächst eine Schicht Chondroitinsulphatproteoglykan, gefolgt von einer Schicht Heparansulphatproteoglykan. Zu äußerst folgen die Fibrillenfilamente [89]. Als fakultativ nachweisbare Bestandteile des Amyloids sind unter anderem Albumin, Immunglobuline, verschiedene Basalmembranproteine, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein J und  $\alpha_1$ -Antitrypsin beschrieben worden.

### 1.1.3 Klassifikation

Die Klassifikation der Amyloidosen richtet sich nach dem jeweiligen Amyloidprotein. Die aktuelle Nomenklatur umfasst 25 humane und 8 tierische Proteine [214]. Die Bezeichnung erfolgt durch den Großbuchstaben A für Amyloid, plus ein festgelegtes Kürzel für das jeweilige Vorläuferprotein, plus S oder L um den Befall als systemisch oder lokal zu kennzeichnen. Einen Überblick über die wichtigsten humanpathogenen Fibrillenproteine gibt Tabelle 1 (modifiziert nach [124]).

Tabelle 1.1: Quelle: modifiziert nach [124]

Amyloidprotein	Vorläuferprotein	Befall	assozierte Erkrankung/befallenes Organ
AL	Immunglobulinleichtketten	S, L	Plasmazelldyskrasien, Multiples Myelom, MGUS, idiopathisch, familiär
AH	Immunglobulinschwerketten	S, L	M. Waldenström, idiopathisch
ATTR	Transthyretin	S, L <sup>?</sup>	hereditär, senile systemische Amyloidose, Sehnenscheiden
A $\beta$ 2M	$\beta$ <sub>2</sub> -Mikroglobulin	S, L <sup>?</sup>	Hämodialyse-assoziiert, Gelenke
AA	(Apo) Serum Amyloid A	S	chronisch entzündliche Erkrankungen, familiäres Mittelmeerfieber, Muckle-Wells-Syndrom
AApoAI	Apolipoprotein-AI	S	familiäre Amyloid-Polyneuropathie, Arteriosklerose-assoziiert
AApoAII	Apolipoprotein-AII	S	hereditär
AGel	Gelsolin	S	hereditär
ALys	Lysozym	S	hereditär
AFib	Fibrinogen $\alpha$ -Kette	S	hereditär
ACys	Cystatin C	S	hereditär
ABri	ABri-Proteinvorläufer	S	familiäre Demenz
A $\beta$	A $\beta$ -Proteinvorläufer	L	M. Alzheimer, alterndes Gehirn
APrP	Prion Protein	L	Creuzfeld-Jakob-Erkrankung, Kuru, BSE, Scrapie
ACal	(Pro)Calcitonin	L	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
AIAPP	Inselamyloid Polypeptid	L	Langerhan'sche Inseln bei Diabetes mellitus und Insulinomen
AANF	Atriunatriuretischer Faktor	L	Herzvorhof
APro	Prolactin	L	Prolactinom, senile Hypophyse
AIns	Insulin	L	Iatrogen
AMed	Lactadherin	L	senile Aorta
AKer	Kerato-epithelin	L	Haut, Kornea, familiär

MGUS: Monoklonale Gammopathie unspezifischer Signifikanz

BSE: Bovine spongioforme Enzephalopathie

## 1.1.4 Epidemiologie und Klinik der systemischen Amyloidosen

### AL-Amyloidose

Bei AL-Amyloidosen sind die zugrundeliegenden Proteine Leichtketten, seltener Schwerketten, die von Tumorzellen eines Multiplen Myeloms, M. Waldenströms oder anderen B-Zell-Neoplasien synthetisiert werden. AL-Amyloid tritt auch im Rahmen einer monoklonalen Gammopathie unspezifischer Signifikanz oder idiopathisch auf [24, 53, 64].

Die Inzidenz der systemischen AL-Amyloidose wird in den USA angegeben mit 8,9 : 1 000 000. Bei Vorliegen eines Multiplen Myeloms bekommen 12 - 15% der Patienten eine klinisch relevante AL-Amyloidose, in einer Screeninguntersuchung konnte in bis zu 38% der Fälle Amyloid nachgewiesen werden [44].

Die klinischen Symptome sind je nach Organbefall und Ausmaß der Ablagerungen variabel. Klinisch relevant ist vor allem der Befall der Nieren und des Herzens. Eine Beteiligung der Nieren ist in 80% der Fälle nachweisbar, in 51% der Fälle ist die hieraus resultierende progrediente Niereninsuffizienz das klinisch dominierende Krankheitsbild [176]. Ein Herzbefall lässt sich bei 59% der Patienten nachweisen [176], in klinisch dominierendem Ausmaß bei 26%. Dann jedoch verschlechtert sich die Prognose erheblich und die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt noch 0,75 Jahre [48]. Die Patienten versterben an progredienter Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen. Der häufige Mitbefall von Leber und Milz führt zur Hepatosplenomegalie. Eine Leberinsuffizienz tritt aufgrund der enormen Kompensationsfähigkeit dieses Organs nur in seltenen Fällen auf. Prinzipiell kann der gesamte Verdauungstrakt befallen sein (62% der Fälle) inklusive des autonomen Nervensystems mit resultierender Dysphagie, Malabsorption, Übelkeit, Anorexie, Diarrhoe, Aszites und abdominalen Mißempfindungen. Ein Befall des peripheren Nervensystems führt zu quälender Polyneuropathie (52% der Fälle). Ein Befall der Lunge ist in bis zu 90% der Fälle histologisch nachweisbar [27]. Als klassische Symptome der AL-Amyloidose gelten die Makroglossie (27% der Fälle) und das Auftreten von periorbitalen Eckchymosen bei Befall der Hautgefäße (12% der Fälle). Relativ häufig tritt auch ein Karpaltunnelsyndrom auf (28% der Fälle), welches der Diagnosestellung um Monate vorausgehen kann. Der meistens vorliegende Befall des subkutanen Fettgewebes bleibt dagegen in der Regel klinisch inapparent [176, 109, 46, 37].

Als Standardtherapie gilt die intravenöse Gabe von Melphalan, teils in Kombina-

tion mit Prednisolon. Die mediane Überlebenszeit hat sich unter Therapie von 0,88 auf 1,34 Jahre verbessert. Bei nachweisbarem Herzbefall liegt sie bei 1,08 Jahren, nach Auftreten von Herzinsuffizienzsymptomen bei 0,75 Jahren [48, 37].

Neuere Therapieoptionen sind die Hochdosis-Dexamethason-Pulstherapie mit anschließender Erhaltungstherapie mit Dexamethason plus Interferon alpha mit einer medianen Überlebenszeit von 31 Monaten [46] und die myeloablative Therapie mit Hochdosis-Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation [37]. Die mediane Überlebenszeit dieser Therapie wurde mit 4,6 Jahren angegeben (1,6 Jahre bei Herzbefall und 6,4 Jahre ohne Herzbeteiligung) [176]. Hierzu sei angemerkt, dass die Therapie durch die relativ hohe Toxizität nicht für Patienten mit ausgeprägter Organbeteiligung geeignet ist und die Therapiemortalität trotz entsprechend gefasster Einschlusskriterien bei immerhin 13% lag.

Alle genannten Therapien wirken über eine Eradikation des leichtkettenproduzierenden Plasmazellklons, so dass das Vorläuferprotein zur Fibrillenbildung nicht mehr angeliefert wird. Eine spezifisch am Amyloid angreifende Therapiemöglichkeit existiert bis heute nicht.

### **AA-Amyloidose**

Bei AA-Amyloidosen werden die Fibrillen aus Serum Amyloid A (SAA) im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankungen gebildet. In der westlichen Welt sind Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, insbesondere die Rheumatoidarthritis die häufigste Ursache. Angaben zur Prävalenz schwanken hier zwischen 4 und 26% der Fälle. In post-mortem Studien konnte bei bis zu 61% der von Rheumatoidarthritis Betroffenen AA-Amyloid nachgewiesen werden [45]. Das Intervall zwischen Beginn der Rheumatoidarthritis und Ausbildung von AA-Amyloidablagerungen wird mit 17 bis 19 Jahren angegeben [13, 135].

Zweithäufigste Ursache für AA-Amyloid ist in den westlichen Industrienationen das familiäre Mittelmeerfieber. Hierbei handelt es sich um eine hereditäre Erkrankung mit periodisch auftretenden Fieberanfällen, Polyserositis und vorzugsweise Nierenbefall durch Amyloid.

Infektionserkrankungen wie chronische Osteomyelitis, Kala-Azar und Lepra spielen (aufgrund mangelnder Antibiotikatherapie) heute noch in Entwicklungsländern eine wichtige Rolle. Historisch interessant ist in diesem Zusammenhang die Tuberku-

lose - sie war, als Rudolf Virchow das Krankheitsbild 1854 zum ersten Mal beschrieb, die häufigste Ursache von AA-Amyloid.

Das Auftreten einer AA-Amyloidose ist ebenfalls beschrieben worden bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Bronchiektasien, Sarkoidose und verschiedenen Krebserkrankungen, hier insbesondere bei Hypernephromen und Hodgkin-Lymphomen.

Klinisch steht der Nierenbefall im Vordergrund, aufgrund dessen rund 90% der Patienten mit AA-Amyloidose eine fortschreitende renale Insuffizienz mit Proteinurie entwickeln [63]. Circa 20% der Patienten weisen einen symptomatischen Befall des Gastrointestinaltraktes auf, bei 9% wurde eine Amyloidgicht beschrieben [63]. Der Befall von Leber und Milz, Lunge und subkutanem Fettgewebe ist zwar häufig, in der Regel jedoch klinisch asymptomatisch. Ebenso ist eine symptomatische Beteiligung des Herzens und des Nervensystems bei der AA-Amyloidose selten.

Die mediane Überlebenszeit hat sich durch neue Therapiemöglichkeiten von rheumatischen Erkrankungen und Dialyse verbessert und liegt je nach Studie zwischen 24 und 165 Monaten [63, 135, 31, 98]. Die Zeit bis zur Entwicklung einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz wird im Median mit 18 Monaten angegeben [98].

Die Therapie setzt wiederum daran an, die überschießende Bildung von SAA, als Vorläuferprotein des Amyloids, durch adäquate Behandlung der Grunderkrankung einzudämmen. Dies geschieht im Falle der Rheumatoidarthritis im Wesentlichen durch Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat, Chlorambucil oder Cyclophosphamid, was die Überlebenszeiten deutlich verlängert (für Cyclophosphamid-Pulstherapie wird die mediane Überlebenszeit mit 165 Monaten angegeben [31]).

### **Senile systemische ATTR-Amyloidose**

Die senile systemische Amyloidose ist die häufigste systemische Amyloidose in der westlichen Welt. In einer Autopsieserie fand sich eine Prävalenz von 25% bei über 80-Jährigen, hauptsächlich sind Männer betroffen [39].

Die Amyloidablagerungen bilden sich aus nichtmutiertem Transthyretin und lagern sich als Gefäßablagerungen in verschiedensten Organsystemen ab [216]. Am häufigsten sind Lunge, Herz und Gastrointestinaltrakt betroffen, während Nieren und peripheres Nervensystem typischerweise ausgespart werden. Die Erkrankung verläuft meist milde. Ein ausgeprägter Herzbefall kann jedoch zu einer restriktiven

Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz sowie zu Rhythmusstörungen führen [125].

### **A $\beta_2$ M-Amyloidose**

Die A $\beta_2$ M-Amyloidose tritt als Folge jahrelanger Hämodialyse auf. Hierbei wird  $\beta_2$ -Mikroglobulin nur unvollständig aus dem Blut gefiltert, seine Konzentration ist entsprechend erhöht.

Diese Form der Amyloidose befällt in erster Linie die Gelenke und ruft hier eine chronische Entzündungsreaktion hervor. Typische Befunde sind Periarthritis des Scapulohumeralgelenks und das Auftreten eines Karpaltunnelsyndroms, aber auch Spondylarthropathie, Poplitealzysten und Befall weiterer Sehnenscheiden wurde beschrieben [127].

Diese Form der systemischen Amyloidose wird bei Anwendung moderner Dialyseverfahren nicht mehr beobachtet.

### **Hereditäre Amyloidosen**

Hereditäre Amyloidosen haben ihre Ursache in der Mutation eines Gens für ein physiologisch im Körper vorkommendes Protein. Die Mutation führt zur Veränderung der Primärstruktur des Proteins und erhöht dadurch dessen Neigung, Amyloid zu bilden. Dieser Erkrankungsmechanismus ist für Transthyretin, Apolipoprotein A-I und A-II, Gelsolin, Fibrinogen A $\alpha$ , Cystatin C und Lysozym beschrieben worden. Die Vererbung erfolgt autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz [74].

Die häufigste hereditäre Amyloidose ist die ATTR-Amyloidose. Hierbei liegt eine Mutation des Transthyretin-Gens vor. Bisher sind 80 verschiedene Mutationen beschrieben worden, von denen die häufigsten in bestimmten Populationen immerhin eine Genfrequenz von 3-4% erreichen. Das Manifestationsalter ist je nach Mutation sehr variabel und wird mit 20 bis 70 Jahren angegeben.

Charakteristisch ist ein Befall des Nervensystems mit sensorischer peripherer Polyneuropathie, Störungen des autonomen Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes. Je nach vorliegendem Syndrom kann es zu Herzbefall und Befall der Meningen kommen. Therapeutisches Mittel der Wahl ist die Durchführung einer Lebertransplantation, da das mutierte Transthyretin überwiegend in diesem Organ gebildet wird [124].

### 1.1.5 Pathogenese

Bis heute ist die kausale Pathogenese der Amyloidosen nicht vollständig geklärt. Vermutlich sind verschiedene Faktoren beteiligt, die sich je nach vorliegendem Amyloidtyp unterscheiden, bzw. unterschiedliche Wichtung haben.

#### Struktur des Vorläuferproteins

Entscheidend für die Bildung von Amyloid ist das Vorhandensein der  $\beta$ -Faltblattstruktur, sie läßt sich als wesentlicher Bestandteil der Fibrillen immer nachweisen, unabhängig vom zugrundeliegenden Vorläuferprotein. Einige Vorläuferproteine haben naturgemäß einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Dies trifft beispielsweise für Immunglobulin-Leichtketten,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Transthyretin zu [123, 14, 217]. Andere weisen im Nativzustand nur einen kleinen oder gar keinen Anteil dieser Strukturen auf, wie das Prion Protein und die Apolipoproteine, eingeschlossen SAA. Hier muss eine Konversion der  $\alpha$ -Helix- zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen stattfinden.

Im Falle des Transthyretins bildet bereits das physiologische Protein Amyloidablagerungen im Rahmen der senilen systemischen Amyloidose. Durch Punktmutationen mit Austausch einzelner Aminosäuren wird die Amyloidbildung offensichtlich erleichtert. Ein im Nativzustand gering amyloidogenes Protein wird durch geringe Strukturveränderungen deutlich amyloidogener. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass die unterschiedlichen Mutationen im Transthyretin-Gen auch unterschiedliche klinische Syndrome auslösen und mit unterschiedlichen Manifestationsaltern vergesellschaftet sind. Hier beeinflusst die Primärstruktur des Vorläuferproteins also auch den klinischen Verlauf der Amyloiderkrankung.

Die Vorläuferproteine für AL-Amyloid sind in erster Linie Leichtkettenfragmente, um genauer zu sein, die variablen Segmente mit je einem unterschiedlich langen Abschnitt der konstanten Region. Selten wurden Schwerekettenfragmente oder intakte Leichtketten gefunden [104].

Leichtketten besitzen als Teile von Immunglobulinen eine hypervariable Region. In dieser durch Hypermutationen entstehenden Variabilität liegt die Möglichkeit des Immunsystems begründet, eine Vielzahl von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität bilden zu können. Bei jedem Patienten, bei dem ein Zellklon monoklonale Leichtketten produziert, haben diese also eine andere Primärstruktur. Ein Einfluss der Struktur der jeweiligen Leichkette auf die Amyloidbildung ließ sich mehrfach

demonstrieren.

Bence Jones Proteine von Patienten mit AL-Amyloidose aggregierten in vitro leichter als solche von Kontrollpatienten [134]. Bei Injektion monoklonaler Leichtketten von Amyloidosepatienten bildeten sich bei den injizierten Mäusen ebenfalls Amyloidablagerungen, während dies bei Injektion nicht-amyloidassoziierter Leichtketten nicht der Fall war [185, 184].

Bestimmte Leichtketten-Subgruppen werden bei AL-Amyloidosen häufiger gefunden, insbesondere die Subgruppe  $\lambda$ VI ist überrepräsentiert [183, 144].

Ebenfalls sind einige Aminosäuren in amyloidbildenden Leichtketten überrepräsentiert [189], und es ließ sich nachweisen, dass nach Trypsinverdau die Amyloidbildung aus Leichtketten mit entsprechendem Aminosäureaustausch in vitro deutlich verstärkt war [85].

Eine Erklärung ist, dass sich durch den Aminosäureaustausch die Faltung des Proteins in der Weise ändert, dass die naturgemäß in Leichtketten enthaltenen  $\beta$ -Faltblattelemente auseinandergefaltet werden und sich dadurch zu Fibrillen zusammenlagern können [85, 103].

Es entstand die Hypothese, dass nur ein Teil der Patienten mit Plasmazeldyskrasien Amyloid entwickelt, bzw. der klinische Verlauf sehr variabel ist, weil einige Leichtketten aufgrund ihrer Primärstruktur eine größere intrinsische Neigung zur Amyloidbildung besitzen als andere.

Als weitere Strukturbestandteile von Leichtketten sind Kohlenhydrate mit der Pathogenese der AL-Amyloidose in Verbindung gebracht worden. Hierbei wurde diskutiert, dass Glykosilierungen, welche bei amyloidogenen Leichtketten vergleichsweise häufiger zu finden sind, die Fibrillenbildung vereinfachen, die Gewebeaffinität der amyloidbildenden Proteine erhöhen oder auch einen enzymatischen Abbau erschweren könnten [79, 86, 142].

### **Konzentration des Vorläuferproteins**

Als typisches Beispiel für den Einfluss der erhöhten Konzentration des Vorläuferproteins auf die Amyloidbildung gilt das SAA. Dieses ist ständig im Plasma vorhanden, führt aber erst bei dauerhaft massiver Erhöhung, wie sie im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankungen auftritt, zur Amyloidbildung [159, 66].

Auch bei lokalen Amyloidosen liegt häufig eine hohe lokale Konzentration des



Vorläuferproteins vor. Beispielsweise bei mit Amyloidablagerungen assoziierten hormonproduzierenden Tumoren, wie dem medullären Schilddrüsenkarzinom, bei dem Amyloid aus Calcitonin entsteht [101, 215].

Jedoch ist eine erhöhte Konzentration des Vorläuferproteins weder zwingende Voraussetzung für die Ablagerung von Amyloid, noch führt sie unabdingbar zu dessen Ausbildung: Zum Beispiel ist die senile systemische Amyloidose nicht mit einem erhöhten Plasma-Transthyretinspiegel vergesellschaftet. Umgekehrt erkranken nur rund 10% der Rheumatiker an einer AA-Amyloidose. Es müssen also noch weitere Faktoren an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt sein.

### **Stoffwechsel des Vorläuferproteins**

Für einige Amyloidosen ist bekannt, dass die Ablagerungen aus einem Spaltprodukt des intakten Vorläuferproteins gebildet werden.

Im Falle des  $A\beta$ -Vorläuferproteins konnte gezeigt werden, dass eine  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase das  $A\beta$ -Vorläuferprotein in drei Fragmente spalten, von denen eines dem Amyloidprotein entspricht. Eine  $\alpha$ -Sekretase spaltete das  $A\beta$ -Vorläuferprotein in nicht-amyloidogene Fragmente. Als in Frage kommende Enzyme wurden Metalloproteinasen, Matrix-Proteasen und verschiedene Cathepsine diskutiert, die ausgehend von Mikrogliazellen wirken [56].

Im Falle der AA-Amyloidose bestehen die Fibrillen aus N-terminalen Fragmenten des SAA. Cathepsin B spaltete SAA unter Bildung eben dieser amyloidogenen Fragmente [156, 222], während Cathepsin D die Amyloidbildung verhinderte [221]. Auch hier wurden Zellen des Retikuloendothelialen Systems, insbesondere deren Lysosomen, in enger morphologischer Beziehung zu den Amyloidfibrillen gefunden und mit der Genese der Fibrillen in Zusammenhang gebracht.

Bei AL-Amyloid konnte nachgewiesen werden, dass Mesangialzellen in der Lage sind AL-Amyloid in vitro zu formen [195]. Die Amyloidbildung aus zugesetzten Leichtketten wurde durch Chloroquin vermindert [91]. Chloroquin beeinträchtigt durch pH-Verschiebungen die Lysosomen. Daher wurde eine Fragmentation der Leichtketten durch post-sekretorische Proteolyse der intakten Leichtketten vermutet.

## Seeding

Der Begriff "Seeding" kann am ehesten mit Keimsetzung übersetzt werden. Er bezieht sich auf die Beobachtung, dass sich die Zeit bis zur Ausbildung von Amyloidfibrillen durch bereits vorhandene Amyloidfibrillen deutlich verkürzen lässt [94, 100].

Es konnte bei der murinen AA-Amyloidose gezeigt werden, dass i.v.-applizierte synthetische Fibrillen die Bildung von AA-Amyloid beschleunigen. Es wurde diskutiert, dass die synthetischen Fibrillen als Keim für die Anlagerung und Bildung neuer Fibrillen fungieren [59, 95]. Für die Wirkungsweise des Amyloid-Enhancing Faktors (AEF), der üblicherweise zur Auslösung einer experimentellen AA-Amyloidose injiziert wird, wird derselbe Mechanismus angenommen [212, 5].

Bei der Amyloidbildung unterscheidet man zwei Phasen: Die präamyloidotische und die amyloidotische Phase der eigentlichen Amyloidbildung. Es wird angenommen, dass in der präamyloidotischen Phase wenige amyloidogene Proteine polymerisieren und einen Kern bilden. Diese Kernbildung ist eine kinetisch ungünstige Reaktion und dauert relativ lange. Ist die Kernbildung erfolgt, lagern sich weitere Monomere uneingeschränkt an. Es bilden sich Fibrillenprotein-Polymere aus denen sich schließlich Amyloid formt. Man nimmt an, dass durch Gabe von synthetischen Fibrillen oder AEF als sogenanntes Seeding, die präamyloidotische Phase verkürzt wird oder sogar ganz wegfällt [94].

## Konformationelle Mimikry

Bei der Spongiformen Enzephalopathie besagt ein Modell, dass die Konversion des nicht-pathogenen Prion Proteins in ein amyloidbildendes Scrapie Prion Protein die Voraussetzung für die Amyloidbildung ist [147]. Die Konversion, im Sinne einer  $\alpha$ -Helix- zu  $\beta$ -Faltblatt-Transformation [35], kann spontan stattfinden, es kann aber auch das pathologische Prion, als unlösliches Aggregat des Scrapie Prion Proteins, zwischen Spezies übertragen werden [58, 20, 65]. Man geht davon aus, dass in einer Kettenreaktion die Konversion des physiologischen Prion Proteins durch eine pathologische Chaperonfunktion des Scrapie Prion Protein ausgelöst wird: Das Scrapie Prion Protein wirkt als eine Art Matrize für die Umfaltung, bei der das Wildtyp-Prion Protein die Tertiärstruktur des pathogenen Scrapie Prion Proteins nachahmt und dadurch ebenfalls zum pathogenen, amyloidbildenden Protein wird, ein Vorgang, der als konformationelle Mimikry bezeichnet wird.

Auch im Falle der A $\beta$ -Amyloidose bei M. Alzheimer wird eine pathologische Chaperonfunktion des Apolipoprotein E vermutet, da die Inzidenz und Morbidität der sporadischen Alzheimer-Krankheit von der Konstellation der ApoE-Allele beeinflusst wird [191].

### **Serum Amyloid P-component**

Serum Amyloid P-component (SAP) ist ein nicht fibrilläres Plasmaprotein, das Calcium-abhängig Amyloidfibrillen bindet. Es ist Vorläufer des strukturgleichen Amyloid P-component, welches ein obligater Bestandteil von Amyloidablagerungen ist [145]. Die Plasmaclearance dieses Proteins ist bei Patienten mit systemischer Amyloidose massiv erhöht: Es findet eine Umverteilung aus dem Gefäßpool in den extravaskulären Raum statt [92].

Es konnte gezeigt werden, dass die Amyloidbildung bei SAP-defizienten Mäusen verlangsamt ist [16]. Auch lässt sich die proteolytische Spaltung von isolierten Amyloidfibrillen durch Zugabe von SAP hemmen [200]. Daraus ist die Hypothese entstanden, dass Amyloid P-component für die relative Proteaseresistenz der Fibrillen verantwortlich ist.

In der klinischen Anwendung wird Iod<sup>123</sup>-markiertes SAP benutzt, um Amyloidablagerungen im Hinblick auf Organbefall, Ausdehnung und Therapieerfolg szintigraphisch darzustellen [73].

### **Proteoglykane und Glykosaminoglykane**

Proteoglykane und Glykosaminoglykane können aus amyloidbeladenen Organen in größeren Mengen isoliert werden als aus entsprechenden Organproben von Gesunden [119, 120, 188, 187]. Heparansulphatproteoglykan und Chondroitinsulphatproteoglykan gelten als fixe Bestandteile von Amyloid, unabhängig vom zugrundeliegenden Protein, aber auch Dermatansulphat scheint spezifisch in den amyloidbefallenen Organen zu akkumulieren [186]. Die gesteigerte Synthese der Glykosaminoglykane beginnt noch vor Detektion mikroskopisch nachweisbarer Amyloidablagerungen [186]. Desweiteren ließ sich eine enge Assoziation mit Amyloid P-component zeigen.

Bei der fibrillären Glomerulopathie bestehen die Ablagerungen aus amyloidähnlichen-IgG-Fibrillen ohne nachweisbare Glykosaminoglykane. Hier weisen die Fibrillen keine  $\beta$ -Faltblattstruktur auf [224]. Verschiedene mögliche Einflüsse der Gly-

kosaminoglykane auf die Pathogenese der Amyloidosen wurden daraus abgeleitet: Dass sie die Bindung zwischen Amyloidfibrillen und Amyloid P-component vermitteln, die Konformationsänderung der Vorläuferproteine zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen induzieren, als Nidus für die initiale Fibrillenbildung dienen oder die Fibrillen vor proteolytischem Abbau schützen [86].

Auch andere Proteine treten räumlich assoziiert mit Amyloid auf. Die Basalmembran-komponenten Fibronectin, Laminin, Typ-IV-Kollagen und Perlecan wurden 36 bis 48 Stunden nach Induktion von AA-Amyloid bei der Maus neben den ersten Amyloidablagerungen immunhistochemisch nachgewiesen [116]. In einem gleichartig angelegten Experiment wurde auch ein 4-facher Anstieg des mRNA-Spiegels von Perlecan 72 Stunden nach Gabe des amyloidogenen Stimulus gefunden [1]. Ein Ansteigen des mRNA-Spiegels konnte ebenfalls für Laminin B2 und Typ IV-Kollagen gezeigt werden [219, 86], so dass möglicherweise auch das umgebende Bindegewebe einen Einfluss auf die Bildung des Amyloids hat.

### **AGE und RAGE**

Hyperglykämie, wie bei Diabetes mellitus und oxidativer Stress, wie bei Urämie, führen zur verstärkten Bildung von nicht-enzymatisch glykosilierten Endprodukten (AGE) [208, 209, 128]. Auch in, bzw. um Prion Plaques, A $\beta$ -Amyloid, A $\beta$ 2M-Amyloid, AL- und AA-Amyloid wurden sie nachgewiesen [162, 133, 129, 155].

Über den Rezeptor für AGE (RAGE) können eine Reihe von zellulären Antworten stimuliert werden, z.B. Chemotaxis von Monozyten, Knochenresorption durch Osteoklasten, Proliferation von glatten Muskelzellen, oxidativer Stress, Sekretion von Zytokinen, Kollagenase und verschiedenen Wachstumsfaktoren [128, 165, 226, 143].

RAGE bindet SAA und AA-Amyloid. Die RAGE-Expression in der Milz korrelierte eng mit der Ablagerung von AA-Amyloid und nach Injektion von RAGE bei Mäusen mit experimentell ausgelöster Amyloidose ließen sich hiernach RAGE-AA-Amyloid-Komplexe isolieren. Ebenso ließ sich durch Antagonisierung von RAGE die Ablagerung von Amyloid vermindern, woraufhin die Autoren einen direkten Zusammenhang zwischen RAGE, Amyloidablagerung und Zellstress postulierten [223].

## 1.2 Cathepsine

Die Funktion der Zellen des Retikuloendothelialen Systems beim Abbau von körpereigenen und körperfremden Strukturen und Proteinen beruht auf einer hohen lysosomalen Aktivität. Mononukleäre Zellen synthetisieren hierzu eine Vielzahl von Enzymen, u.a. sind sie reich an den Cysteinproteinasen Cathepsin B, K und L.

Proteolyse durch Cathepsine ist irreversibel. Sie werden daher als Mediatoren des endgültigen lysosomalen Verdaus sowohl endozytierter als auch endogen gebildeter Proteine angesehen [29].

Cathepsine wirken nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär. Speziell Osteoklasten, aber auch Makrophagen sind in der Lage, innerhalb der Zwischenräume zwischen Zelloberfläche und Substrat ein saures Milieu zu schaffen [10], Cathepsine (auch gezeigt für Cathepsin B und L) in diesen Spalt zu sezernieren und Inhibitoren daraus zu verdrängen [151].

Cathepsine sind streng regulierte Enzyme. Zu ihrer Aktivierung durch Abspaltung der Pre- und Prosequenz [28] ist ein saurer pH-Wert notwendig [218, 36], zusätzlich kommt es unter basischen pH-Werten zu Konformationsänderungen, welche die Inaktivierung der Enzyme bedingen [204, 203].

Um Zellen und Gewebe vor ungewolltem Angriff zu schützen, liegt im Gewebe ein physiologischer Überschuss an Cathepsininhibitoren vor.

### 1.2.1 Cathepsin B und L

Cathepsin B und L konnten in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen werden. In der Leber in Hepatozyten und Kupfferzellen [87, 227], und zwar in Sekundärlysosomen, Endosomen und Autophagosomen [228]. In den Nieren, als punktförmige Anfärbung der Lysosomen hauptsächlich in den proximalen Tubuli, in welchen auch die Heterophagozytose von Proteinen aus dem Ultrafiltrat stattfindet [229, 230, 164]. Im Pankreas wurde Cathepsin B in B- und A-Zellen nachgewiesen [88], und es wandelt *in vitro* Proinsulin in Insulin um [9]. Weiterhin wurde Cathepsin B in der Nebennierenrinde [196] und Cathepsin B und L in Vagina, Milz, Makrophagen, Nervensystem und in geringer Konzentration in Herz, Skelettmuskel, Gastrointestinaltrakt, Testis und Lymphozyten gefunden [108, 8].

Die Cathepsine B und L wurden mit Vorgängen wie Lungenentwicklung [23], Umwandlung des Endometriums [96], Tumormetastasierung [150, 180, 181, 130] und

der Immunfunktion in Verbindung gebracht.

Als gesichert gilt, dass Cathepsin B, Cathepsin L (in Epithelzellen des Thymus) und Cathepsin S (in B-Zellen und dendritischen Zellen) dafür verantwortlich sind, Proteine in antigen wirksame Peptide zu spalten. Sie spalten ebenfalls die invariante Kette, die ansonsten das MHC II-Molekül blockiert [207, 136, 111, 11]. Desweiteren spielen Cathepsin B und L eine Rolle bei der Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen [118, 231], T-Lymphozytenmigration und -degranulation [7, 113].

Cathepsin B und L gelten als wichtige, am Umbau von Bindegewebe und Knorpelsubstanz beteiligte Enzyme [43]. Beide Enzyme werden in Phagozyten exprimiert [131, 40, 153], und der Proteinumsatz von Makrophagen ließ sich *in vitro* durch einen Cathepsininhibitor deutlich senken [167]. Zu den Substraten zählen Elastin, Laminin, Fibronectin und verschiedene Kollagentypen [21, 175, 117].

### 1.2.2 Cathepsin K

Cathepsin K wurde erstmals beim Durchsuchen einer Kaninchen-cDNA-Osteoklasten-Bibliothek identifiziert [202]. Humanes Cathepsin K wurde - damals noch Cathepsin O bzw. O2 benannt - als erstes relativ zeitgleich von Brömme et al. und Shi et al. isoliert und molekular geklont [17, 168].

Cathepsin K spaltet hochpotent verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix. Es ist in der Lage Typ I-Kollagen komplett aufzulösen [61] und spaltet Typ II- und denaturiertes Kollagen. Die elastinolytische Aktivität wird bei pH 5,5 als 9 mal höher als die des Cathepsin L angegeben [99, 18].

Cathepsin K wird als diejenige Protease angesehen, die einen Haupt-, wenn nicht den Hauptanteil an Knochenumbauprozessen hat [210, 90]. Cathepsin K-Knockout-Mäuse leiden unter Osteopetrose, einer der Glasknochenkrankheit ähnlichen Erkrankung [161], und die erbliche Erkrankung Pyknodysostosis deformans ist am wahrscheinlichsten durch eine Mutation des Cathepsin K-Gens bedingt [62].

Durch Inhibition von Cathepsin K lassen sich Knochenumbauprozesse hemmen [210, 90]. Es stellte sich heraus, dass die sogenannten Cross-linked N-Telopeptide, die als Marker für gesteigerten Knochenabbau z.B. bei Osteoporose dienen, maßgeblich durch Cathepsin K aus Typ I-Kollagen freigesetzt werden (in geringerem Ausmaß auch durch Cathepsin S, L und B) [4].

Neuere Untersuchungen befassen sich zunehmend mit der Funktion von Cathep-

sin K in anderen Geweben und bei anderen Erkrankungen. Cathepsin K mRNA wurde in Fibroblasten und in geringerem Ausmaß in mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen im Zusammenhang mit Rheumatoidarthritis nachgewiesen [146, 82].

In arteriosklerotischen Gefäßen fanden sich Cathepsin K und S in Schaumzellen, Endothelzellen der Intima, glatten Muskelzellen und Makrophagen, während in gesunden Arterien nur eine vernachlässigbare Expression zu finden war [192].

Zwei weitere Untersuchungen befassten sich mit Cathepsin K bei granulomatösen Entzündungsreaktionen. Aus Echinokokkus granulosis-Zysten konnte Cathepsin K sowohl aus der Zystenwand als auch aus mehrkernigen Riesenzellen und Epitheloidzellen isoliert werden [47]. Auch in mehrkernigen Riesenzellen und Epitheloidzellen bei Sarkoidose, Tuberkulose, Fremdkörperreaktion und Sarkoid-ähnlichen Reaktionen im Zusammenhang mit malignen Tumoren konnte immunhistologisch und durch in situ-Hybridisierung Cathepsin K nachgewiesen werden. Bei Riesenzellen und Epitheloidzellen handelt es sich um stimulierte Phagozyten. Ortsständige Makrophagen dagegen exprimierten zwar Cathepsin B und L, aber kein Cathepsin K. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, Cathepsin K könnte ein Differenzierungsmarker für die Ausreifung von Makrophagen sein und eine Verstärkung der proteolytischen Kapazität dieser Zellen anzeigen [22].

### 1.3 Amyloid und proteolytische Enzyme

Amyloidfibrillen galten lange Zeit als resistent gegen chemische, physikalische und proteolytische Agenzien [138, 102].

Für Kollagenase, sowie Kollagenase nach Vorinkubation mit Hyaluronidase konnte kein Effekt auf AA-Amyloid nachgewiesen werden (als positive Kontrolle diente die erfolgreiche Spaltung von Kollagenfibrillen durch die oben genannten Enzyme) [33].

In Experimenten mit AA- und AL-Amyloid wurde eine Degradation von 90% des Fibrillenproteins für Pronase, 80% für Nagarse und 70% für Papain postuliert [102]. In einer späteren Arbeit charakterisierten die Autoren die Spaltung der Amyloidfibrillen durch Pronase elektronenmikroskopisch als sehr unvollständig [169].

Es konnten keine Veränderungen in der Aktivität von Cathepsin D, saurer Phosphatase und  $\beta$ -Glukuronidase im Verlauf der experimentellen AA-Amyloidose der Maus festgestellt werden [110], woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass

eine Hydrolyse von Amyloid nur in minimalem Ausmaß stattfinden könne.

Dennoch gibt es Hinweise für einen möglichen Abbau von Amyloid. Bei effizienter Therapie der Grundkrankheit, die letzten Endes dazu führt, dass das entsprechende Vorläuferprotein nicht mehr nachgeliefert wird, läßt sich im Zeitverlauf eine deutliche Besserung der Funktion der betroffenen Organe nachweisen. In Fallbeschreibungen konnte auch eine Abnahme der Amyloidablagerungen direkt gezeigt werden [220, 176, 199, 49, 38, 75, 80, 198, 66].

Auch in experimentellen Studien gibt es Hinweise, dass Amyloid prinzipiell abbaubar ist. In einer elektronenmikroskopischen Untersuchung einer Makrophagenzellkultur nach Co-Kultivierung mit Amyloidfibrillen nahm mit zunehmender Inkubationszeit die räumliche Assoziation zwischen Makrophagen und Amyloidfibrillen zu. Es bildeten sich intrazytoplasmatisch Amyloidfibrillen enthaltende Vesikel, die mit der Zeit durch Typ III- und Typ IV-Vakuolen ersetzt wurden, die sich typischerweise im Rahmen eines lysosomalen Abbaus bilden [170, 169].

In humanem Serum wurden Enzyme, wahrscheinlich Serinproteasen, gefunden, die die Sirius-Rot-Bindung von AA-Amyloid zerstören konnten, was bedeutet, dass durch die Inkubation wenigstens eine Konformationsänderung der Amyloidfibrillen stattgefunden haben muss. Durch Inkubation mit Chymotrypsin, Trypsin, Kallikrein und Elastase war der gleiche Effekt zu erzielen [201].

Publiziert worden ist eine Spaltung von isolierten AA-, AL-, ApoA-I und A $\beta$ -Fibrillen durch Trypsin und Chymotrypsin (Pankreas), Pronase, sowie Elastase und Cathepsin G aus humanen neutrophilen Granulozyten [200]. Wobei die Spaltung durch Cathepsin G als am effektivsten beschrieben worden ist.

Desweiteren ließ sich die Degradation von AA-Amyloid in Zellkulturexperimenten durch humane Monozyten nachweisen, in verstärktem Maße noch, wenn diese durch Inkubation mit CRP aktiviert worden waren [200].

Die Infiltration des Amyloids durch Makrophagen ist wiederum bei der Inselamyloidose des Pankreas und der dialyseassoziierten Amyloidose in histologischen Schnitten ein regelmäßig nachweisbares Phänomen [42, 3, 60]. Durch Markierung wurden Fibrillen elektronenmikroskopisch mit Lysosomen assoziiert innerhalb der Makrophagen gefunden. Sie waren nicht assoziiert mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum als Ort der Proteinsynthese. Daher wurden die Makrophagen in den Gewebeschnitten als sekundäres Phänomen interpretiert und eine Phagozytose



der Amyloidablagerungen postuliert [81].

Auch bei anderen Amyloidosen, einschließlich AA- und AL-Amyloidose, konnten regelmäßig Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen in direkter Nachbarschaft zu den Ablagerungen nachgewiesen werden [157, 154, 15, 141], und es gibt Hinweise für eine Proteolyse nach Fibrillenbildung [154]

Proteolyse könnte also sowohl bei der Bildung des Amyloids, als auch bei dessen Abbau eine pathogenetisch wichtige Rolle spielen. Verschiedene Proteasen sind im Zusammenhang mit Amyloidosen untersucht worden.

Bei Patienten mit AA-, AL-, AApoA-1-, ATTR- und A $\beta$ <sub>2</sub>M-Amyloidose konnte neutrophile Elastase- und Cathepsin G-Aktivität assoziiert mit den isolierten Amyloidfibrillen und teilweise auch immunhistochemisch nachgewiesen werden [190].

MMP-1, -2 und -3 wurden immunhistochemisch benachbart zu AA-Amyloid in 48 bis 80% der Proben und innerhalb von AA-Amyloid in 8 bis 16% gefunden. In Proben von Patienten mit AL-Amyloidose waren sie neben dem Amyloid in 25 bis 60% jedoch nicht innerhalb der Ablagerungen nachweisbar [132].

Cathepsin B und D fanden sich innerhalb von Amyloidplaques des präfrontalen Cortex bei M. Alzheimer. Ebenso fand sich eine starke Immunreaktivität in degenerierenden Perikarya innerhalb der Amyloidplaques [26]. Hieraus wurde geschlossen, dass die absterbenden Neurone der Ursprung der Cathepsine sind und ihre Freisetzung zur Spaltung des  $\beta$ -Amyloid Vorläuferproteins in amyloidogene Fragmente führt, zumal für Cathepsin B eine solche Spaltung nachgewiesen worden ist [121]. Trotz alledem ließ sich aber auch zeigen, dass sich durch Applikation eines lysosomalen Aktivators die Amyloidablagerungen im Alzheimer-Mausmodell verringern ließen [12].

Cathepsin K konnte in mehrkernigen Riesenzellen neben Amyloidablagerungen bei 55% der Patienten mit AA- und 58% der Patienten mit AL-Amyloid nachgewiesen werden. Eine Immunfärbung der Ablagerungen selbst war bei 45% der AA- und 25% der AL-Amyloid-Patienten nachweisbar (bei insgesamt 23 Patienten) [157]. Cathepsin B und L wurden bei der Untersuchung von Proben von 21 Patienten in allen Fällen neben dem Amyloid gefunden, hauptsächlich in Makrophagen, Myozyten und Endothelzellen von Gefäßen. In 30% der Fälle wurden auch Cathepsin B und L positive mehrkernige Riesenzellen gefunden [15]. Cathepsin K war in der Lage, sowohl SAA als auch AA-Amyloidproteine in vitro vollständig zu spalten [156, 157].

Für Cathepsin B ist gezeigt worden, dass sich bei Inkubation mit SAA neun amyloidogene Fragmente bilden, während Cathepsin L durch Spaltung der N-terminalen Region nicht-amyloidogene Fragmente generiert [156]. Auch für AA-Amyloidproteine selbst konnte die Degradation durch Cathepsin B und L in vitro demonstriert werden [156].

# Kapitel 2

## Fragestellung

Sowohl die Bildung von Amyloid als auch ein möglicherweise stattfindender Abbau sind eng assoziiert mit proteolytischer Spaltung und mit den Lysosomen als physiologischem Ort der Proteolyse. Lysosomen sind reich an Cysteinproteasen wie Cathepsin B, K und L, die u.a. beim Umbau von Binde- und Knochengewebe eine wichtige Rolle spielen und hochpotent in der Spaltung von Elastin und verschiedenen Kollagentypen sind.

In Voruntersuchungen ist gezeigt worden, dass die Cathepsine B, K und L in räumlicher Nähe zu humanem AA- und AL-Amyloid auftreten. Sie sind in der Lage, im Falle des AA-Amyloids sowohl die Vorläufer- als auch die Amyloidproteine zu spalten.

Die Hypothese der vorgelegten Arbeit ist, dass Cathepsin B, K und L an der Pathogenese der systemischen Amyloidosen beteiligt sind. Die Zielsetzung war, zu untersuchen, ob Cathepsine nicht nur AA- sondern auch AL-Amyloidproteine spalten können und in welcher räumlich-zeitlichen Beziehung Cathepsin-exprimierende Entzündungszellen zu Ablagerung und Regression von Amyloid stehen.

Hierzu wurden Degradationsexperimente mit aufgereinigten AL-Amyloidproteinen und nativen Amyloidablagerungen bei saurem und physiologischem pH, unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Cathepsinkonzentrationen durchgeführt.

Im Tierexperiment wurde nach Auslösung einer systemischen AA-Amyloidose geprüft, ob im Verlauf von Entstehung und Verschwinden von Amyloidablagerungen ein räumlicher und/oder zeitlicher Zusammenhang mit der Expression von Cathepsin B, K und L besteht. Hierbei wurde die Verteilung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Betrachtung miteinbezogen.

Anhand der Untersuchung von Nude- und SCID-Mäusen wurde der immunmodulatorische Einfluss von T-Zell- bzw. kombinierter B- und T-Zell-Defizienz auf Amyloidogenese und Cathepsinexpression untersucht.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Gewebe

Die für die Versuche verwendeten Amyloidproteine stammten von zwei Patienten mit systemischer Amyloidose. Patient 1 war 50-jährig an einer AL-Amyloidose bei multiplem Myelom verstorben. Proben aus Herz und Milz wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Patient 2 (AR) war 57 Jahre alt und litt an einer primären AL-Amyloidose. Aufgereinigte Amyloidproteine von Patient 2 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Knut Sletten (Biotechnology Center, Universität Oslo) zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

##### Degradationsexperimente

Von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) wurden bezogen: Aceton, Acrylamid/Bisacrylamid, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumphosphat, Natronlauge, Salzsäure und SDS. Ammoniumpersulfat, DTT, EDTA, Guanidin-HCl, Natriumcitrat, PonceauS-Lösung, TEMED, Tris-Base, Tris-HCl und Tween 20 wurden von der SIGMA-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen. Es wurden Essigsäure und Methanol von J. T. Baker (Deventer, NL) verwendet. Aquacite II, Harnstoff, Perjodsäure wurde bei Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Von der Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) wurden  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bovines Serumalbumin und Coomassie-Blau geliefert. Schiffbase stammte von Fisher Scientific (Pittsburgh, USA), Ethanol aus der Zentralapotheke

der Medizinischen Fakultät, Glycerol von Invitrogen (Paisley, UK), Glycin von ICN Biomedical Inc (Aurora, Ohio, USA), NBT/BCIP von Rockdale (Illinois, USA) und E 64 von Bachem Biochemica (Heidelberg).

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BioRad D<sub>C</sub> Protein Assay, BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA) bestimmt. Sterilfiltration erfolgte mit Millex-Millipore Filtern der Millipore Corporation (Bedford, MA, USA). Als Dialysemembran diente eine Spectra/Por molecularporous membrane MWCO 6-8 000 von Spectrum Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, CA, USA). Membranen zum Einschweißen der Gele stammten von der Firma BioRad (München), die ImmunoPure Protein A-Säule und West Pico Supersignal von Pierce (Rockford, Illinois, USA). Die Proteine wurden auf Hybond-ECL-Membranen von Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) geblottet.

### **Histochemische und Immunhistochemische Färbungen**

Kongorot, Mayer's Hämatoxylin, Gill's Hämatoxylin, DAKO Target Retrieval Solution, DAKO Protein Block wurden bei der Dako Corporation (Carpinteria, CA, USA) bezogen, Esel- und Schafserum von Chemicon International (Temecula, CA, USA). Americlear wurde bei der Baxter Healthcare Corp. (Deerfield, Illinois, USA), SuperMount Permanent Mounting Medium sowie SuperMount Aqueous Mounting Medium bei BioGenex Laboratories (San Ramon, CA, USA) und Super Block bei SkyTek Laboratories (Utah, USA) eingekauft. Avidin und Biotin sowie Wasserstoffperoxid stammten jeweils von Vector (Burlingame, CA, USA).

Als gebrauchsfertige Kits wurden der AS-D-Chloracetat-Esterase-Kit von SIGMA Diagnostics (St. Louis, USA) zur Anfärbung von neutrophilen Granulozyten, der InnoGenex IHC Kit (InnoGenex, SanRamon, CA, USA) für die Makrophagenfärbung und der DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für die Substratreaktion (jeweils letzter Färbeschritt) benutzt.

### 3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.1:

Färbung	Antikörper und Verdünnung	Bezugsquelle/Hersteller
Anfärbung der Amyloidproteine - Primäran-tikörper	polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper gegen humane AL-Amyloidproteine von Patient 1, 1:10 000 bis 1:20 000	Pineda-Antibody-Service, Berlin
Sekundäran-tikörper für die Testung des Anti-AL-Antikörpers	an alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, 1:1000	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Sekundäran-tikörper für die Chemilumineszenzfärbung	an Merrettichperoxidase gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, 1:50 000	Pierce Rockford, Illinois, USA
Anfärbung von Makrophagen - Primäran-tikörper	Anti-F4/80-Ratte-Anti-Maus-IgG, 1:100	Serotec, Oxford, UK
Anfärbung von Makrophagen - Sekundäran-tikörper	Ziege-Anti-Ratte-IgG	InnoGenex DAB Kit, San Ramon, USA
Anfärbung von Cathepsin B - Primäran-tikörper	Ziege-Anti-Maus-IgG, 1:5000	Institut für Immunologie, OvG-Universität, MD
Anfärbung von Cathepsin L - Primäran-tikörper	polyklonaler Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper (D-20), 1:75	SantaCruz BT Inc, Santa Cruz, USA
Anfärbung von Cathepsin K - Primäran-tikörper	polyklonaler Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, 1:100	Santa Cruz BT Inc, Santa Cruz, USA
Cathepsinfärbung - Sekundäran-tikörper	an DAB gekoppelter Esel-Anti-Ziege-IgG-Antikörper, 1:1500	Chemicon International, Temecula, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation der Amyloidproteine

Die Amyloidproteine wurden mit der Wasserwaschmethode nach Skinner [177] isoliert. Hierzu wurden jeweils 6 g Milzgewebe in 60 ml 0,9% NaCl-Lösung homogenisiert, gleichmäßig auf Zentrifugenröhrchen verteilt und anschließend mit 2 500xg für 30 Min. bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgegossen und verworfen. Der für die weiteren Homogenisierungen benötigte Tris-Base-Puffer wurde aus 7,35 g Natriumcitrat und 0,61 g Tris-Base auf 1 Liter deionisiertem Wasser angesetzt und auf pH 8 mittels Salzsäure eingestellt. Die entstandenen Pellets wurden in 60 ml NaCl homogenisiert, wieder auf Zentrifugenröhrchen verteilt, danach für 30 Min. bei 2 500xg zentrifugiert und die Überstände verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die daraus entstehenden Pellets wurden in 60 ml Tris-Base-Puffer homogenisiert, für 30 Min. bei 2 500xg zentrifugiert und die Überstände verworfen. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Dann erfolgte die Homogenisierung und Zentrifugation in 60 ml NaCl für jeweils 30 Min. bei 2 500xg, insgesamt fünfmal. Die entstandenen Pellets wurden nach Abgießen der Überstände zweimal in 60 ml deionisiertem Wasser bei 2 500xg für 200 Min. homogenisiert und zentrifugiert. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde in deionisiertem Wasser für 170 Min. bei 2 500xg ausgeführt. Die Überstände der letzten drei Zentrifugationsschritte wurden abgegossen und bei -20° C aufbewahrt. Auf den so erhaltenen Pellets hatte sich eine weißliche Schicht gebildet, die die Amyloidproteine enthielt.

### 3.2.2 Gelfiltration

Kleinere Proben der amyloidproteinhaltigen Schicht der Pellets wurden in Aceton entfettet, in Probenpuffer aus 6 M Guanidin-HCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0,2% EDTA und 0.1 M DTT (nach [213]) gelöst und über Nacht inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und steril filtriert.

Eine Sephacryl S-100HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen deionisierten Wassers gespült. Das Äkta prime-Chromatographiesystem (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde mit deionisiertem Wasser, Ethanol und anschließend deionisiertem Wasser gespült. Die Säule und der Probenschlauch wurden mit dem zweifa-



chen Säulenvolumen an Elutionspuffer aus 8 M Harnstoff und 0.01 M Natriumcitrat-HCl pH 3 (nach [213]) über Nacht equilibriert.

Die sterilfiltrierte Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit dem Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1,3 ml/min bzw. 2,2 ml/min aufgetrennt. Chromatographisch bei 280 nm und spektralphotometrisch wurde die relative Proteinkonzentration der einzelnen gesammelten Fraktionen bestimmt.

Die das Fibrillenprotein enthaltenden Fraktionen wurden in einem Spectra/Por Membranschlauch gegen 5 l deionisierten Wassers über 24 Std. unter mehrfachem Wasserwechsel dialysiert, mittels Aquacite II und SpeedVac ankonzentriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 Aminosäuresequenzierung

Zur Aminosäuresequenzierung des Fibrillenproteins von Patient 1 wurde ein 477Å Proteinsequenzierer, der mit einem 120Å PTH Aminosäureanalysegerät (Applied Biosystems) verbunden war, eingesetzt. Die Proben von Patient 1 wurden über 39 Zyklen analysiert. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Knut Sletten (Biotechnology Center, Universität Oslo) durchgeführt.

Die Aminosäuresequenz von Patient 2 (AR) ist vorbeschrieben [178].

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Der SDS-Gelpuffer wurde aus 90,7 g Tris-Base, 0,75 g SDS in deionisiertem Wasser auf 250 ml angesetzt und der pH mit Salzsäure auf 8.45 eingestellt. Zur Herstellung der Gele wurde zuerst die 16,5%-Polyacrylamid-Lösung aus 3,1 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 1 ml Glycerol, 2,5 ml SDS-Gelpuffer, 0,95 ml deionisiertem Wasser und 50  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat 10% gemischt. Die 10%-Polyacrylamidlösung bestand aus 1,875 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 2,5 ml Gelpuffer, 3,125 ml deionisiertem Wasser und 25  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat. Nach Zugabe von 5,0 bzw. 2,5  $\mu\text{l}$  TEMED wurden die Lösungen zwischen zwei in der entsprechenden Halterung (BioRad, München) fixierten Glasplatten pipettiert. Nach 90-minütiger Aushärtung wurde das Sammelgel aus 0,635 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 1,55 ml Gelpuffer, 4,075 ml deionisiertem Wasser, 50  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat und 5  $\mu\text{l}$  TEMED zupipettiert, mit einem Kamm für die Geltaschen versehen und nochmals 15 Min. lang aushärten gelassen.

Der 2-fach Probenpuffer bestand aus 125  $\mu\text{l}$  0,5 M Tris HCl, 0,24 g Urea, 200

$\mu\text{l}$  10% SDS, 50  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol auf 1 ml deionisiertem Wasser mit wenig Coomassie-Blau. Die Versuchsansätze wurden im Verhältnis 1:1 in diesem gelöst, für 5 Min. auf 100°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die gewünschte Probenmenge wurde auf die Zwei-Phasen-Polyacrylamidgele aufgetragen (nach [163]) und für ca. 90 Min. bei 150 V in einem Elektrophoresesystem (Bio-Rad, München) aufgetrennt. Der hierzu verwandte Elektrodenpuffer wurde als 10-fach Puffer aus 30,38 g Tris-Base, 144 g Glycin und 10 g SDS angesetzt (pH 8.3) und die benötigte Menge vor Benutzung entsprechend verdünnt.

Die Gele wurden entweder im Westernblot weiterverwendet oder mit den unten beschriebenen Färbungen anfärbt und danach 15 Min. in der Konservierungslösung aus 150 ml Ethanol und 25 ml Glycin aufgefüllt auf 500 ml mit deionisiertem Wasser, inkubiert, in Membranen eingeschweißt und trocken gelassen.

### **3.2.5 Coomassieblau-Färbung**

Die Gele wurden für 15 Min. in der Coomassie-Färbelösung aus 1,5 g Coomassie-Blau, 60 ml Methanol, 20 ml Essigsäure auf 200 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, abgedeckt unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend in einer Mischung aus 300 ml Methanol und 100 ml Essigsäure mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, entfärbt.

### **3.2.6 Perjodsäure-Schiff-Reaktion**

Das Gel wurde für 20 Min. in 20% Trichloressigsäure fixiert, einige Min. unter fließend Wasser gewaschen und für 20 Min. in 1% Perjodsäure gelegt. Die Färbung erfolgte in 1% Perjodsäure plus Schiffbase im Verhältniss 1:5 für 10 Min. Nach Abgießen dieser Mischung wurde frische Schiffbase zugegeben, wodurch das Gel aufklarte und die PAS-positiven Banden sichtbar wurden (nach [2]). Es wurde glykosiliertes BSA als Positiv- und ein nichtglykosilierter Proteinstandard als Negativkontrolle verwendet.

### **3.2.7 Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers**

Es wurden Kaninchen nach einem standardisierten Protokoll (Pineda Antibody-Service, Berlin) mit sterilfiltriertem AL-Amyloidprotein von Patient 1 immunisiert. Das Kaninchenblut wurde zentrifugiert, das Serum abpipettiert, mit einem Millex

Millipore Filter sterilfiltriert und 1:1 in 20 mM Natriumphosphatpuffer gelöst. Das Äkta prime-Chromatographiesystem wurde mit deionisiertem Wasser, Ethanol und nochmals deionisiertem Wasser gespült und die Säule mit 20 mM Natriumphosphatpuffer equilibriert.

Ein Milliliter Serumprobe wurde auf die ImmunoPure Protein A-Säule aufgetragen (Säulenvolumen 2 ml) und mit 10 ml Natriumphosphatpuffer nachgespült. Anschließend wurden mit 5 ml 0,1 M Glycin-HCl (pH 2.8) die gebundenen IgG-Antikörper eluiert. Der relative Proteingehalt wurde mittels UV-Absorption bei 280 nm bestimmt und die Peak-Fractionen neutralisiert, ankonzentriert und in TBS-Puffer unter Zusatz von Natriumazid bei 4 °C gelagert.

Die Spezifität und die für die Färbung günstigste Antikörperkonzentration wurde im Westernblot an AA- und AL-Amyloid getestet.

### **3.2.8 Westernblot und Immundetektion**

Proteine in ungefärbten Polyacrylamidgelen wurden mit einem Tank-Blotting-System (Bio-Rad Laboratories, München) auf Hybond-ECL-Membranen übertragen.

Hierzu wurden das Filterpapier und die ECL-Membranen auf Gelgröße zugeschnitten. Gel, Fiberspads und Filterpapiere wurden 10 bis 15 Min. in Blottingpuffer equilibriert. Der Blotting-Puffer bestand aus 3,03 g Tris-HCl, 14,4 g Glycin und 200 ml Methanol mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Membran wurde 1-2 Sek. in Methanol geschwenkt, mit deionisiertem Wasser 1-2 Min. gewässert und 3 Min. im Blotting-Puffer equilibriert.

Das Sandwich wurde in der Reihenfolge Fiberspads, Filterpapier, Gel, ECL-Membran, Filterpapier, Fiberspads zusammengesetzt, in den Elektrodenstand geschoben und im Blottingpuffer gekühlt für 1 Std. bei 100 Volt geblottet.

Nach Entnahme der Membranen aus dem Blottingsystem wurde durch Färbung mit PonceauS-Lösung der Erfolg des Blots überprüft und nach Entfärben mit der jeweiligen Immunfärbung fortgeföhren.

Die Membranen wurden nach dem Blotten zweimal je 5 Min. in TBST-Puffer gespült. Dieser wurde aus 9 g Tris-Base, 68,5 g Tris-HCl und 87,8 g Natriumchlorid als 10-fach Puffer angesetzt, vor Gebrauch entsprechend verdünnt und mit 0,5 ml Tween 20 pro Liter versetzt (pH 7.4 bis 7.6). Nach Blockierung über Nacht mit 3% BSA in TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem als Primärantikörper benutz-

ten Anti-AL-Antikörper (1:10 000 bis 1:20 000 verdünnt in TBST plus 3% BSA, für 90 Min. bei 37°C). Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung abgespült und die Membranen 4 Mal 10 Min. in TBST gewaschen.

Für die Austestung des Primärantikörpers wurden die Membranen mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper als Sekundärantikörper inkubiert (1:1000, 60 Min. bei Raumtemperatur). Dieser wurde wiederum mit deionisiertem Wasser abgespült und die Membranen 4 Mal in TBST für je 10 Min. gewaschen. Als Substrat wurde NBT/BCIP benutzt und die Farbreaktion durch Spülen mit deionisiertem Wasser beendet.

Für die Chemilumineszenzfärbung wurden die Membranen nach dem Anti-AL-Antikörper mit einem an Meerrettichperoxidase gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:50 000, 60 Min. bei Raumtemperatur) inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Membranen wie oben beschrieben in deionisiertem Wasser und TBST-Puffer gewaschen.

Als Substrat diente West Pico Supersignal, welches auf die Membran pipettiert wurde, die auf der Ablage der Fotokammer lag und anschließend in diese eingeschoben wurde. Das erste Foto wurde nach 2 Min. gemacht.

### **3.2.9 Herstellung der humanen Cathepsine**

Rekombinantes humanes Cathepsin B und L wurden freundlicherweise von Dr. Robert Menard (Biotechnology Research Institute, NRCC, Montreal) zur Verfügung gestellt [32].

Rekombinantes humanes Cathepsin K wurde freundlicherweise von Dieter Brömme (Department of Human Genetics Mount Sinai School of Medicine, New York) überlassen.

### **3.2.10 Degradationsexperimente mit monomeren Amyloidproteinen**

Für die Degradationsexperimente wurden die aufgereinigten Amyloidproteine der Patienten 1 und 2 benutzt. Der Reaktionspuffer wurde als Zweifach-Puffer aus 0,6 ml konzentrierter Essigsäure, 0,4 g Natronlauge, 10 mM EDTA und 5 mM DTT, welches kurz vor Gebrauch zugegeben wurde, angesetzt. Der pH wurde mit konzentrierter Essigsäure, bzw. Natronlauge auf pH 5,2, 5,5 oder 7,4 eingestellt. Der Puffer

wurde im Inkubator auf 37 °C angewärmt und 1:1 mit den in deionisiertem Wasser gelösten Amyloidproteinen gemischt. Die Cathepsine wurden je nach der benötigten Verdünnung entweder direkt zu diesem Ansatz pipettiert oder im Reaktionspuffer vorverdünnt und anschließend sofort dazupipettiert. Die Eppendorftubes mit den Versuchsansätzen wurden gevortext und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 10 Min., 30 Min., 2 Std., 4 Std. und 12 Std. Die Inkubation wurde mit 20 mM E 64 unterbrochen und die Versuchsansätze bei -20 °C gelagert.

Als Kontrollen dienten ein Ansatz, der ohne Enzym bei -20 °C gelagert worden war, ein Ansatz, der ohne Enzym 12 Std. unter Versuchsbedingungen inkubiert worden war und ein Ansatz, der mit Enzym unter Zusatz von 20 mM E 64 12 Std. unter Versuchsbedingungen inkubiert worden war.

Die optimalen Versuchsbedingungen für die Spaltungsexperimente und deren Auswertung mittels Fluoreszenzfärbung wurden in Vorversuchen ausgetestet. Danach wurden die Versuche in der Weise durchgeführt, dass sich in jedem Ansatz 5 µg Fibrillenproteine gelöst in 2,5 µl Reaktionspuffer befanden. Zu diesen Ansätzen ist jeweils 0,25 µl Enzym-Reaktionspuffer-Mischung pipettiert worden. Cathepsin K und L wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,15 µM, 30 nM und 15 nM eingesetzt, Cathepsin B in einer Konzentration von 1,5 µM, 0,3 µM und 0,15 µM.

Es wurde der gesamte Ansatz aus dem Eppendorftube in eine Geltasche pipettiert, so dass man von einer Ausgangsproteinmenge von 5 µg ausgehen kann. Elektrophorese, Westernblot und Chemilumineszenzfärbung wurden wie beschrieben ausgeführt.

### **3.2.11 Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen nichtfixierten Gefrierschnitten**

Für die Degradationsexperimente mit intakten, nativen Amyloidablagerungen wurden je ein 10 µm dicker unfixierter Gefrierschnitt der Milz von Patient 1 in ein Eppendorftube geschnitten. Das Vorhandensein von Amyloid wurde durch Anfertigen von Kongorotfärbungen am jeweils ersten und letzten Gefrierschnitt der Schnittserie überprüft. Der Reaktionspuffer und anschließend das Enzym wurden in die Eppendorftubes mit den Gefrierschnitten pipettiert und die einzelnen Ansätze bei 37 °C 12 Std. inkubiert. Das Endvolumen je Ansatz betrug etwa 7,5 µl. Cathepsin K und L wurden in Konzentrationen von 1 µM und 0,15 µM eingesetzt, Cathepsin B in einer

Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 1,5  $\mu\text{M}$ . Die Versuche wurden bei pH 5.2, 5.5 und 7.4 durchgeführt. Die Blockierung des Enzyms nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte mit E 64 (20 mM), die Ansätze wurden anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  weggefroren.

Als Negativkontrollen dienten ein Gefrierschnitt, der im Reaktionspuffer bei  $37^\circ\text{C}$  ohne Enzym 12 Std. inkubiert worden war, ein Schnitt, der unter Zugabe der entsprechenden Enzymkonzentration plus E 64 (20 mM) 12 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert worden war und ein Gefrierschnitt, der bis zum Auftragen auf das Gel bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert worden war.

Die Ansätze wurden wie die Versuchsansätze am isolierten Amyloidprotein weiterbehandelt, wobei 1,5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes je Geltasche aufgetragen wurde.

Es ist anzumerken, dass bei diesen Ansätzen durch das geringe Volumen nicht zu ermitteln war, wieviel Protein und auch wieviel Amyloid sich im jeweiligen Ansatz befand. Da alle Schnitte 10  $\mu\text{m}$  dick waren, kann man von einer Protein- bzw. Amyloidmenge in der gleichen Größenordnung ausgehen. Gewisse Schwankungen zwischen den einzelnen Ansätzen müssen aber einkalkuliert werden, weshalb diese Versuchsansätze zwar ebenfalls mittels Chemilumineszenzfärbung angefärbt wurden, auf eine Angabe der Proteinmenge in Prozentwerten jedoch verzichtet wurde.

Für jedes der drei Enzyme wurde ein weiterer Versuchsansatz für sauren und physiologischen pH-Wert auf Objektträgern ausgestrichen und nach Antrocknung und Methanolfixierung mit Kongorot angefärbt. Als Kontrollen dienten Gefrierschnitte, die ohne Enzym inkubiert worden waren. Die Ansätze wurden unter dem Polarisationsmikroskop auf die Amyloidmenge hin verglichen.

### **3.2.12 Auswertung der Degradationsexperimente**

Anhand der mittels Chemilumineszenzfarbstoff gefärbten Membranen wurde eine Quantifizierung der Proteinmenge in den einzelnen Versuchsansätzen vorgenommen. Hierzu wurden die Programme GeneGenome und GeneTools (Syngene BioImaging Systems, Synoptics Ltd.) verwandt, mittels derer die Membranen eingescannt und die Intensität des Chemilumineszenzsignals in den einzelnen Bahnen analysiert werden konnte.

Das Messsystem wurde kalibriert, indem Membranen mit verschiedenen Konzentrationen der Amyloidproteine von Patient 1 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinmenge pro Bahn) mit der Chemilumineszenzfärbung angefärbt und die

Signalintensitäten gemessen wurden. Dies ergab, dass die Signalintensität in dem in den Versuchsansätzen verwandten Konzentrationsbereich linear verläuft (Pearson-scher Korrelationskoeffizient  $r=0.95$ ), also der vom Rechner ausgegebene Messwert direkt mit der Proteinmenge korreliert.

Die Auswertung der einzelnen Versuchsansätze erfolgte folgendermaßen: Das Computerprogramm gibt anhand der Fläche und Intensität des Chemilumineszenzsignals ein Rohvolumen für jede einzelne Bahn an. Das Rohvolumen des Kontrollansatzes wurde gleich 100% gesetzt. Anhand des Rohvolumens in den Bahnen mit den Degradationsansätzen auf derselben Membran wurde die Relation zwischen dem Kontrollansatz und den Degradationsansätzen errechnet und für die entsprechende Inkubationszeit ein Wert in Prozent des Ausgangswertes angegeben.

### **3.2.13 Induktion der AA-Amyloidose bei der Maus**

Bei den Mäusen handelte es sich um Balb/c, SCID (C.B.-17/IcrCrl-scid-bgBR) und Nude (Balb/cAnCrl-nuBR)-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, MA).

AEF wurde gemäß dem Protokoll von Skinner et al. isoliert [177]. Die AA-Amyloidose wurde durch jeweils zwei Injektionen ausgelöst: Die erste mit 500  $\mu$ l 1% Silbernitrat s.c. in den Nackenbereich, die zweite zeitgleich mit 100  $\mu$ g Amyloid-Enhancing-Factor in 100  $\mu$ l sterilem Phosphatpuffer gelöst i.v. in die Schwanzvene. Eine Kontrollgruppe der Balb/c-Mäuse erhielt nur die Silbernitrat-Injektion als Entzündungsstimulus. Jeweils drei Tiere aus Balb/c-, Nude-, SCID- und Kontrollgruppe wurden an den Tagen 0, 10, 17, 24 und 35 durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden vor den Injektionen und vor der Tötung durch Isofluraninhalation anästhesiert.

Nach der Tötung wurden Leber, Milz, Pankreas, Niere, Nebenniere, Herz, Lunge und Zunge entnommen, in Carson's Fixationsmittel fixiert und in Paraffin eingebettet. Alle Organe eines Tieres wurden in demselben Paraffinblock eingebettet. Gewebeschnitte von 6  $\mu$ m Dicke wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Glasobjektträger aufgezogen. An den Schnitten wurden die unten aufgeführten Färbungen ausgeführt.

### **3.2.14 Kongorotfärbung**

#### **Entparaffinierung**

Die Gewebeschnitte wurden zweimalig für je 5 Min. in Americlear entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 95%, 80%, 70%) und deionisiertem Wasser für je 1 Min. rehydriert.

#### **Färbung**

Für die Kongorotlösung wurde 2 g Kongorot, 0,5 g Kalilauge, 200 ml Ethanol und 50 ml deionisiertes Wasser über Nacht gründlich vermischt, filtriert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden in Kongorotlösung für 30 Min. gefärbt. Nach Gegenfärbung in Mayer's Hämatoxylin und kurzem Waschschrift erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 95%, 100%) und Americlear und schließlich die Einbettung in PermanentemEDIUM. Die Menge und Lokalisation der Amyloidablagerungen wurde unter dem Mikroskop (Carl Zeiss) durch die typische apfelgrüne Polarisationsfarbe im polarisierten Licht beurteilt.

### **3.2.15 AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung**

Alle Reagenzien sowie 40 ml deionisiertes Wasser wurden auf 37 °C erwärmt. 1 ml Natriumnitrit und 1 ml FastRed Violet LB Base-Lösung wurden gemischt und für 10 Min. inkubiert. Die Mischung wurde zusammen mit 5 ml Trizmal 6.3-Puffer-Konzentrat dem vorgewärmten deionisiertem Wasser zugefügt und gut verrührt. 1 ml Naphthol-AS-D-Chloracetat-Lösung wurde zugemischt. Die Objektträger mit den entparaffinierten Gewebeschnitten wurden in die Färbelösung gestellt und für 1 Std. dort belassen. Nach Spülen in fließendem Wasser wurde in Gill's Hämatoxylin gegengefärbt und die fertigen Schnitte in wässrigem Medium eingedeckt.

### **3.2.16 Immunhistochemie**

Die Schnitte wurden wie oben beschrieben entparaffiniert, mit DAKO Target Retrieval Solution für 30 Min. bei 95 °C vorbehandelt und für 20 Min. bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden folgende Blockierungen vorgenommen: 3% Hydrogenperoxid für 1 Std., Super Block für 5 Min., 5% Serum der Spezies aus der



der Sekundärantikörper stammte (Ziege bzw. Esel) für 20 Min., Avidin 15 Min., Biotin 15 Min., 3% BSA für 20 Min., DAKO Protein Block 5 Min. Die Waschschrirte wurden zwischen den Blockierungen jeweils mit PBS (pH 7,4), TBST und nochmals PBS für je 5 Min. durchgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4 ° C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Hierbei wurde Anti-F4/80 in einer Verdünnung von 1:100, Anti-Cathepsin B 1:5000, Anti-Cathepsin K 1:100 und Anti-Cathepsin L 1:75 eingesetzt. Anschließend wurden die Schnitte in PBS, TBST und PBS für insgesamt 1 Std. gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 20 bis 30 Min. Der für die Cathepsinfärbungen verwendete Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt. Anschließend wiederum Waschschrirte für 30 Min. in PBS - TBST - PBS. Die Schnitte wurden mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 30 Min., wie oben beschrieben, gewaschen. DAB-Substrat und Substrat-Puffer wurden gemischt, auf die Schnitte pipettiert und nach 3 Min. Inkubationszeit unter fließendem Wasser abgespült. Nach Gegenfärbung in Mayer's Hämatoxylin und einem weiteren Waschschrirte in Wasser für 10 Min., wurden die Schnitte kurz in Ammoniumwasser eingetaucht, in deionisiertes Wasser gebracht, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich in SuperMount Permanent Mounting Medium eingedeckt.

Weglassen des Primärantikörpers und Inkubation mit Ziegen- bzw. Eselserum in der entsprechenden Konzentration diente als Negativkontrolle.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Degradationsexperimente

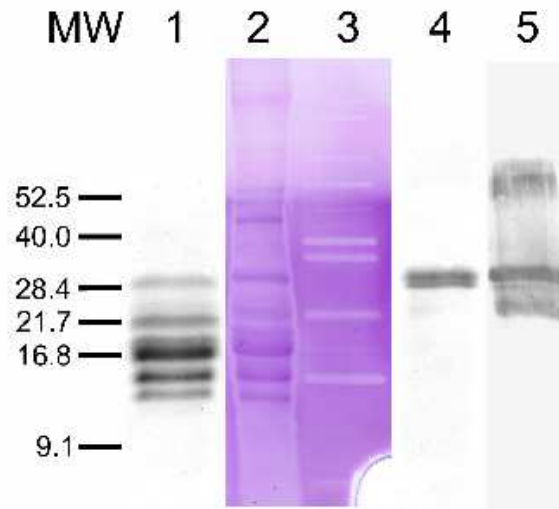
#### 4.1.1 Charakterisierung der AL-Amyloidproteine

Für die Degradationsexperimente wurden AL-Amyloidproteine von zwei Patienten benutzt. Die Amyloidproteine von Patient 1 bestanden sowohl in Coomassieblau gefärbten Polyacrylamidgelen als auch im Anti-AL-Antikörper gefärbten Westernblot aus mehreren Banden im Bereich von 10 bis 31 kDa. Alle Banden waren in der PAS-Färbung positiv, was auf eine Glykosylierung schließen läßt. Die Sequenzierung der einzelnen Banden ergab, dass alle die gleiche N-terminale Sequenz hatten und somit als Amyloidproteine unterschiedlicher Länge interpretiert wurden (Abb. 4.1).

Die AL-Amyloidproteine von Patient 2 waren bereits im Vorfeld sequenziert worden [178]. Die Amyloidproteine dieses Patienten hatten ebenfalls alle die gleiche N-terminale Sequenz, wiesen allerdings keine Glykosylierung auf. Auf dem nach Coomassieblau gefärbten Polyacrylamidgel waren zwei Banden im Bereich von 32 kDa sichtbar. Unter Benutzung des Anti-AL-Antikörpers am Westernblot waren noch zwei weitere Banden nachweisbar. Die Bande oberhalb 52.5 kDa ist am wahrscheinlichsten ein Dimer des Amyloidproteins und die Bande unterhalb 28.4 kDa am ehesten ein proteolytisches Spaltprodukt (Abb. 4.1).

Die N-terminalen Sequenzen aller bei den Patienten 1 und 2 identifizierten Amyloidproteine entsprachen Immunglobulinfragmenten von Leichtketten der  $V_{\lambda}VI$ -Subgruppe. Dies ist eine der zwei häufigsten Leichtkettenuntergruppen, die man bei AL-Amyloidosen findet.

Abbildung 4.1: AL-Amyloidproteine von zwei Patienten



**A** Gelelektrophorese und Coomassieblau-Färbung der Amyloidproteine von Patient 1 (Bahn 1) und Patient 2 (Bahn 4). Durch den Anti-AL-Antikörper wurden bei Patient 2 im Westernblot noch zwei weitere Banden detektiert (Bahn 5). Die Amyloidproteine von Patient 1 waren glykosiliert wie in der PAS-Färbung gezeigt (Bahn 2, man beachte den nicht-glykosilierten Standardmolekulargewichtsmarker auf Bahn 3). Quelle: [15]

**Patient 1:**

```

1          10          20          30
↓          ↓          ↓          ↓
1 39
↓
N F M L T Q P H S V S E S P G K T V I I S C T R S S G S I A N N Y V Q W Y Q
Q
    
```

**Patient 2:**

```

1          10          20          30
↓          ↓          ↓          ↓
D F M L T Q P H S V S E S P G K T V T F S C T G S G G S I A D S F V Q W Y
Q Q
40          50          60          70
↓          ↓          ↓          ↓
R P G S A P T T V I Y D D N Q R P S G V P D R F S G S I D D S A N S A S L T
I S
80          90          100          110
↓          ↓          ↓          ↓
G L K T E D E A D Y Y C E S Y N S N H H V V F G G G T K V T V L G Q P K
A A P S
120          130          140          150
↓          ↓          ↓          ↓
V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K
    
```

**B** N-terminale Aminosäuresequenz von Patient 1, Quelle: [15]. Aminosäuresequenz von Patient 2 [178].

### 4.1.2 Charakterisierung des Anti-AL-Antikörpers

Der durch Immunisierung von Kaninchen mit den aufgereinigten AL-Amyloidproteinen von Patient 1 generierte und aufgereinigte Anti-AL-Antikörper wurde im Western-blot an AA- und AL-Amyloid getestet. AA-Amyloidproteine wurden vom Antikörper nicht detektiert.

Bei Patient 2 detektierte der Antikörper zwei zusätzliche Banden, die in der Coomassieblaufärbung nicht sichtbar waren (Abb. 4.1). Angesichts der Tatsache, dass bei den Austestungen (wie in den Degradationsexperimenten) 5  $\mu\text{g}$  Protein je Bahn eingesetzt wurden, demonstriert dies eine hohe Sensitivität des Antikörpers für  $\lambda$ VI-Leichtketten-Amyloidproteine.

### 4.1.3 Degradationsexperimente mit AL-Amyloidproteinen

Alle drei Proteasen waren prinzipiell in der Lage, die Amyloidproteine beider Patienten zu spalten, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.

Die Untersuchungen wurden hauptsächlich mit den Amyloidproteinen von Patient 1 durchgeführt. Da von Patient 2 nur eine kleine Probe zur Verfügung stand, wurden hier die Versuche mit Enzymkonzentrationen durchgeführt, die sich bei den Proteinen des Patienten 1 als optimal erwiesen hatten.

#### **Cathepsin B**

Cathepsin B baute bei einer Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  und einem pH von 5.2 circa 80% der eingesetzten Amyloidproteinmenge in 12 Std. ab (Abb. 4.2). Dies entspricht einer 10-fach höheren Konzentration im Vergleich zu Cathepsin K und Cathepsin L.

Bei Konzentrationen von 0.3  $\mu\text{M}$  und 0.15  $\mu\text{M}$  spaltete das Enzym lediglich Banden im höhermolekularen Bereich des Proteins 1, was keine messbare Reduktion der Gesamtproteinmenge zur Folge hatte.

#### **Cathepsin L**

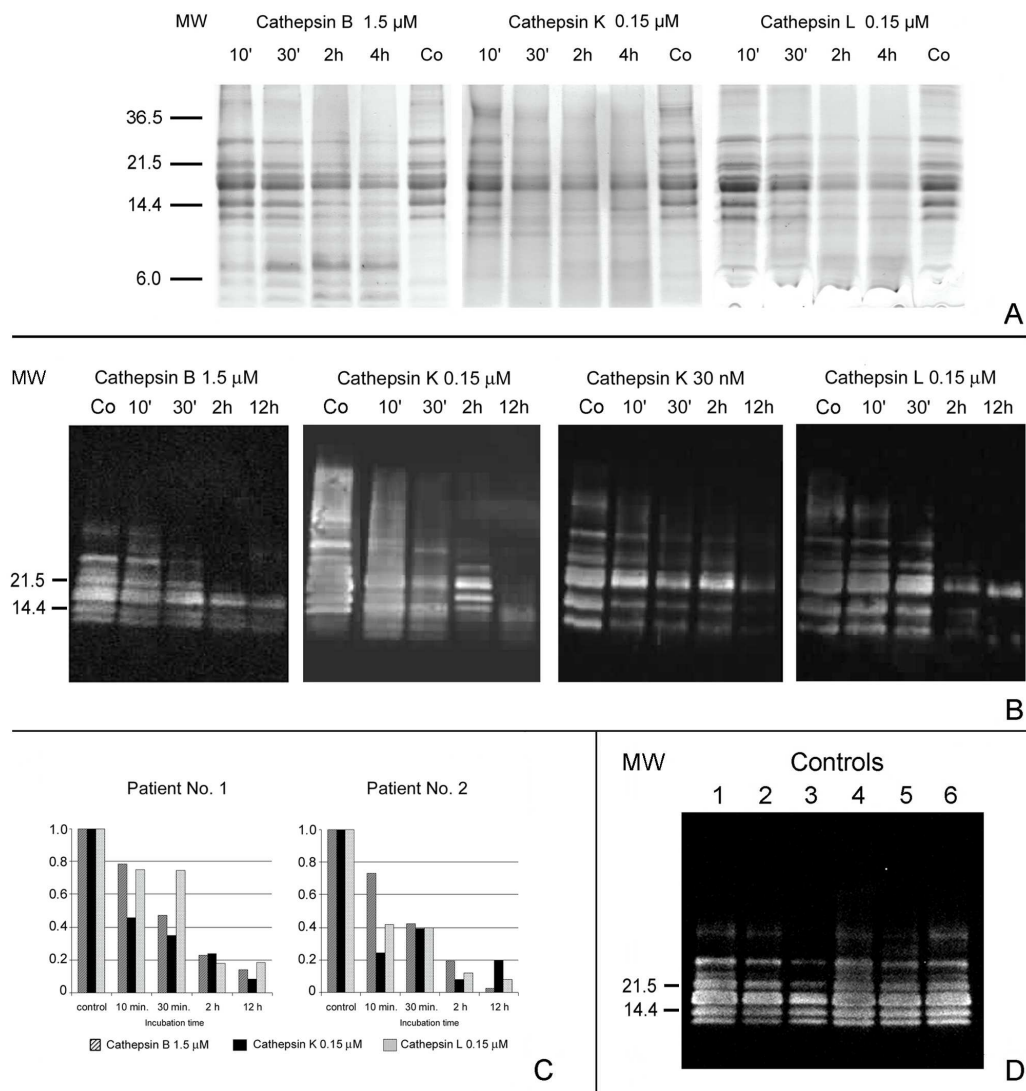
Cathepsin L spaltete die Amyloidproteine bereits bei einer Konzentration von 0.15  $\mu\text{M}$  und pH 5.2 (Abb. 4.2), bei Konzentrationen von 30 nM und 15 nM ließ sich keine Spaltung nachweisen.

## Cathepsin K

Cathepsin K führte bereits bei einer Konzentration von 30 nM zu einer deutlichen Reduktion der Amyloidproteinmenge auf unter 20% des Ausgangswertes (12 Std. Inkubation, pH 5.5, Abb. 4.2). Selbst bei 15 nM ließ sich noch eine geringe Spaltungsaktivität nachweisen (nicht gezeigt).

Bei 0,15  $\mu\text{M}$  war es das einzige der drei Enzyme, das in der Lage war, die Amyloidproteine komplett zu spalten. Die aus dem Chemilumineszenzsignal für das sichtbare Spaltprodukt (Abb. 4.2) ermittelte Proteinmenge lag bei unter 4% des Ausgangswertes. Bemerkenswert war, dass Cathepsin K in dieser Konzentration die Amyloidproteine innerhalb der ersten 10 Min. auf unter 50% des Ausgangswertes reduzierte.

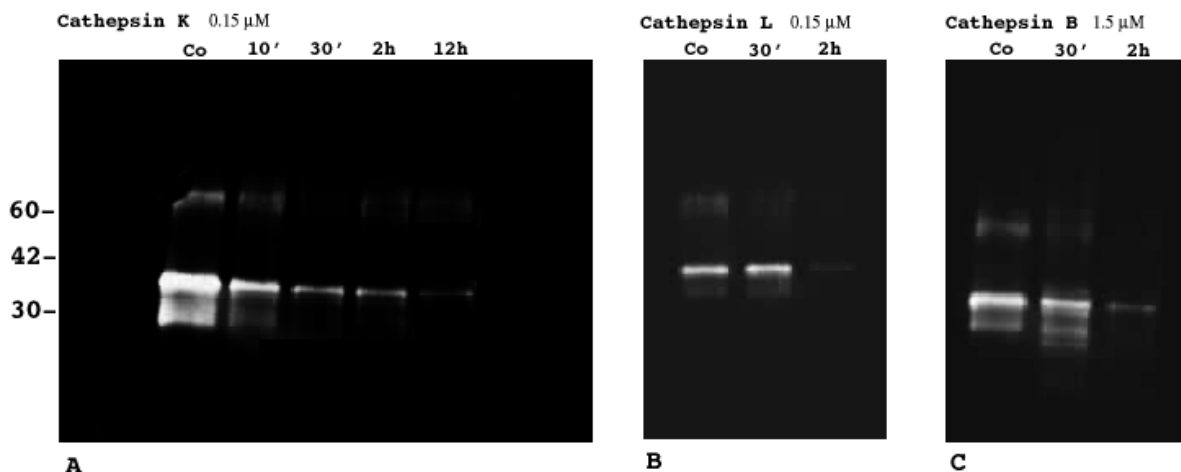
Abbildung 4.2: Degradationsexperimente mit Amyloidproteinen von Patient 1



In vitro Degradationsexperimente mit CathB, CathK und CathL für jeweils 10 Min., 30 Min., 2 Std., 4 Std. und 12 Std. bei 37 °C und pH 5.2-5.5, Inkubation für 4 bzw. 12 Std. ohne Protease diente als Kontrolle. **A** Gelelektrophorese und Coomassieblau-Färbung. **B** Chemilumineszenzfärbung am Westernblot mit Anti-AL-Antikörper. **C** Die Chemilumineszenzfärbungen wurden mit den Programmen GeneGenome und GeneTools eingescannt und analysiert: Die Proteinmenge im jeweiligen Degradationsansatz wurde in Relation zum Kontrollansatz (Inkubation der monomeren Amyloidproteine ohne Protease) dargestellt. Der Kontrollansatz wurde hierbei gleich 1 gesetzt (siehe auch Abb. 4.3). **D** Kontrolleexperimente ohne nachweisbare Degradation: Bahn 1: AL-Amyloidproteine nach Gelfiltration bei -20 °C gelagert, Bahn 2: AL-Amyloidproteine nach 12 Std. Inkubation bei 37 °C ohne Enzym, Bahn 3: Inkubation für 12 Std. bei 37 °C ohne Enzym mit E 64, Bahn 4: Inkubation (12 Std., 37 °C) mit CathK 0.15  $\mu$ M **plus** E64, Bahn 5: Inkubation (12 Std., 37 °C) mit CathB 1.5  $\mu$ M **plus** E64, Bahn 6: Inkubation (12 Std., 37 °C) mit CathL 0.15  $\mu$ M **plus** E64. Quelle: [15]

Das Spaltungsverhalten der Enzyme zeigte keine merklichen Unterschiede zwischen den Fibrillenproteinen von Patient 1 und 2, was darauf hindeutet, dass die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Enzyme hatte.

Abbildung 4.3: Degradationsexperimente mit Amyloidproteinen von Patient 2



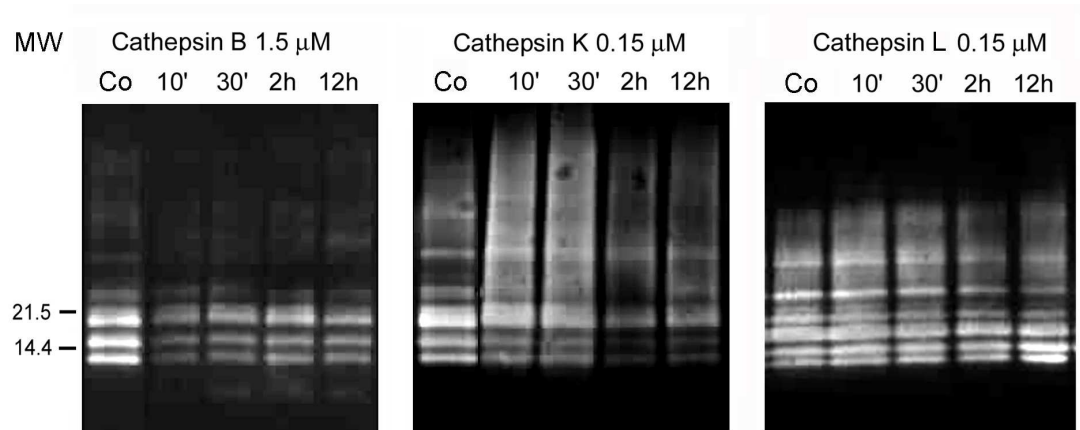
Westernblot und Chemilumineszenzfärbung mit Anti-AL-Antikörper: Inkubation für 10 Min., 30 Min., 2 Std., 12 Std., bei 37 °C, pH 5.2-5.5, Inkubation für 2 Std. bzw. 12 Std. ohne Protease diente als Kontrolle. **A** Inkubation mit CathK 0,15  $\mu$ M, **B** Inkubation mit CathL 0,15  $\mu$ M, **C** Inkubation mit CathB 1,5  $\mu$ M

### Physiologischer pH

Dieselben Experimente wurden bei pH 7.4 an den Amyloidproteinen von Patient 1 durchgeführt. Diese zeigten eine Spaltung der Proteine bei physiologischem pH durch Cathepsin K und Cathepsin B, die jedoch zeitlich eng limitiert war.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. zeigte sich bei Cathepsin K keine weitere Abnahme der Proteinmenge und auch keine Veränderung im Bandenmuster (Abb. 4.4). Für Cathepsin B betrug die Zeitspanne, in der das Enzym das Protein spaltete nur 10 Min. Für Cathepsin L ließ sich keine Degradation des Proteins nachweisen (Abb. 4.4). Immerhin ließ sich in den oben genannten Zeitspannen durch Cathepsin B eine Reduktion des Proteins auf ca. 70% des Ausgangswertes erreichen und durch Cathepsin K auf 60 %. In Kontrollansätzen durch Weglassen der Proteasen und Zufügen von E64 zum Ansatz wurde keine Degradation der Amyloidproteine nachgewiesen.

Abbildung 4.4: Degradationsexperimente mit Amyloidproteinen von Patient 1 bei physiologischem pH



Westernblot und Chemilumineszenzfärbung: Inkubation für 10 Min., 30 Min., 2 Std., 12 Std., bei 37 °C, pH 7.4, Inkubation für 12 Std. ohne Protease diente als Kontrolle.

Quelle: [15]

#### 4.1.4 Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten

Die in den intakten Gefrierschnitten der Milz von Patient 1 enthaltenen Amyloidproteine konnten durch die Verwendung des Anti-AL-Antikörpers selektiv angefärbt werden. In der Chemilumineszenzfärbung zeigte sich dasselbe Bandenmuster wie bei Auftrag der durch Wasser-Wasch-Methode und Chromatographie aufgereinigten Amyloidproteine desselben Patienten.

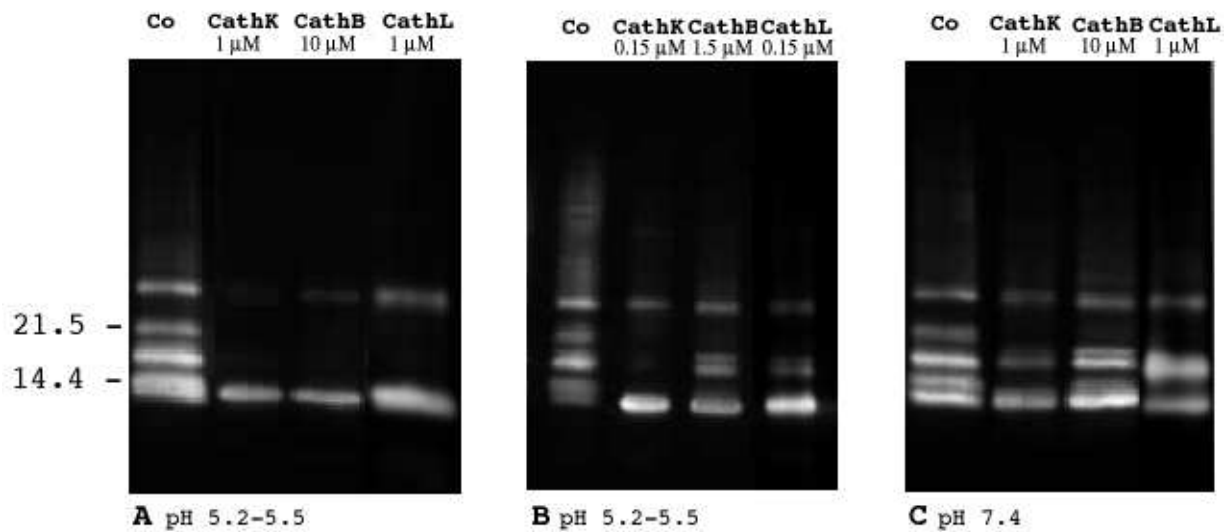
Alle drei Proteasen waren in der Lage, das Amyloid aus den intakten Ablagerungen bei saurem pH zu spalten, wobei für keines der Enzyme ein kompletter Abbau beobachtet werden konnte.

Cathepsin K und L spalteten die Amyloidproteine bei einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$ , besonders die Banden im Bereich 22 bis 15 kDa verringerten sich und verschwanden bei einer Enzymkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  vollständig. Währenddessen blieb die Bande um 12 kDa erhalten. Cathepsin K zeigte, wie bei den vorhergehenden Versuchen, eine etwas stärkere Spaltungsaktivität als Cathepsin L und eine deutlich höhere als Cathepsin B (Abb. 4.5).

Bei pH 7.4 war die Spaltung des Amyloids zwar nachweisbar, jedoch bei allen drei Enzymen deutlich schwächer ausgeprägt als bei saurem pH.



Abbildung 4.5: Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten



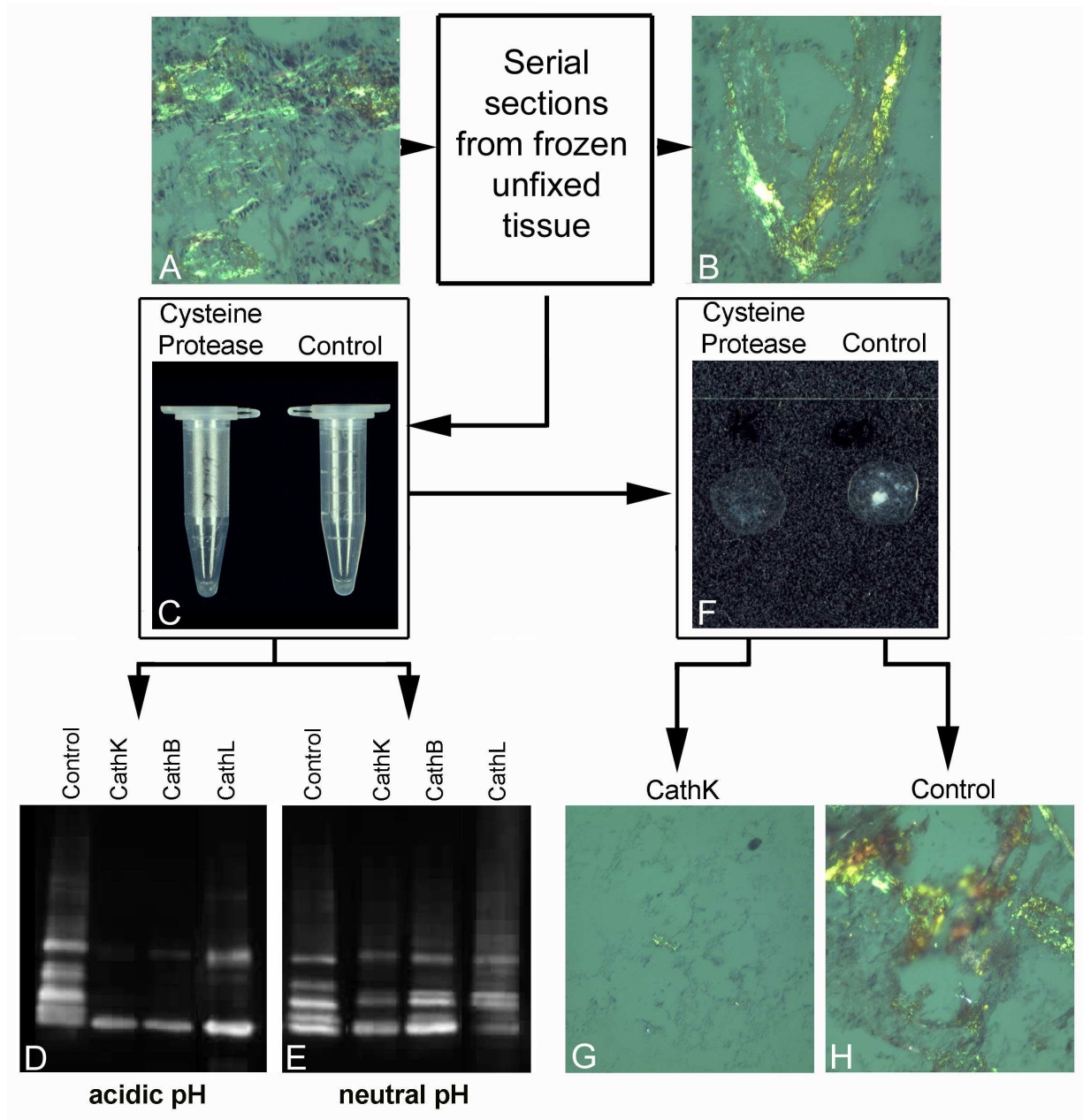
Westernblot und Chemilumineszenzfärbung: Jeweils 12 Std. Inkubation bei 37° C, Inkubation für 12 Std. ohne Protease diente als Kontrolle **A** Die Bande bei 12 kDa bleibt erhalten, während die Banden zwischen 21,5 und 14,4 kDa aufgelöst werden, **B** Gleiche Enzymkonzentrationen wie bei den Experimenten an monomeren Amyloidproteinen: CathK spaltet das Amyloid stärker als CathL und CathB, **C** deutlich verringerte Spaltungsaktivität bei physiologischem pH

### Kongorotfärbung

Bei den auf Objektträgern ausgestrichenen und mit Kongorot gefärbten Ansätzen waren in den Kontrollansätzen zahlreiche Amyloidablagerungen mit typischer Polarisationsfärbung nachweisbar. In den Ansätzen, die mit Enzym (1 μM für Cathepsin K und L, 10 μM für Cathepsin B) bei saurem pH inkubiert worden waren, waren diese Amyloidablagerungen stark reduziert. Am deutlichsten wiederum bei Inkubation mit Cathepsin K, nach der nur noch wenige sehr kleine Amyloidablagerungen nachweisbar waren (Abb. 4.6).

Bei physiologischem pH waren, vergleichbar mit den oben beschriebenen Ergebnissen, noch große Ansammlungen von Amyloid zu finden.

Abbildung 4.6: Kongorotfärbung nach Degradation von amyloidhaltigen Gefrierschnitten



**G** Gefrierschnitt nach 12 Std. Inkubation mit CathK 1  $\mu$ M, nur noch geringste Amyloidmengen sichtbar

**H** Kontrolle, Gefrierschnitt nach 12 Std. Inkubation ohne Enzym: reichlich Amyloid, Quelle: [15]

## 4.2 AA-Amyloidose der Maus

### 4.2.1 Amyloidentwicklung bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen

In der Gruppe der Balb/c-Mäuse entwickelten 10 von 12 Mäusen Amyloid. In Leber und Milz fanden sich regelmäßig Amyloidablagerungen, teilweise - besonders bei Tieren, die sehr ausgedehnte Ablagerungen hatten - fanden sich auch in anderen Organen Ablagerungen. Hier zumeist in der Nebenniere, Niere und im Pankreas (Tabelle 4.1). Keine der Mäuse aus der Kontrollgruppe (Entzündungsreaktion durch Silbernitratinjektion ohne AEF-Gabe) entwickelte Amyloid.

#### Leber

In der Leber fanden sich die ersten Ablagerungen (Tag 10) um die kleinen Arterien in der Läppchenperipherie (Azinuszone 1). Später (Tag 17) fanden sich beginnende Ablagerungen im Parenchym, ausgehend von den Sinusoiden, typischerweise in der Läppchenperipherie, bzw. in der Übergangszone zwischen den Lobuli (Abb. 4.8). Bei zwei Mäusen (B19 und B27) fanden sich auch runde Ablagerungen im Leberparenchym.

Amyloidablagerungen um die Gefäße in Azinuszone 1 waren beim hier durchgeführten Versuch am konstantesten nachweisbar. In dieser Lokalisation waren auch an Tag 24 und 35 noch vergleichsweise große Ablagerungen vorhanden, während die Ablagerungen in der Milz und anderen Organen zu diesem Zeitpunkt stark dezimiert bzw. ganz verschwunden waren. Desweiteren war Amyloid um kleine Lebergefäße auch bei jenen Tieren zu beobachten, die sehr wenig Amyloid entwickelt hatten bzw. in keinem anderen Organ Ablagerungen aufwiesen (beispielsweise bei Nude- und SCID-Mäusen).

#### Andere Lokalisationen

In der Milz fand sich Amyloid typischerweise perifollikulär, bei ausgeprägter Amyloidose auch in der roten Pulpa (Abb. 4.12). Sofern in Nieren und Pankreas Amyloid vorhanden war, waren die Ablagerungen nicht sehr ausgeprägt und fanden sich vorwiegend um Gefäße herum. In den Nebennieren fand sich bei drei Tieren Amyloid in der Zona fasciculata (B15, B19, B27).

Im Zeitverlauf nahm die Amyloidmenge von Tag 10 auf Tag 17 zu und an Tag

24 und 35 wieder ab. Zwei der Balb/c-Mäuse (B19 und B27) wiesen an Tag 24 bzw. 35 noch große Amyloidmengen auf.

### Nude- und SCID-Mäuse

Sowohl Nude- als auch SCID-Mäuse hatten deutlich weniger Amyloid als Balb/c-Mäuse.

Sechs von 10 Nude-Mäusen entwickelten Amyloid, 6 in der Leber und 4 davon noch zusätzlich in der Milz. Die Ausdehnung der Ablagerungen war dabei deutlich geringer als bei den Balb/c-Mäusen. Die Ablagerungen in der Leber waren auf die Gefäße begrenzt und auch in der Milz fand sich nur ein schmaler Saum um die Follikel.

Von den SCID-Mäusen entwickelten 5 von 9 Amyloid. Amyloidablagerungen waren bis auf zwei Ausnahmen ausschließlich um die Lebergefäße herum nachweisbar. Lediglich eine SCID-Maus hatte gleichzeitig geringe Ablagerungen in der Milz.

Tabelle 4.1:

<b>Amyloidentwicklung bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen</b>																
in Leber(L), Milz(M) und anderen Organen(O), hierbei N für Niere, P für Pankreas, S für Nebenniere																
	Tag 10				Tag 17				Tag 24				Tag 35			
		L	M	O		L	M	O		L	M	O		L	M	O
Balb/c	B7	1	3	N	B13	2	3	-	B19	4	4	NPS	B25	1	1	-
	B8	0	0	-	B14	3	1	NP	B20	2	1	-	B26	0	0	-
	B9	2	2	P	B15	3	3	NPS	B21	2	1	-	B27	3	3	S
Nude	N4	2	0	-	N7	0	0	-	N10	0	0	-	N13	0	0	-
	N5	1	2	-	N8	1	0	-	N11	2	2	-	-			
	N6	2	1	S	N9	1	1	-	N12	0	0	-	-			
SCID	S4	0	0	-	S7	1	0	-	S10	0	0	-	-			
	S5	0	0	-	S8	0	0	N	S11	1	0	-	-			
	S6	1	0	-	S9	2	2	-	S12	0	0	-	-			

0: keine Amyloidablagerungen

1: wenige kleinere Amyloidablagerungen

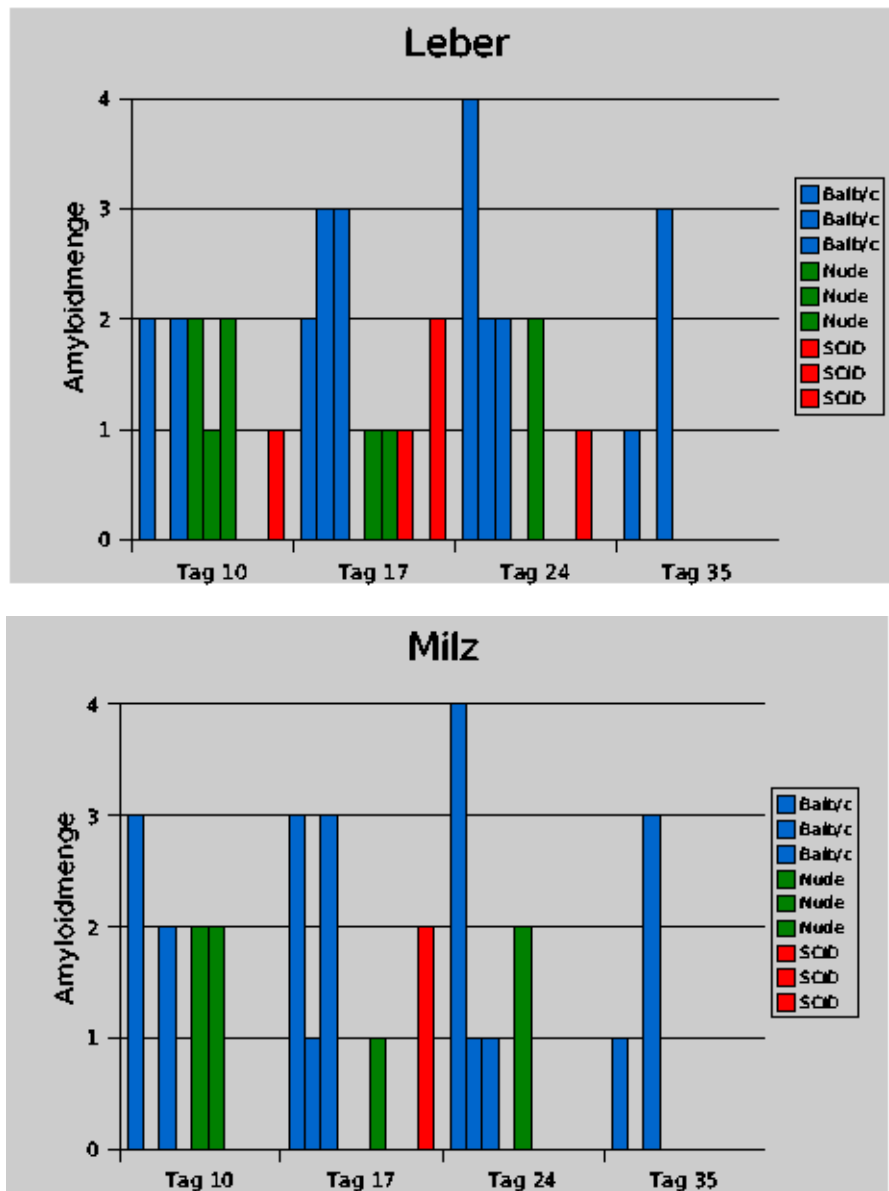
2: regelmäßig Ablagerungen um Lebergefäße und Milzfollikel

3: zusätzlich beginnende Ablagerungen im Leberparenchym, breite Ablagerungen um die Milzfollikel

4: zusätzlich ausgedehnte Amyloidablagerungen in Leberparenchym und roter Pulpa der Milz

2 der Nude- und 3 der SCID-Mäuse starben vor Ablauf des Experimentes

Abbildung 4.7: Entwicklung von Amyloid bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen



## 4.2.2 Neutrophile Granulozyten

Die Neutrophilen wurden immunhistochemisch über die AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion angefärbt. Bei den Kontrolltieren ohne Entzündungsreaktion fand sich nur eine geringe Anzahl an neutrophilen Granulozyten. Hier fanden sich die meisten Granulozyten in der roten Pulpa der Milz. In der Leber fanden sich praktisch keine und in den anderen Organen nur gelegentlich wenige dieser Zellen.

Die Anzahl der Neutrophilen stieg an Tag 10 der Entzündungsreaktion insbesondere in der roten Pulpa der Milz massiv an. Die Marginalsinus waren jedoch relativ frei. In der Leber fanden sich Gruppen von Granulozyten am häufigsten in enger Nachbarschaft zu Gefäßen, seltener auch innerhalb der Lobuli.

Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten sank bis Tag 17 rapide und hatte an Tag 24 den Ausgangszustand (ohne Vorliegen einer Entzündungsreaktion) wieder erreicht.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und Amyloidablagerungen hergestellt werden. Weder fanden sich Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Ausbildung von Amyloid hinsichtlich Menge oder Verteilung der Neutrophilen, noch ließ sich eine räumliche Nachbarschaft zwischen diesen Zellen und den Ablagerungen zeigen. In der Leber fanden sich die meisten Granulozyten abseits der Ablagerungen. In der Milz waren die Massen von Neutrophilen in der roten Pulpa von den Amyloidablagerungen, die sich um die Follikel herum befanden, durch die Marginalsinus regelrecht getrennt.

## 4.2.3 Makrophagen

Die Anfärbung der Makrophagen erfolgte durch einen gegen F4/80 gerichteten Antikörper. F4/80 gilt als hochspezifischer Marker für monozytoide Zellen und wird bereits in frühen Entwicklungsstadien in deren Zellmembran exprimiert [77].

Im Falle der Makrophagen konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl zwischen Mäusen mit und ohne Amyloid festgestellt werden. Jedoch fanden sich regelmäßig Makrophagen in direkter Nachbarschaft zum Amyloid.

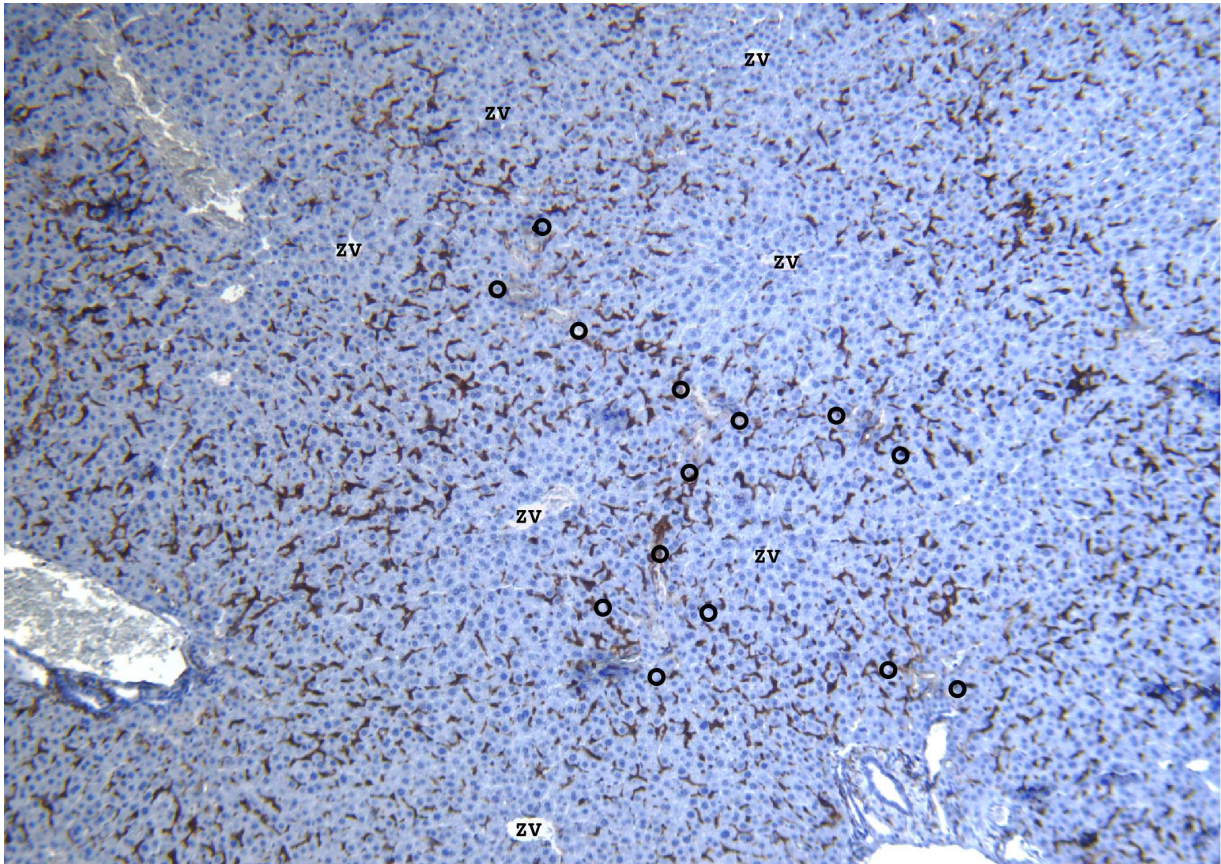


Abbildung 4.8:

Balb/c-Maus (B14) 17 Tage nach Amyloidinduktion, Polarisierung der Kupfferzellen in Richtung Läppchenperipherie (Zentralvenen mit ZV markiert), in derselben Region liegen die Amyloidablagerungen (mit o markiert) in deren Nähe die F4/80-Färbung abgeschwächt ist. Leber; Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 160-fache Vergrößerung

## Leber

In der Leber waren F4/80-positive Kupfferzellen generell in der Azinuszone 1 konzentriert, während sich um die Zentralvenen herum weniger Zellen fanden (Abb. 4.8). Am Tag 10 (B7 und B9) fand sich Amyloid in der Leber ausschließlich um kleine Gefäße in Azinuszone 1. Direkt um die Ablagerungen ließen sich kaum F4/80-positive Kupfferzellen nachweisen, wogegen im selben Leberpräparat - mit gewissem Abstand zu den Amyloidablagerungen - reichlich, intensiv F4/80-immunreaktive Kupfferzellen zu finden waren (Abb. 4.9). Am Tag 17 (B13, B14, B15) fanden sich sowohl Amyloidablagerungen um die Gefäße, als auch beginnende perisinusoidale Ablagerungen. Besonders dort ließen sich Makrophagen direkt neben dem Amyloid nachweisen, die jedoch eine deutlich schwächere Anti-F4/80-Immunfärbung aufwies-

sen als Makrophagen an anderer Lokalisation in demselben Leberpräparat (Abb. 4.10). Bei zwei Tieren (B19 und B27) fanden sich typische runde Ablagerungen im Parenchym, in diesen Fällen war jede Ablagerung, ohne Ausnahme von stark F4/80-immunreaktiven Makrophagen umgeben (Abb. 4.11).



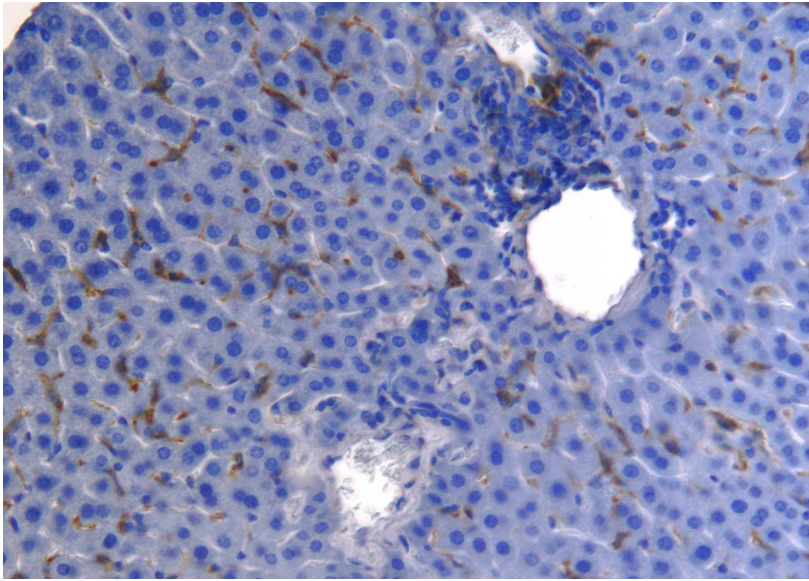


Abbildung 4.9:  
Balb/c-Maus (B9)  
10 Tage nach Amy-  
loidinduktion. Kaum  
Anfärbung von Kupf-  
ferzellen um die  
Amyloidablagerung-  
en (um die Gefäße  
gelegen), während  
Kupferzellen mit  
größerem Abstand  
deutlich positiv  
sind. Leber; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
400-fache Vergröße-  
rung

Abbildung 4.10:  
Balb/c-Maus (B14)  
17 Tage nach Amy-  
loidinduktion. Nur  
schwache Färbung der  
Kupferzellen um die  
Amyloidablagerungen  
(um das Gefäß im  
Zentrum des Bildes),  
Kupferzellen mit Ent-  
fernung zum Amyloid  
zeigen eine intensivere  
Anfärbung. Leber; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
640-fache Vergröße-  
rung

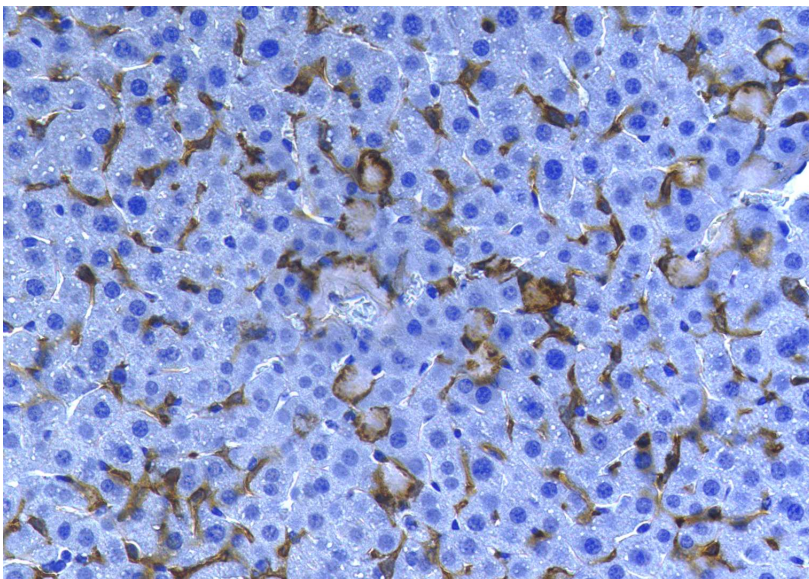
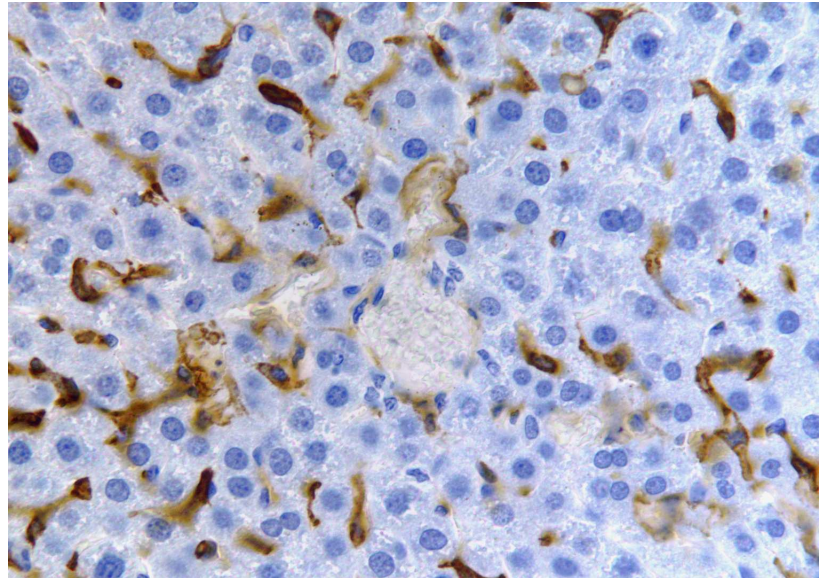


Abbildung 4.11:  
Balb/c-Maus (B19) 24  
Tage nach Amyloidin-  
duktion. Die runden im  
Parenchym verteilten  
Amyloidablagerungen  
sind von F4/80 po-  
sitiven Makrophagen  
umgeben. Leber; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
400-fache Vergröße-  
rung

## Andere Lokalisationen

Die Milz enthielt am Tag 0, also ohne Entzündungsreaktion, eine große Anzahl von F4/80-immunreaktiven Makrophagen. Mit Einsetzen der Entzündungsreaktion (Tag 10) nahm die Intensität der F4/80-Immunreaktivität rapide ab, um dann am Tag 17 und 24 graduell anzusteigen, bis sie am Tag 35 wieder mit dem Tag 0 vergleichbar war. Leider war durch die große Anzahl von Makrophagen in der Milz der räumliche Zusammenhang mit Amyloid schwer zu beurteilen. Es ließen sich wiederum Makrophagen zahlreich neben den Amyloidablagerungen nachweisen (Abb. 4.12). Bei Tieren ohne Amyloid waren F4/80-positive Makrophagen in vergleichbarer Lokalisation (im Bereich von roter Pulpa und Marginalsinus, die Follikel umgebend) zu finden.

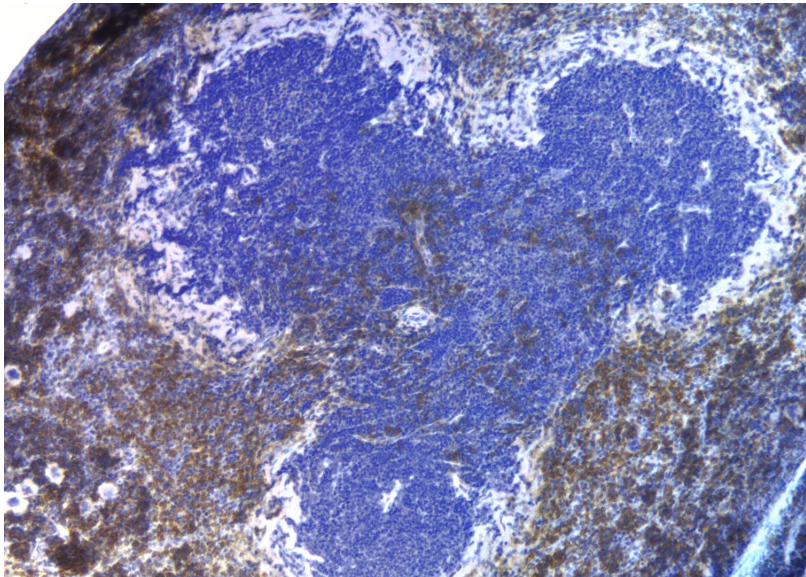


Abbildung 4.12:  
Balb/c-Maus (B19)  
24 Tage nach Amyloidinduktion, perifollikuläres Amyloid, teilweise von F4/80-positiven Zellen durchsetzt. Milz; Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 100-fache Vergrößerung

Bei zwei Tieren (B15 und B19) fanden sich deutliche Amyloidablagerungen in den Nebennieren, um die herum sich ebenfalls sehr viele F4/80-positive Makrophagen nachweisen ließen. Generell waren in den Nebennieren nur wenige Makrophagen zu finden. In den Präparaten mit Amyloid fanden sich tendenziell mehr Makrophagen in den Nebennieren als bei Tieren ohne adrenale Amyloidablagerungen (Abb. 4.13/Abb. 4.14).

Abbildung 4.13:  
Balb/c-Maus (B19) 24  
Tage nach Amyloidin-  
duktion: Deutliche  
F4/80-Färbung um,  
teils auch innerhalb der  
Amyloidablagerungen.  
Nebenniere; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
1000-fache Vergröße-  
rung

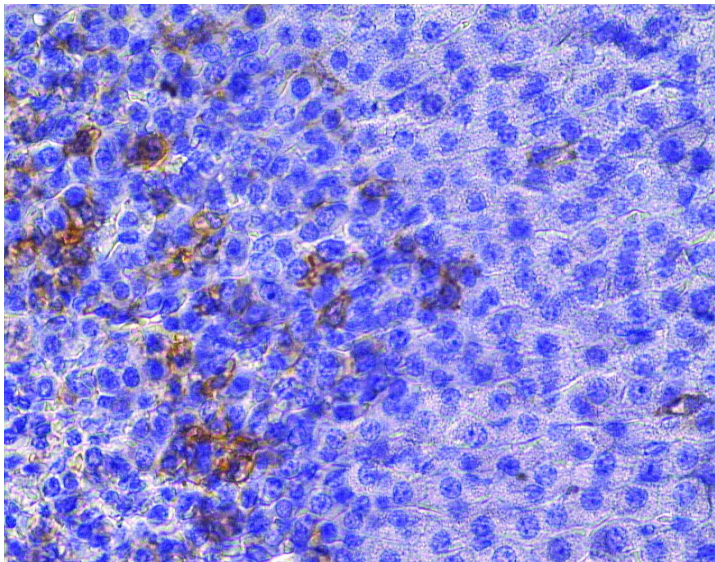
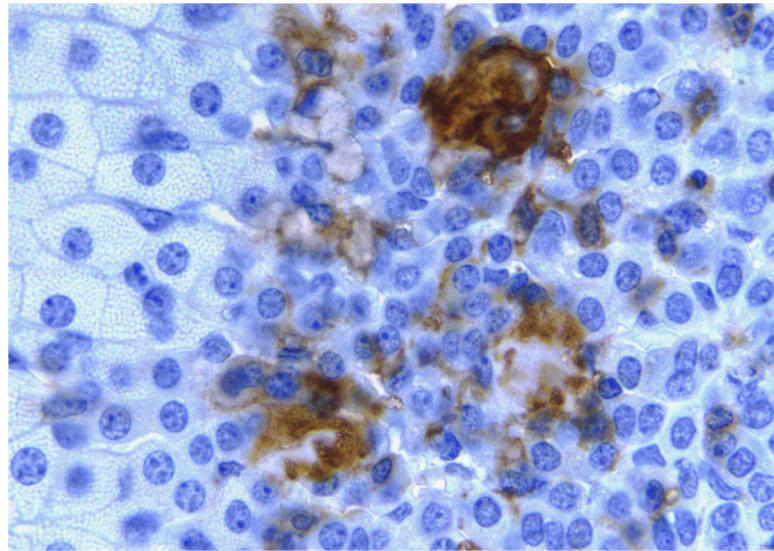


Abbildung 4.14:  
Balb/c-Maus (B18)  
ohne Amyloid: ver-  
gleichsweise wenig  
positiv gefärb-  
te Makrophagen.  
Nebenniere; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
400-fache Vergröße-  
rung

#### 4.2.4 Expression und Lokalisation von Cathepsin K

Cathepsin K war erst ab dem 24. Tag in nennenswertem Ausmaß nachweisbar, am Tag 0, 10 und 17 fanden sich nur äußerst wenige, schwach positive Makrophagen (Abb. 4.24/ Abb. 4.16).

Die Cathepsin K-Expression in der Leber stieg am Tag 24 an, insbesondere in den Hepatozyten. Einige Leberzellen, die üblicherweise zwei Kerne hatten, enthielten Cathepsin K positive Vakuolen (Abb. 4.17), besonders ausgeprägt bei B19, bei dem sie verstärkt um Amyloidablagerungen zu finden waren (Abb. 4.15).

Eine verstärkte Anfärbung der Makrophagen zeigte sich erst an Tag 35. Der Großteil der Kupfferzellen war kräftig positiv gefärbt, während die Hepatozyten zu diesem Zeitpunkt praktisch negativ waren (Abb. 4.19).

Die zeitliche Entwicklung der Cathepsin K-Immunreaktivität verlief bei Amyloid- und Nicht-Amyloid-Mäusen gleich. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Expression des Enzyms in Makrophagen zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Es sei darauf hingewiesen, dass Cathepsin K erst an Tag 24 und 35 in nennenswertem Ausmaß nachweisbar war und zu diesem Zeitpunkt nur zwei der Mäuse größere Amyloidablagerungen hatten. Bei einem Tier (B19) war eine leicht verstärkte Immunreaktivität in den Hepatozyten festzustellen (Abb. 4.15/Abb. 4.16).

Bei den Tieren von Tag 35 mit Amyloid ließen sich häufig Cathepsin K-positive Makrophagen um Amyloid herum nachweisen (Abb. 4.19/ Abb. 4.21). Diese traten sowohl um die Ablagerungen im Leberparenchym als auch um die Gefäßablagerungen herum auf.

In der Milz fanden sich bis Tag 17 ebenfalls nur sehr selten Cathepsin K-positive Zellen. An Tag 24 stieg die Zahl der positiven Zellen an. Es ließen sich keine Unterschiede in der Expression zwischen den Versuchsgruppen nachweisen.

Abbildung 4.15:  
 Balb/c-Maus (B19)  
 24 Tage nach Amyloidinduktion, leichte Induktion in den Hepatozyten, besonders direkt neben den Ablagerungen. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

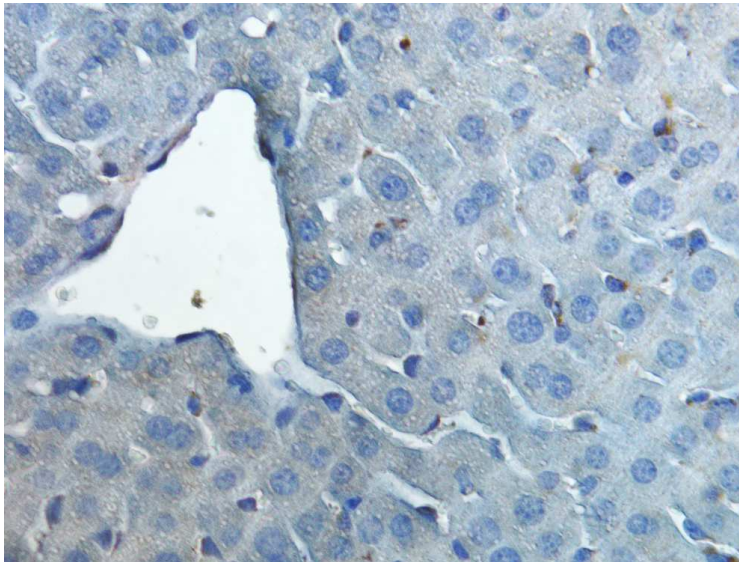
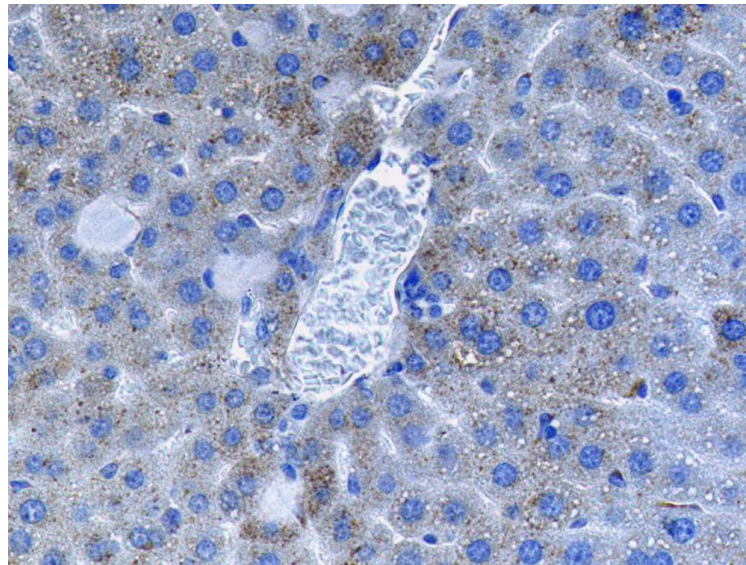
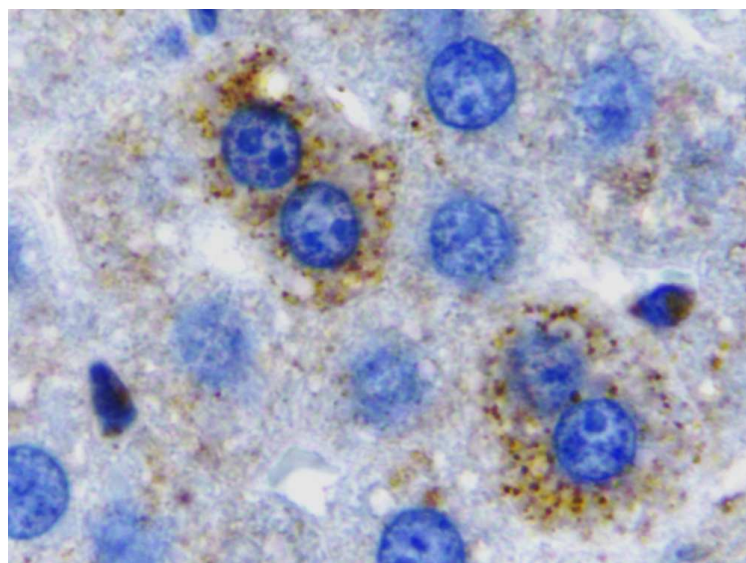


Abbildung 4.16:  
 Balb/c-Maus (B17)  
 desselben Alters aus der Kontrollgruppe (alleinige Silbernitratinjektion - kein Amyloid), geringere Anti-CathK-Färbung, auch kaum positive Makrophagen, wie für diesen Zeitpunkt typisch. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

Abbildung 4.17:  
 Balb/c-Maus (B19) 24 Tage nach Amyloidinduktion, Detailaufnahme zweier Hepatozyten mit intensiver punktförmiger CathK-Immunreaktivität. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 1600-fache Vergrößerung



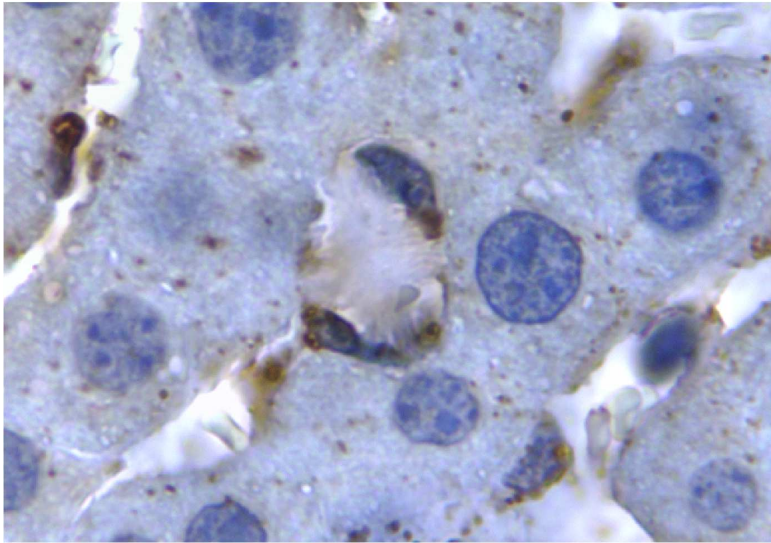


Abbildung 4.18:  
Balb/c-Maus (B27)  
35 Tage nach Amyloidinduktion, runde Ablagerung im Zentrum des Bildes mit umgebenden CathB-positiven Kupferzellen. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathB-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 1600-fache Vergrößerung

Abbildung 4.19:  
Balb/c-Maus (B27)  
35 Tage nach Amyloidinduktion: CathK-positiv Kupferzellen um Amyloid (um zwei Gefäße gelagert). Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 1000-fache Vergrößerung

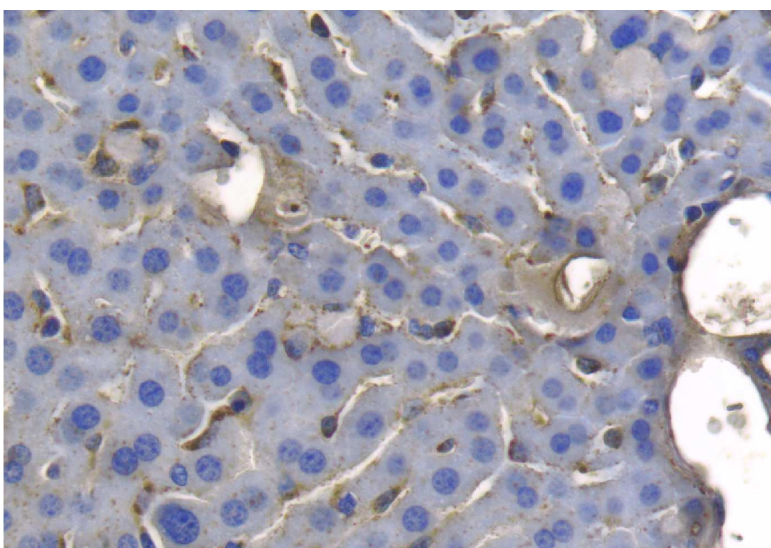
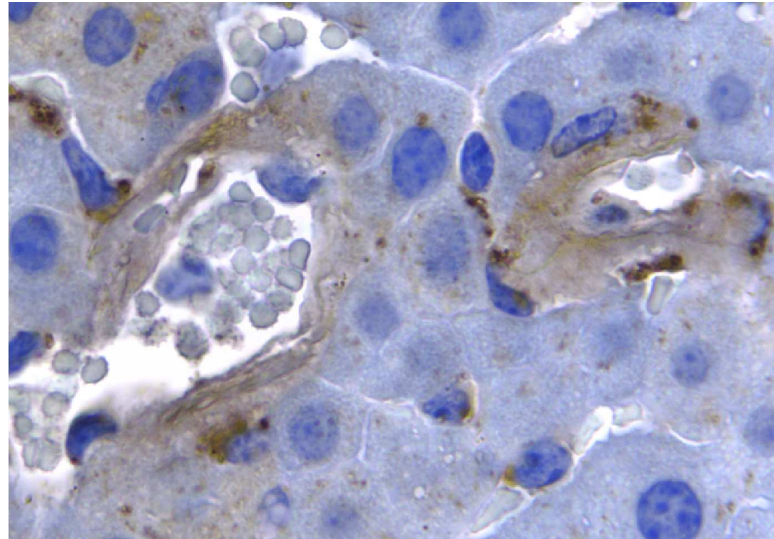
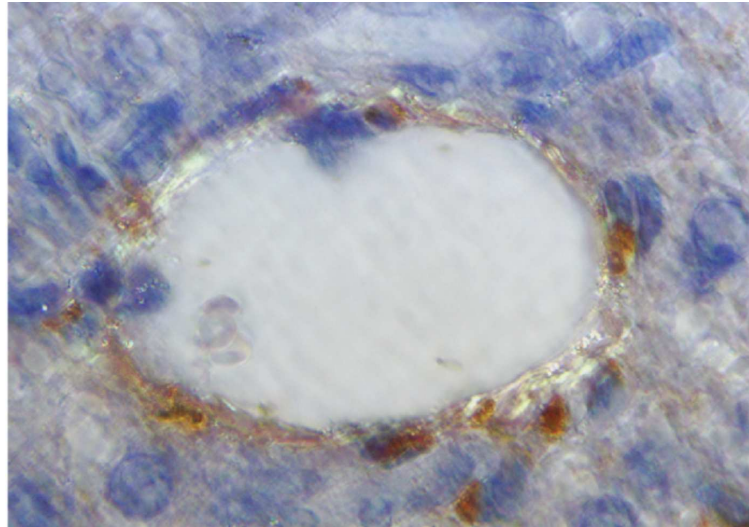


Abbildung 4.20:  
Balb/c-Maus (B27) 35 Tage nach Amyloidinduktion, Amyloidablagerungen teils um Gefäße, teils als runde Ablagerungen im Parenchym umgeben von CathL-positive Kupferzellen. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

Abbildung 4.21:  
 Nude-Maus (N11) 24  
 Tage nach Amyloidin-  
 duktion, minimale  
 doppelbrechende  
 Amyloidablagerungen  
 um ein Gefäß mit  
 CathK-positiven  
 Zellen. Leber; Im-  
 munfärbung mit Anti-  
 CathK-Antikörper;  
 Kongorotfärbung;  
 Hämatoxylin-  
 Gegenfärbung;  
 1000-fache Vergröße-  
 rung



#### 4.2.5 Expression und Lokalisation von Cathepsin B

Im Unterschied zu Cathepsin K wurde Cathepsin B bereits bei Mäusen ohne Vorhandensein einer Entzündungsreaktion exprimiert. Es zeigte sich eine feine punktförmige Anfärbung im Zytoplasma der Leberzellen sowie Anfärbung von etwa der Hälfte der Makrophagen bereits bei den Kontrollmäusen vom Tag 0. Mit Beginn der Entzündungsreaktion war Cathepsin B verstärkt nachweisbar. Vergleichbar zu Cathepsin K ging die Expression im Leberparenchym an Tag 35 zurück, während die Anzahl und Intensität der Anfärbung der Cathepsin B-positiven Makrophagen zunahm.

Es ließen sich wiederum regelmäßig Cathepsin B-positive Makrophagen neben Amyloidablagerungen der Leber nachweisen. Im Falle von B19 (viel Amyloid) war auch die Färbung innerhalb der Hepatozyten deutlich verstärkt.

In der Milz war Cathepsin B im Vergleich zu Cathepsin K und L vermehrt nachweisbar. Es fanden sich von Tag 0 an regelmäßig Cathepsin B-positive Makrophagen in den Milzpräparaten. Die Anzahl der Cathepsin B-positiven Makrophagen nahm an Tag 24 und 35 zu. In diesem Zeitraum fanden sich auch stark positive Zellen im Zentrum der Milzfollikel.

In der Nebenniere fanden sich generell stark Cathepsin B-positive Zellen in der Zona fasciculata. Bei Vorhandensein von Amyloid fanden sich auch stark positive Zellen um das Amyloid.

#### 4.2.6 Expression und Lokalisation von Cathepsin L

Färbungsmuster und zeitliche Verteilung der Cathepsin L-Immunreaktivität ähnelte sehr der von Cathepsin B. Bei Tieren mit ausgeprägten Amyloidablagerungen in der Leber war die Anti-Cathepsin L-Immunreaktion in den Hepatozyten verstärkt (Abb. 4.22/ Abb. 4.23).

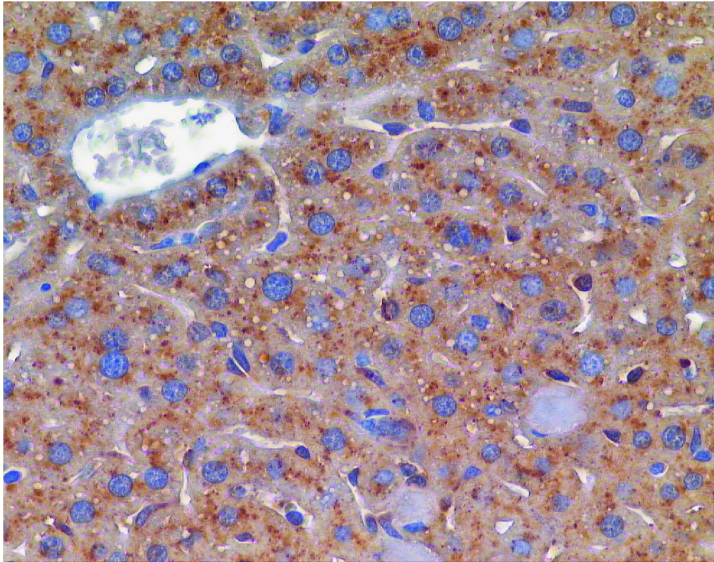
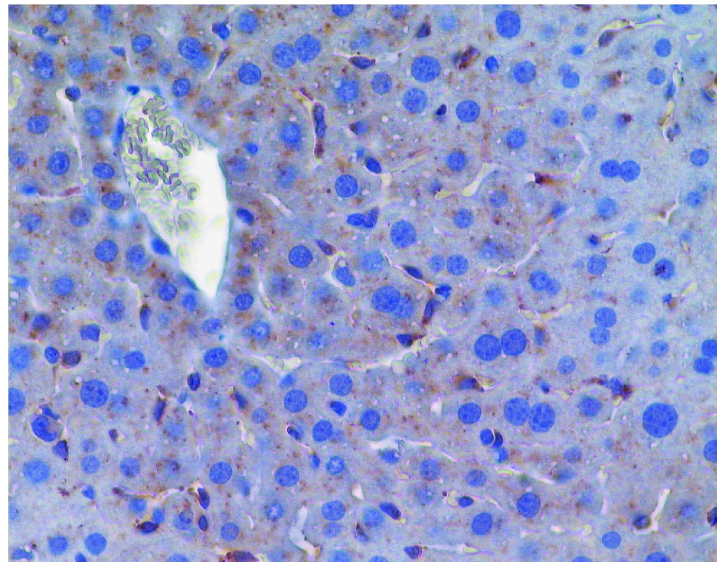


Abbildung 4.22:  
Balb/c-Maus (B19) 24 Tage nach Amyloidinduktion, die Maus hatte eine ausgeprägte Amyloidose und zeigt eine deutlich stärkere CathL-Immunreaktivität als das Vergleichstier. Die CathB-Färbung ist vergleichbar. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

Abbildung 4.23:  
Balb/c-Maus (B20) ebenfalls 24 Tage nach Amyloidinduktion jedoch mit nur geringen Amyloidablagerungen, typisches Färbemuster für CathL und B. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung





Tendenziell war in der Leber das Parenchym eher stärker und die Makrophagen eher schwächer angefärbt als bei Cathepsin B. Es ließen sich wie bei den anderen zwei Cathepsinen regelmäßig Cathepsin L-positive Makrophagen neben Amyloid nachweisen (Abb. 4.20).

In der Milz fanden sich am Tag 0 und 10 nur wenige immunreaktive Zellen. Bei den Tieren von Tag 35 stieg die Zahl der positiven Zellen in der roten Pulpa, den Marginalsinus und im Zentrum der Follikel an.

#### **4.2.7 Unterschiede zwischen Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen**

##### **Nudemäuse**

Cathepsin K wurde bei den Nude-Mäusen ab Tag 10 also zu einem früheren Zeitpunkt als bei den Balb/c-Mäusen in den Lebermakrophagen regelmäßig exprimiert (Abb. 4.24/ Abb. 4.25). Bei der Cathepsin B und L-Expression in der Leber bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen Nude- und Balb/c-Mäusen. Es bestand eine Tendenz, dass für Cathepsin B und L stark positive Makrophagen bei Nude-Mäusen etwas früher nachweisbar waren als bei den Balb/c-Mäusen.

Abbildung 4.24:  
 Balb/c-Maus (B15)  
 17 Tage nach Amyloidinduktion, kaum CathK positive Zellen. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

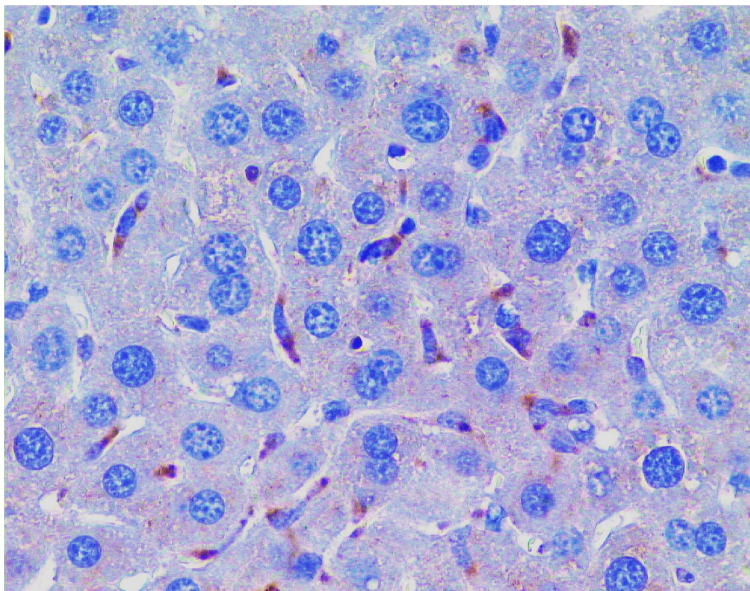
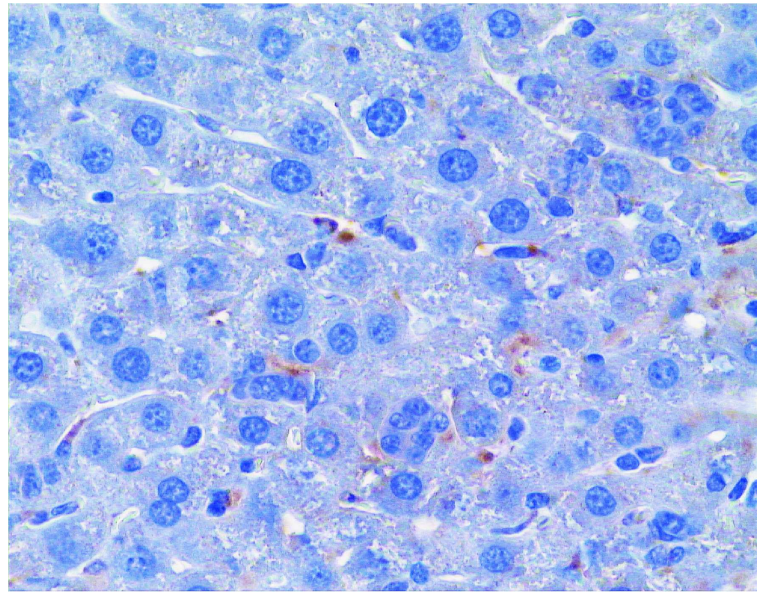


Abbildung 4.25:  
 Nude-Maus (N8) 17 Tage nach Induktion, im Vergleich zahlreichere und stärker positive Kupferzellen bei Nude-Maus gleichen Alters. Leber; Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

In der Milz finden sich bei den Nude-Mäusen sehr stark für Cathepsin B und L, seltener für Cathepsin K positive Zellen im Zentrum der folliculären Strukturen (Abb. 4.26/ Abb. 4.27). Zellen ähnlicher Morphologie finden sich auch in Milzfollikeln der Balb/c-Mäuse, jedoch in weit geringerer Anzahl.

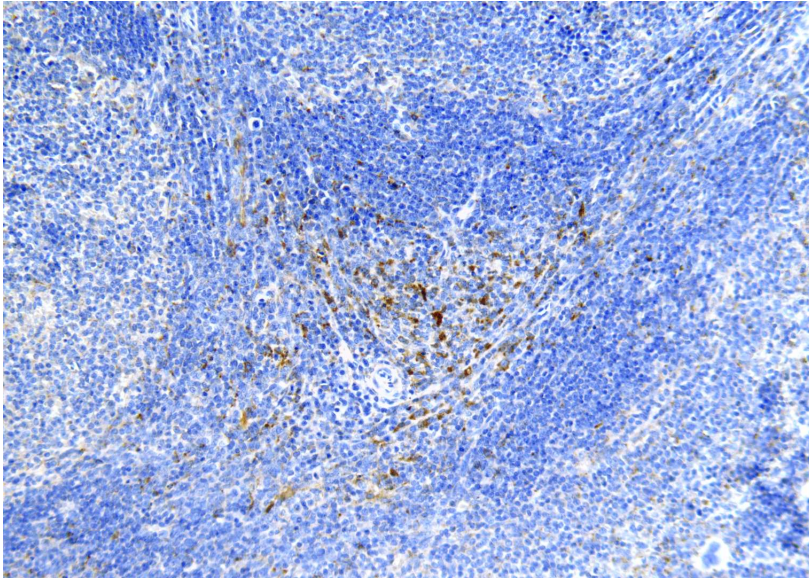
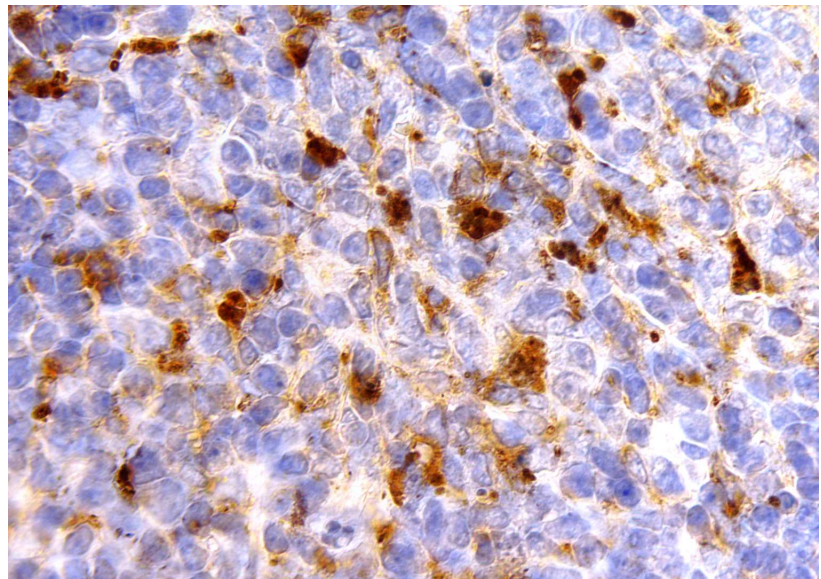


Abbildung 4.26:  
Nude-Maus (N5), 10  
Tage nach Injektion,  
stark immunreaktive  
Zellen im Zentrum des  
Milzfollikels. Milz; Im-  
munfärbung mit Anti-  
CathL-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
200-fache Vergröße-  
rung

Abbildung 4.27:  
Nude-Maus (N11), 24  
Tage nach Injektion,  
Detailaufnahme: Die  
gezeigten Zellen sind  
ebenfalls positiv für  
CathB und seltener  
für CathK und finden  
sich bei Nude-Mäusen  
weitaus zahlreicher  
als bei Balb/c-  
Mäusen. Milz; Im-  
munfärbung mit Anti-  
CathL-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
1600-fache Vergröße-  
rung



## **SCID-Mäuse**

Die SCID-Mäuse unterschieden sich in der Cathepsin K-Expression nicht auffällig von den Balb/c-Mäusen.

In der Leber fand sich für Cathepsin B und L bei SCID-Mäusen ein anderes Färbungsmuster als bei Balb/c-Mäusen: In den Hepatozyten fanden sich perinukleär große und stark angefärbte Granula, so dass die Färbung insgesamt intensiver wirkte. Kupferzellen waren bei SCID-Mäusen nicht häufiger positiv als bei Balb/c-Mäusen.

In der Leber waren an Tag 10 und 17, F4/80-immunreaktive Makrophagen um vaskuläre Amyloidablagerungen regelmäßig nachweisbar (S6 und S9), während sich bei Balb/c-Mäusen zum gleichen Zeitpunkt in dieser Lokalisation die Zellen kaum anfärben ließen (Abb. 4.28/ Abb. 4.29).

Abbildung 4.28:  
Balb/c-Maus (B15) 17 Tage nach Injektion, kaum F4/80-Positivität um die doppelbrechenden Amyloidablagerungen. Leber; Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper; Kongorotfärbung; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 400-fache Vergrößerung

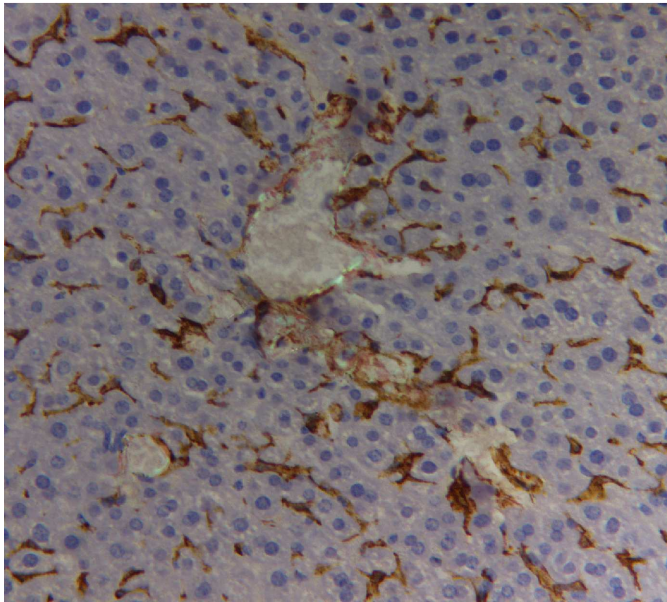
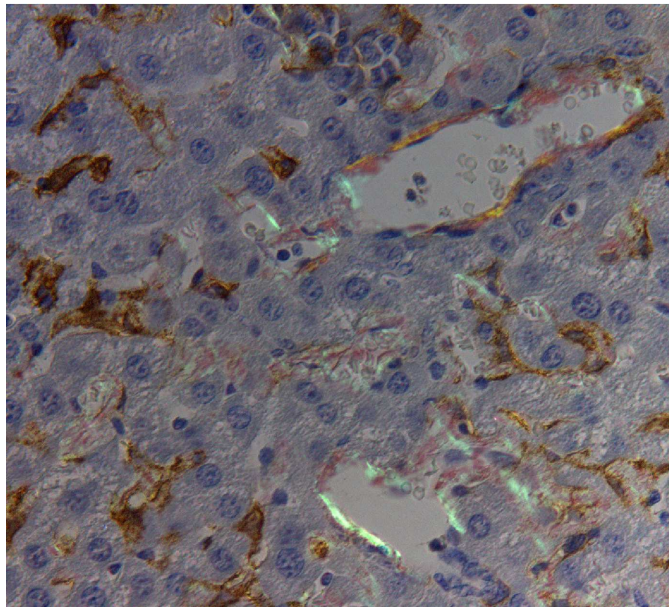


Abbildung 4.29:  
SCID-Maus (S6) 10 Tage nach Amyloidinduktion, regelmäßig F4/80 positive Kupferzellen direkt um die Amyloidablagerungen um das Gefäß im Zentrum des Bildes. Leber; Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper; Kongorotfärbung; Hämatoxylin-Gegenfärbung; 320-fache Vergrößerung

Die SCID-Mäuse hatten keine Milzfollikel (Abb. 4.31) und auch keine verstärkt für Cathepsine positiven Zellen. Es ließ sich nur bei einem einzigen Tier Amyloid nachweisen, welches um ein von Bindegewebe begleitetes Gefäß abgelagert war (Abb. 4.30).

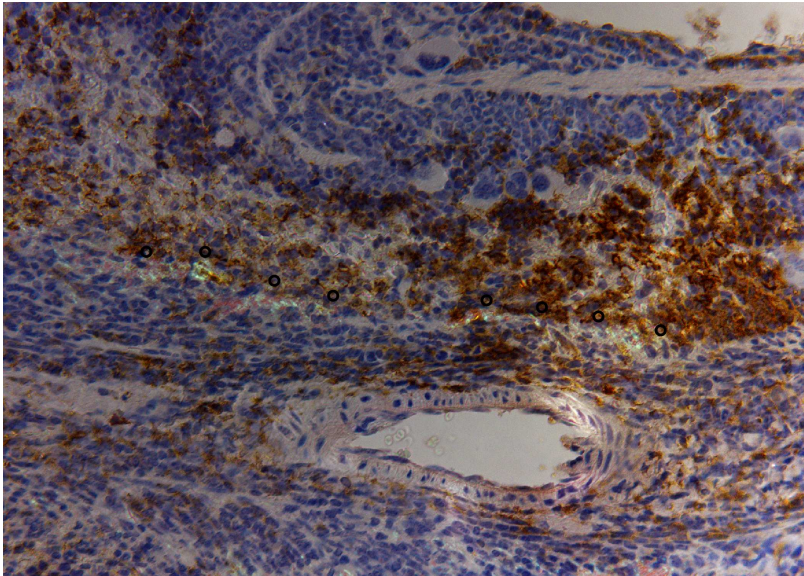
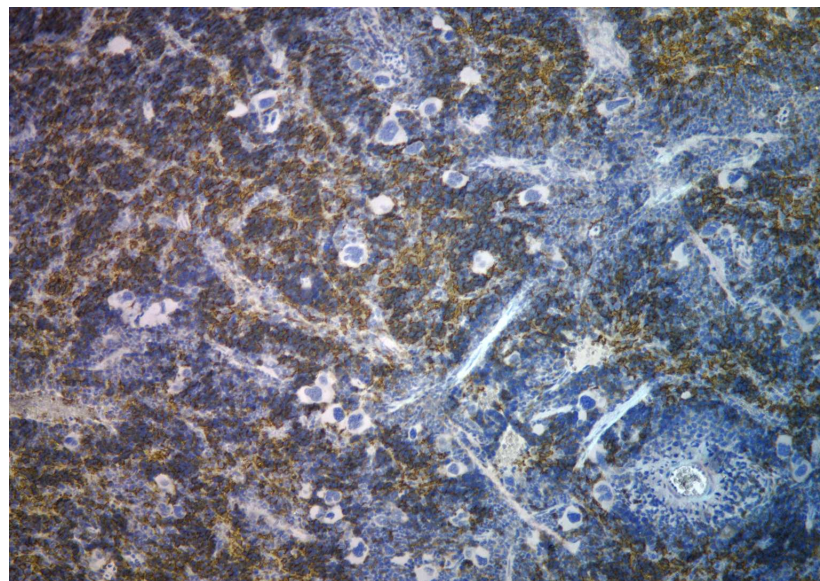


Abbildung 4.30:  
SCID-Maus (S9) 17  
Tage nach Injektion,  
spärliche Amyloid-  
ablagerungen (mit  
o markiert), bei der  
einzigen SCID-Maus  
mit Amyloid in der  
Milz knapp oberhalb  
des Gefäßes. Milz; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Kongorotfärbung;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
400-fache Vergröße-  
rung

Abbildung 4.31:  
SCID-Maus (S10) 24  
Tage nach alleiniger  
Silbernitratinjektion,  
typische Morpho-  
logie der Milz bei  
SCID-Mäusen: Völlig-  
es Fehlen von  
Milzfollikeln. Milz; Im-  
munfärbung mit Anti-  
F4/80-Antikörper;  
Hämatoxylin-  
Gegenfärbung;  
100-fache Vergröße-  
rung



# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Degradationsexperimente

Die Cathepsine B, K und L sind Cysteinproteasen, die maßgeblich am lysosomalen Proteinabbau und -umbau beteiligt sind. Sie werden in Makrophagen, Histiocyten und mehrkernigen Riesenzellen, aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert. Cathepsin B, K und L ließen sich bei Patienten mit systemischen Amyloidosen neben den Amyloidablagerungen nachweisen [15], die nicht so inert im Gewebe verbleiben, wie es lange Zeit postuliert worden ist. Es mehren sich deutliche Hinweise, dass Amyloidablagerungen einem dynamischen Umbau unterliegen [49, 75, 80, 199, 198, 66]. Die hier untersuchten Cathepsine spalten AA-Amyloid *in vitro* [157, 156]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch AL-Amyloid ein Substrat für Cathepsin B, K und L ist und die Enzyme aufgereinigte Amyloidproteine und native Ablagerungen spalten. Damit könnten diese weiträumig exprimierten Proteasen in der Pathogenese der systemischen Amyloidosen eine Rolle spielen sowohl in der Entstehung als auch in der Regression der Ablagerungen.

#### 5.1.1 Degradationsexperimente mit monomeren Amyloidproteinen

Bei den Degradationsexperimenten bei saurem pH wurde für alle drei Cathepsine eine Reduktion der monomeren Amyloidproteine auf unter 20% des Ausgangswertes bei Konzentrationen im micromolaren Bereich gefunden.

Dies macht deutlich, dass Cathepsine auch AL-Amyloidproteine in relevantem Ausmaß spalten können. Besonders die Effizienz des Cathepsin K, welches bei 0.15  $\mu\text{M}$  zu einer Reduktion des Fibrillenproteins auf unter 50% innerhalb der ersten 10

Min. führte, ist eindrucklich.

Nach 12-stündiger Inkubation mit 0.15  $\mu\text{M}$  Cathepsin K waren die Amyloidproteine im Westernblot vollständig verschwunden. Für die im niedermolekularen Bereich sichtbaren Spaltfragmente ließ sich noch eine Restaktivität von 4% bestimmen (S. 45, Abb. 4.2). Damit ist Cathepsin K das erste humane Enzym, für das eine vollständige Spaltung von AL-Amyloidproteinen *in vitro* demonstriert werden konnte [15].

Für Cathepsin B und K ließ sich auch eine gewisse Spaltungsaktivität bei physiologischem pH zeigen, mit einer Reduktion des Proteins um circa 30 bzw. 40% (S. 47, Abb. 4.4).

Die beobachtete Aktivität der Enzyme bei der Spaltung geht im Wesentlichen konform mit der Literatur. Cathepsin K kann sowohl Elastin als auch Typ-I-Kollagen als auch denaturiertes Kollagen spalten [18] und gilt als das effizienteste kollagenolytische und elastinolytische Enzym. Die enzymatische Aktivität des Cathepsin K war hierfür in entsprechenden Untersuchungen deutlich höher als die von Cathepsin L und S, speziell im neutralen pH-Bereich, in dem sich für Cathepsin K immer noch eine relevante Aktivität nachweisen ließ [61, 29]. Berücksichtigt man, dass die Proteasen bei physiologischem pH nur kurzzeitig stabil sind, im Organismus jedoch kontinuierlich nachsynthetisiert werden können, wäre eine gewisse Spaltungsaktivität auch bei physiologischem pH denkbar.

Es lässt sich kritisch anmerken, dass in der vorliegenden Studie die Experimente mit AL-Amyloidproteinen von zwei Patienten durchgeführt worden sind. Beide wurden durch die Cathepsine, die bekanntermaßen eine sehr breite Substratspezifität haben [19, 107, 70], in vergleichbarem Ausmaß abgebaut, so dass eine Spaltung von AL-Amyloid mit anderer Primärstruktur möglich erscheint.

### **5.1.2 Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten**

Amyloid besteht nicht nur aus Amyloidproteinen, sondern enthält auch Amyloid P-component und Glycosaminoglykane [137, 186]. Auch ein Einfluss verschiedener Strukturproteine des Bindegewebes auf die Pathogenese der Amyloidablagerungen wurde postuliert. Durch Extraktion mittels Wasser-Wasch-Methode werden die Amyloidfibrillen aus dem umgebenden Gewebe isoliert und von Amyloid P-



component getrennt [177]. Sie geben den nativen Zustand des Amyloids daher nur unvollständig wieder.

Um zu prüfen, ob Cathepsine auch im Gewebeverband vorliegende Fibrillen spalten, wurden Degradationsexperimente mit Amyloid enthaltenden Gewebeschnitten von Patient 1 durchgeführt.

Diese wurden aus bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviertem Milzgewebe in ein Eppendorftube geschnitten, und der Puffer mit der entsprechenden Enzymkonzentration wurde direkt zugegeben - das Gewebe war also keiner Extraktion oder anderen chemischen Behandlung ausgesetzt. Durch den hergestellten Anti-AL-Antikörper ließen sich die Amyloidproteine aus der Vielzahl der sich naturgemäß im Gewebe befindlichen Proteine heraus selektiv anfärben.

Auch hier ließ sich die Degradation der Amyloidproteine bei saurem, aber auch in geringem Ausmaß bei physiologischem pH nachweisen (S. 48, Abb. 4.5). Die Enzymkonzentrationen mussten in diesen Versuchen deutlich höher gewählt werden als bei den Versuchen an isolierten Amyloidproteinen, und auch Cathepsin K konnte die Fibrillenproteine nicht vollständig auflösen. Dies mag dadurch erklärbar sein, dass sich in den Gewebeschnitten eine Vielzahl von Proteinen befanden, die ein Substrat für Cathepsine darstellen, so dass diese weniger Valenzen zur Spaltung des Amyloids hatten. Auch eine Hemmung des jeweiligen Cathepsins durch im Gewebe befindliche Faktoren wäre denkbar, beispielsweise durch Amyloid P-component. Für diese Komponente ist die Hemmung verschiedener Enzyme bei der Spaltung von Amyloidfibrillen gezeigt worden [200]. Da bei den Degradationsexperimenten mit isolierten Amyloidproteinen nur  $5\ \mu\text{g}$  Protein je Ansatz eingesetzt wurden, könnte auch schlicht die Amyloidmenge in den Gewebeschnitten größer gewesen sein.

Die Spaltungsmuster in den beiden Versuchsansätzen unterschieden sich leicht: Bei den isolierten Amyloidproteinen war die Bande bei 15 kDa diejenige, die bis zuletzt erhalten blieb, bei den Versuchen an Gewebeschnitten wurde diese bei saurem pH vollständig aufgelöst. Dagegen blieb bei Degradation der Gewebeschnitte die Bande bei 12 kDa erhalten.

Matrixproteine können einen Einfluß auf Enzyme haben. Es ist gezeigt worden, dass Aggrecan, Hyaluronsäure und Chondroitinsulphat eine Aktivitätssteigerung von Cathepsin K bewirken, sowie eine deutliche Änderung des Spaltungsmusters von Typ I und Typ II-Kollagen. Schon geringste Strukturveränderungen im Chon-

droitinsulphat bedingen eine Änderung in der Stabilität des Enzyms um den Faktor 10 [114].

Es ist also durchaus denkbar, dass durch Interaktion mit im Nativgewebe vorhandenen Proteinen die Cathepsine in ihrem Spaltungsverhalten verändert worden sind. Trotzdem wurden die Fibrillen auch hier von den Enzymen gespalten.

Größere Modifikationen der Amyloidstruktur selbst, durch die Aufreinigung sind auszuschließen, da sich das Bandenmuster von isolierten Amyloidproteinen und Gewebeamylloid nicht unterschied.

Die Aktivität der einzelnen Enzyme war bei den Versuchen an den Amyloid enthaltenden Gefrierschnitten mit den Vorexperimenten vergleichbar. Auch hier spaltete Cathepsin K das native Fibrillenprotein am stärksten, gefolgt von Cathepsin L und in schwächerem Ausmaß Cathepsin B. Bei physiologischem pH fiel die Spaltung der Proteine schwächer aus, war jedoch auch hier nachweisbar.

Die apfelgrüne Polarisationsfarbe unter polarisiertem Licht nach Kongorotfärbung ist ein charakteristisches, Amyloid definierendes Merkmal. Da bisher kein falsch positiver Fall beschrieben worden ist, wird die Spezifität dieser Methode mit 100% angegeben. Ein positives Ergebnis gilt als beweisend für Amyloid [148, 149].

Die Versuchsansätze mit amyloidhaltigen Gewebeschnitten wurden auf Objektträgern ausgestrichen und mit Kongorot angefärbt. Hierbei bestätigten sich die in den Westernblots ermittelten Ergebnisse: In den Ausstrichen mit hohen Cathepsinkonzentrationen bei saurem pH-Wert war insbesondere nach Inkubation mit Cathepsin K kaum noch Amyloid sichtbar, während die ausgestrichenen Kontrollansätze reichlich Amyloid enthielten (S. 49, Abb. 4.6).

Damit ist demonstriert worden, dass Cathepsin K, L und in geringerem Maße B in der Lage sind, sowohl AL-Amyloidproteine als auch natives AL-Amyloid zu spalten. Wenn nun Cathepsine in räumlicher Nähe zum Amyloid zu finden und in der Lage sind Amyloid zu spalten, bleibt die Frage, warum sich Amyloid in vivo anreichert.

Die Ablagerung von Amyloid muss zwangsläufig aus einem Ungleichgewicht zwischen überschießender Bildung und zu geringem Abbau resultieren. Welche Mechanismen hierbei beteiligt sind, ist weitgehend ungeklärt. Gewisse Parallelen zum Umbau der extrazellulären Matrix erscheinen gerechtfertigt, zumal Amyloid ebenfalls hier abgelagert wird. Kollagenfibrillen müssen hierbei zunächst über einen mem-

brangebundenen Rezeptor erkannt werden, werden dann unvollständig gespalten und schließlich intrazellulär lysosomal verdaut [54]. Insuffiziente extra- oder intrazelluläre Spaltung führt zu Bindegewebsakkumulation und Fibrose.

Faktoren, die an der Amyloidbildung beteiligt sein könnten, sind, im Sinne einer überschießenden Bildung, massive Produktion des entsprechenden Vorläuferproteins und das Auftreten von Proteinen, die aufgrund ihrer Struktur beschleunigt Amyloidablagerungen bilden (siehe Einleitung). Hierbei können Veränderungen im Aktivierungsmuster und im umgebenden Milieu proteolytisch wirksamer Enzyme eine Rolle spielen, beispielsweise wenn die Enzyme durch entsprechende Spaltung erst zur Bildung der amyloidogenen Vorläufer führen oder eben diese verhindern.

Auch eine mangelnde Erkennung der Amyloidablagerungen und dadurch mangelnde Aktivierung von proteolytisch wirksamen Zellen ist denkbar.

Ein Abbau von Amyloid funktioniert bei Mäusen offensichtlich sehr suffizient, wenn die Amyloidablagerungen durch Injektion eines humanen Leichtkettenproteins ausgelöst werden. Dieses stellt für Mäuse ein Fremdprotein dar. Im Rahmen der ausgelösten Immunreaktion wurden neutrophile Granulozyten durch Antikörperbildung aktiviert und infiltrierten die Amyloidtumore, die daraufhin aufgelöst wurden [83]. Neutrophile Granulozyten haben sich aber in immunhistochemischen Untersuchungen und auch in der hier vorliegenden Arbeit nie in enger räumlicher Assoziation zu Amyloidablagerungen nachweisen lassen, so dass man annehmen kann, dass eben eine solche Immunreaktion bei Patienten nicht stattfindet.

Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen werden im Zusammenhang mit Amyloid regelmäßig, aber im Vergleich zu entzündlichen Erkrankungen wie Sarkoidose oder Tuberkulose vergleichsweise spärlich gefunden [22]. Es sieht also so aus, als ob das Immunsystem nicht ausreichend auf die Amyloidablagerungen reagiert, was wiederum darin begründet liegen könnte, dass die zugrundeliegenden Vorläufer körpereigene Proteine sind.

Eine Beobachtung, für die man bis heute keine ausreichende Erklärung hat, ist die, dass jeweils nur ein kleiner Teil von Patienten mit entsprechender Grunderkrankung bzw. Genmutation eine systemische Amyloidose ausbildet.

Denkbar wäre, dass bei Patienten mit Amyloidbildung Modulationen der proteolytischen Enzyme vorliegen, die eine Amyloidbildung durch Bildung von amyloidogenen Vorläufern erst ermöglichen. Auch der umgekehrte Fall wäre möglich:

Dass prinzipiell alle Patienten, bei denen die Voraussetzungen hierzu erfüllt sind, Amyloid ausbilden und bei einigen eine Ineffizienz des proteolytischen Abbaus dazu führt, dass sich eine klinisch relevante Amyloidose ausbildet.

In beiden Fällen wäre die proteolytische Aktivität von Zellen von Bedeutung. Cysteinproteasen, die sowohl AL-Amyloid als auch AA-Amyloid spalten und ubiquitär am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, könnten ein Ansatzpunkt sein, genau diese proteolytische Aktivität zu beeinflussen und damit auch Einfluss auf die Ablagerung oder den Abbau von Amyloid zu nehmen.

## 5.2 AA-Amyloidose der Maus

Die Untersuchungen zur AA-Amyloidose und die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Cathepsin B, K und L in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage sind, Vorläufer- und Amyloidproteine der beiden häufigsten systemischen Amyloidosen zu spalten. Unklar ist, in welchem räumlichen und zeitlichen Zusammenhang ihre Expression zu Ausbildung und Regression von Amyloid steht. Dies ist anhand von immunhistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten von Patienten nur bedingt beurteilbar, da keine Einschätzung möglich ist, an welchem Punkt des dynamischen Zusammenspiels von Amyloidaufbau und -regression man sich gerade befindet.

Bei dem hier verwendeten etabliertesten Modell für eine systemische Amyloidose werden die Amyloidablagerungen bei der Maus durch das Auslösen einer Entzündungsreaktion und die gleichzeitige Gabe von AEF induziert.

Bei den so behandelten Mäusen wurden die Amyloidablagerungen über Tag 10 bis 17 aufgebaut und verschwanden zwischen Tag 24 und 35.

Die Vorteile dieses Modells sind, dass man durch die Beobachtung der Verteilung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen einen guten Überblick über den Ablauf der Entzündungsreaktion hat und die Cathepsinexpression im Hinblick auf deren räumliche und zeitliche Verteilung im Verlauf von Entzündung, Entstehung von Amyloid und Regression von Amyloid untersuchen kann.

Da vermutet wird, dass immunmodulatorische Prozesse in der Pathogenese der Amyloidosen eine Rolle spielen, sollte anhand von Nude- und SCID-Mäusen untersucht werden, ob der Wegfall immunkompetenter T-Zellen, bzw. T- und B-Zellen Auswirkungen auf die Amyloidbildung und die Expression der Cathepsine hat.

Die Immunhistochemische Färbung erschien hierzu als geeignetste Methode, da

hier die Morphologie einzelner Zellen und damit die Lokalisation von Cathepsinen im Bezug auf Amyloidablagerungen und Makrophagen beurteilt werden kann.

### 5.2.1 Bildung von Amyloid

Die Ablagerungen um die kleinen Lebergefäße der Läppchenperipherie traten im Zeitverlauf mit am frühzeitigsten auf und waren am konstantesten nachweisbar: Auch bei Tieren mit geringer Amyloidmenge, wie beispielsweise den Nude- und SCID-Mäusen, ließen sich diese Ablagerungen immer nachweisen (sofern die Tiere Amyloid entwickelt hatten). Die Parenchymablagerungen fanden sich beginnend ab Tag 17, also etwas später und in größerem Ausmaß nur bei Tieren mit viel Amyloid.

Das Amyloid entstand in der Leber zuerst in der Peripherie der Lobuli (Azinuszone 1), hier finden sich auch die meisten Kupfferzellen unabhängig vom Vorhandensein von Amyloid (S. 54, Abb. 4.8). Kupfferzellen treten am zahlreichsten in der Zone 1 auf, im Verhältniss von circa 4:3:2 im Vergleich zur 2. und 3. Zone des Leberläppchens [179]. Experimentell haben Periportalzonenkupfferzellen, verglichen mit Kupfferzellen der anderen Zonen, eine erhöhte Phagozytoserate von Latexpartikeln, sowie eine erhöhte Cathepsin D-Aktivität [179].

Die ersten Amyloidablagerungen in der Leber entstehen also in jener Zone, in der die Anzahl und phagozytotische Aktivität der Kupfferzellen besonders hoch ist. Dies deckt sich mit Untersuchungen, in denen Kupfferzellen eine entscheidende Rolle bei der Amyloidentstehung zugeschrieben worden ist.

Nude- und SCID-Mäuse entwickelten deutlich weniger Amyloid als Balb/c-Mäuse (S. 52, Abb. 4.7). Es ist vorbeschrieben, dass Nude-Mäuse, die keine oder kaum funktionierende T-Zellen besitzen, relativ resistent gegen die Induktion von Amyloid sind [206, 193]. Wobei in Makrophagenzellkulturen mit Nude-Maus-Makrophagen in vergleichbarer Art Amyloid gebildet wird wie mit Wildtyp-Makrophagen [105], so dass die relative Amyloidresistenz scheinbar nicht an einer Funktionsstörung der Makrophagen an sich liegt, sondern seine Ursache in Veränderungen der Regulation und Aktivierung des Immunsystems hat. Dafür spricht auch eine Studie, in der gezeigt worden ist, dass bei CD2-Fas-Transgenen Mäusen eine gesteigerte T-Zell-Aktivität mit spontaner Bildung von AA-Amyloid in den Nieren bei 50% der Mäuse assoziiert ist. Auf Stimulation mit BCG zeigten die Mäuse eine gesteigerte Akut-Phase-Reaktion [84].

SCID-Mäuse besitzen weder funktionierende T- noch B-Zellen. Die Beobachtung, dass diese Tiere noch weniger Amyloid entwickeln als Nude-Mäuse, weist darauf hin, dass die Bildung von Amyloid mit dem Grad der Immundysfunktion abnimmt und dass hierbei insbesondere die Abminderung der Akut-Phase-Reaktion von Bedeutung ist.

Trotzdem bleibt festzuhalten, dass beide Mäusestämme prinzipiell Amyloid entwickeln und damit offensichtlich weder funktionierende B- noch T- Zellen für die Amyloidbildung zwingend erforderlich sind.

Die Amyloidablagerungen um die Milzfollikel waren ebenfalls frühzeitig (ab Tag 10) und regelmäßig nachweisbar. Bei ausnahmslos allen Balb/c-Mäusen, die Amyloid entwickelt hatten, war Amyloid in der Milz nachweisbar, bei Nude-Mäusen bei 4 von 6 Tieren mit Amyloid, bei SCID-Mäusen lediglich bei einem Tier (von 4). SCID-Mäuse haben im Gegensatz zu Balb/c- und Nude-Mäusen keine follikulären Strukturen in der Milz (S. 69, Abb. 4.31) . Zusammen mit der Beobachtung, dass bei der SCID-Maus mit Milzamyloid, dieses um ein Gefäß herum gelagert war (S. 69, Abb.4.30), kann man schlussfolgern, dass die strukturelle Organisation der Milz mit roter und weißer Pulpa sowie Ausbildung von Lymphfollikeln für die Ablagerung von Amyloid notwendig ist.

### **5.2.2 Neutrophile Granulozyten**

Die hier gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass neutrophile Granulozyten an der Entstehung oder am Abbau von Amyloid nicht beteiligt sind. Es ließ sich weder ein räumlicher noch ein zeitlicher Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und Amyloid nachweisen. In der Leber waren an Tag 10 und 17 nur wenige in Gruppen angeordnete Granulozyten in der Nähe von Gefäßen zu finden. In der Milz waren die in der roten Pulpa reichlich vorhandenen Granulozyten durch die Marginalsinus von den Amyloidablagerungen deutlich räumlich getrennt. Es ließ sich weder eine Infiltration von Amyloid noch eine direkte Nachbarschaft von Granulozyten und Amyloid demonstrieren.

### **5.2.3 Makrophagen**

Es ließen sich durchgängig, bei allen drei Mausstämmen, Makrophagen direkt neben Amyloidablagerungen nachweisen und zwar unabhängig vom Zeitpunkt oder

untersuchtem Organ.

Da sich weder Lymphozyten noch neutrophile Granulozyten um die Ablagerungen fanden, sind Makrophagen die Immunzellen, die am wahrscheinlichsten mit der Pathogenese des Amyloids in Verbindung stehen.

Bei der AA-Amyloidose wird das Vorläuferprotein SAA im Rahmen der Entzündungsreaktion in Hepatozyten synthetisiert und als Bestandteil von HDL (high density lipoproteins) in den Disse-Raum sezerniert [115, 41, 172]. SAA wiederum wird durch proteolytische Spaltung zum Amyloid A Protein, welches ein N-terminales Fragment darstellt. Am wahrscheinlichsten sind Zellen des Reticuloendothelialen Systems für diese Spaltung verantwortlich [50, 112, 106, 72]. Es ließ sich sowohl eine enge morphologische Nachbarschaft zwischen reticuloendothelialen Zellen und Amyloid nachweisen [170] als auch die intralysosomale Bildung von Amyloid [171, 197]. Im Zellkulturexperiment ließ sich zeigen, dass Makrophagen nach Kokultivierung mit rekombinantem SAA2 Amyloid bilden [105]. In einem anderen Experiment wurden Peritonealmakrophagen von Mäusen mit experimentell ausgelöster AA-Amyloidose Balb/c-Mäusen i.v. injiziert, zusammen mit Casein und Freundschem Reagenz als Entzündungsstimulus. Hierdurch ließ sich bei den Mäusen eine systemische AA-Amyloidose induzieren, sowohl mit abgetöteten Peritonealmakrophagen und noch in stärkerem Ausmaß mit lebenden Makrophagen [173].

In der vorgelegten Arbeit zeigen sich deutliche Hinweise, dass die Makrophagen im Verlauf von Amyloidbildung und Verschwinden ihren Phänotyp und damit eventuell auch ihren Aktivierungsstatus und ihre Funktion ändern.

Bei Balb/c- und Nude-Mäusen war um die frühen Amyloidablagerungen um die Lebergefäße herum die Intensität der F4/80-Färbung der Makrophagen deutlich gemindert. Es sei betont, dass Makrophagen im selben Leberpräparat in gewissem Abstand zum Amyloid stark immunreaktiv waren (S. 56, Abb. 4.9/ Abb. 4.10; S. 68, Abb. 4.28).

Bei SCID-Mäusen war diese Beobachtung nicht zu machen (S. 68, Abb. 4.29): Hier waren Kupfferzellen auch in Nachbarschaft zu Amyloidablagerungen kräftig mit dem Anti-F4/80-Antikörper anfärbbar, so dass zu vermuten ist, dass gewisse immunmodulatorische Mechanismen, die die Expression von F4/80 beeinflussen, bei den stark immunsupprimierten SCID- Mäusen nicht ablaufen.

F4/80 ist ein Marker, der als hochspezifisch für Makrophagen gilt und bereits in

frühen Entwicklungsstufen auf monozytoiden Zellen expremiert wird [77]. Die Expression wird mit Ausreifung der Zellen heraufreguliert, sie ist aber auch abhängig vom Aktivierungsgrad der Makrophagen. Bei murinen Peritonealmakrophagen, die nach BCG-Injektion in die Peritonealhöhle gewonnen wurden, war die Expression von F4/80 deutlich reduziert (18 000 bis 20 000 Moleküle pro Zelle versus 70 000 auf nicht aktivierten Makrophagen) [55]. Diese BCG-aktivierten Makrophagen zeigten, neben Wasserstoffperoxid- und Superoxidanionensekretion, eine erhöhte Ia-Antigen-Expression und eine auf 20% des Ausgangswertes verringerte mannoserezeptorvermittelte Endozytose. In einer ähnlich angelegten Untersuchung [78] wurden vier Formen von Makrophagen anhand der Morphologie der Peroxidaseaktivität unterschieden: Ortsständige, exsudative, Peroxidase-negative Makrophagen und eine Mischform. F4/80 wurde fast ausschließlich auf ortsständigen Makrophagen expremiert, die im Ruhezustand circa 90% der Makrophagenpopulation ausmachten und zu 100% positiv für F4/80 waren. In den anderen drei Makrophagengruppen waren nur bis maximal 10% der Zellen positiv. Desweiteren wurde beschrieben, dass in vitro adhärenente Zellen zu 98% F4/80 expremierten, während dies bei nicht-adhärenenten bei maximal 31% der Fall war [77]. Nach Infektion von Mäusen mit dem Zytomegalie- oder Herpes simplex Virus fand sich eine herabgesetzte F4/80-Expression der monozytären Zellen [76].

Man kann daher vermuten, dass die deutlich verringerte Immunreaktivität der Kupferzellen für F4/80 auf eine verringerte Expression dieses Moleküls zurückzuführen ist, eventuell im Sinne einer Aktivierung.

Dass um die frühen Amyloidablagerungen keine Kupferzellen vorhanden sind, ist aus folgenden Gründen sehr unwahrscheinlich: Die Amyloidablagerungen entstehen in der Zone des Leberläppchens, in der Kupferzellen am zahlreichsten auftreten, sie müssten also zu Beginn der Amyloidbildung dort verschwinden und zu einem späteren Zeitpunkt wieder zurückwandern. Wie bereits erläutert, wurden Kupferzellen in diversen Untersuchungen mit der Bildung von AA-Amyloid in Verbindung gebracht und neben den Ablagerungen nachgewiesen. Bei den Gewebeschnitten von Tag 17 war eine schwächere, aber deutliche F4/80-Immunreaktivität nachweisbar (S. 56, Abb. 4.10/S. 68, Abb. 4.28), d.h. die Intensität der Färbung nahm graduell wieder zu, was ebenfalls für eine Veränderung in der Expression des Markers spricht, bedingt durch eine Änderung im Aktivierungsmuster der Makrophagen.



Eine Veränderung der Spaltungsaktivität von Makrophagen scheint bei der Bildung von AA-Amyloid eine Rolle zu spielen. Bereits 1978 wurden Unterschiede im SAA-Spaltungsmuster zwischen Monozyten aus Blutproben von Patienten mit Amyloidose und gesunden Spendern festgestellt [112]. Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb, dass Kupfferzellen von Mäusen mit Casein-induzierter Amyloidose SAA unvollständig spalteten, während bei Tieren ohne Caseininjektionen die SAA-Spaltung vollständig war. Interessanterweise war dieser Effekt auch dann nachweisbar, wenn die entsprechenden Versuchstiere noch gar kein Amyloid entwickelt hatten und wurde mit der Anzahl der Caseininjektionen verstärkt. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass der Amyloidbildung eine Hemmung der Spaltungsaktivität der Kupfferzellen vorausgeht und diese durch die Casein-induzierte Entzündungsreaktion bedingt ist [57]. Morphologisch zeigten die Casein-stimulierten Makrophagen Zeichen einer Aktivierung.

Bei den hier untersuchten Mäusen war die verminderte Expression von F4/80 an Tag 10 und 17 nicht systemisch vorhanden, sondern räumlich eng mit den Amyloidablagerungen assoziiert. Das deutet darauf hin, dass ein lokaler Co-Faktor vorhanden ist, der die Makrophagen beeinflusst.

Bekannt ist, dass SAA Monozyten chemotaktisch anlockt, die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle und die Anheftung von Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten an Endothelzellen induziert [6]. Es sei noch angemerkt, dass SAA durchaus nicht in allen Hepatozyten gleichermaßen gebildet wird, sondern in maximal 20% der Leberzellen [174], so dass ein lokal begrenztes Wirken am Ort der Amyloidbildung denkbar wäre.

Denkbar wäre auch ein Einfluss von Basalmembranbestandteilen, wie Laminin, Fibronectin, Typ IV Kollagen oder Heparansulphatproteoglykan, die innerhalb von Amyloid zu finden sind und deren Synthese bereits vor Auftauchen der ersten Ablagerungen gesteigert ist [186, 116].

Beschrieben wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen RAGE und Amyloid. Dieser Rezeptor wird unter anderem von Makrophagen exprimiert und bindet selektiv und dosisabhängig SAA1.1 (die amyloidbildende Isoform des SAA) und AA-Amyloid. Im Tiermodell korrelierte die RAGE-Expression in der Milz eng mit der Ablagerung des Amyloids. RAGE fungiert dabei als Signaltransduktionsrezeptor: Die Inkubation einer Makrophagenzellkultur mit SAA1.1 oder AA-Amyloid,

wie auch Induktion einer systemischen Amyloidose im Tiermodell resultierte in einer verstärkten Translokation des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und dadurch Induktion von Hämoxxygenase 1, Interleukin 6 und M-CSF (macrophage colony stimulating factor) [155, 223]. Die drei letztgenannten Faktoren gelten als Signalmoleküle bei oxidativem Stress, und zumindest für M-CSF wurden bei Patienten mit systemischen Amyloidosen erhöhte Spiegel nachgewiesen [160].

Möglicherweise zeigt auch der AEF eine Wirkung auf die Makrophagen. Hierzu passt, dass sich dieser nach intravenöser Injektion vor allem in der perifollikulären Zone der Milz und in Kupfferzellen anreichert [5] - in Milz und Leber ist auch die F4/80-Herabregulation zu beobachten. AEF ist nicht zwingend notwendig um eine systemische Amyloidose bei Mäusen auszulösen. Bei alleiniger Gabe eines Entzündungsstimulus dauert es jedoch zwei bis vier Wochen bis zur Ausbildung einer Amyloidose [34]. Bei gleichzeitiger Gabe von AEF wird diese Zeit auf wenige Tage verkürzt. Die genaue Wirkungsweise des AEF ist nicht bekannt. Beobachtet wurde, dass eine Amyloidose durch Gabe von Amyloidfibrillen und amyloidhaltiger Milzextrakte ähnlich der AEF-Wirkung verstärkt wird [205, 140]. AEF wird ebenfalls aus amyloidhaltigem Milzgewebe gewonnen [177]. Es wird angenommen, dass sowohl AEF als auch Fibrillen einen Aggregationskeim darstellen, der ohne deren Gabe erst über längere Zeitdauer gebildet werden muss. Nach dieser Theorie würde AEF also lediglich die erste Phase der Amyloidbildung verkürzen, den Mechanismus der Amyloidbildung aber nicht verändern. AEF zeigte auch eine direkte Wirkung auf Makrophagen: Inkubation einer Zellkultur mit AEF blockierte die Superoxidationproduktion und Ia-Oberflächenantigenexpression [152]. Interessanterweise war eine geringe Superoxidationproduktion und Ia-Antigenexpression mit einer gesteigerten F4/80-Expression assoziiert [55]. Dies und die Beobachtung, dass die F4/80-Herabregulation bei den SCID-Mäusen nicht stattfindet, zeigt, dass nicht AEF allein für die Veränderung des Phänotyps der Makrophagen verantwortlich sein kann (denn die SCID-Mäuse hatten in gleicher Weise AEF erhalten). Es müssen noch andere Faktoren beteiligt sein, die vermutlich durch die Entzündungsreaktion modifiziert werden.

Festzuhalten bleibt, dass anhand des Markers F4/80 eine Änderung im Phänotyp der Makrophagen zu beobachten ist. In Anbetracht des frühzeitigen Auftretens und der direkt dem Amyloid benachbarten Lokalisation deutet diese Phänotypänderung

auf eine Funktionsänderung hin, die mit-ursächlich für die Amyloidentstehung sein könnte.

Die Expression der Cathepsine in Makrophagen ändert sich ebenfalls im Verlauf der Entzündungsreaktion. Cathepsin B und L sind in Makrophagen während der akuten Entzündungsreaktion vergleichsweise schwach, Cathepsin K ist praktisch gar nicht nachweisbar. Nachdem die akute Entzündungsreaktion abgelaufen ist (Tag 35) sind Makrophagen für alle drei Enzyme zahlreich und intensiv positiv anfärbbar. Der Zeitverlauf der Cathepsinexpression korreliert grob mit einer Zellkulturstudie in der humane Monozyten Cathepsin B, L und S mRNA innerhalb weniger Tage exprimierten, während Cathepsin K mRNA erst in späten Reifungsstadien nachweisbar war [168]. Hierzu sei angemerkt, dass sich in immunhistochemischen Studien Cathepsin K in humanen (nichtaktivierten) Makrophagen nicht nachweisen ließ. Riesenzellen und Epitheloidzellen, welche sich nach Aktivierung von Makrophagen bilden, sind positiv für das Enzym, woraufhin die Hypothese entstand, Cathepsin K könnte ein Marker für Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen sein [22].

Somit stützen die Tierversuche die Hypothese, dass Makrophagen an Bildung und Abbau von Amyloid beteiligt sind. Sie exprimieren Cathepsine in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsstatus unterschiedlich stark, Cathepsin K vor allem in der Spätphase der Entzündungsreaktion.

#### **5.2.4 Cathepsine**

Alle drei Cathepsine konnten bei allen drei untersuchten Mäusestämmen immunhistochemisch in Makrophagen direkt neben Amyloidablagerungen nachgewiesen werden (S. 61, Abb. 4.18/ Abb. 4.19/ Abb. 4.20; S. 62, Abb. 4.21). Innerhalb der Makrophagen wurden die Cathepsine bei allen Mäusen verstärkt zu einem Zeitpunkt exprimiert, als die Entzündungsreaktion bereits abgelaufen war (Tag 35). Dies gilt insbesondere für Cathepsin K, welches bei Balb/c- und SCID-Mäusen in Makrophagen vor Tag 35 kaum anfärbbar war, so dass eine Rolle dieses Enzyms bei der Entstehung von Amyloid sehr unwahrscheinlich wird.

Gewisse Unterschiede in der Cathepsinexpression zwischen Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen ließen sich feststellen. Cathepsin K war in Makrophagen von Nude-Mäusen bereits am Tag 10 regelmäßig und damit deutlich frühzeitiger nachweisbar als Balb/c- und SCID-Mäusen (S. 65, Abb. 4.24/ Abb. 4.25). Nude-Mäuse sind para-

doxerweise relativ resistent gegen verschiedene Krankheitserreger (*Listeria monocytogenes* [30, 51, 139], *Brucella abortus* [30], *Salmonella typhimurium* [139], *Staphylococcus aureus* [139] und *Candida albicans* [158]). Diese Resistenz wurde auf eine verstärkte unspezifische Abwehr, insbesondere Heraufregulation der Makrophagenfunktion zurückgeführt. Bemerkenswerterweise fanden sich bei Nude-Mäusen bereits 3 Stunden nach Applikation von Erregern (*Staph. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*) geringere Erregerzahlen in Blut und lymphatischen Organen als bei Balb/c-Mäusen. Daraus wurde gefolgert, dass bei Nude- im Gegensatz zu Balb/c-Mäusen die Makrophagen zu einem weit früheren Zeitpunkt bzw. bereits im Ruhezustand aktiviert sind [139].

Die Beobachtung, dass bei Nude-Mäusen, die Makrophagen für Cathepsin K weit früher anfärbbar waren (Tag 10 versus Tag 35) und auch für Cathepsin B und L eine intensivere Färbung zeigten, könnte darauf hindeuten, dass Cathepsine zur verstärkten Aktivität der Makrophagen beitragen. Dazu passt auch, dass Cathepsin K, wie bereits erwähnt, als Aktivierungsmarker für Makrophagen gilt.

Eine nebenbefundlich, unabhängig von der Amyloidentwicklung gemachte Beobachtung bezüglich der Cathepsin-Expression bei Nude-Mäusen ist, dass diese Mäuse stark Cathepsin-positive Zellen im Zentrum der Milzfollikel besitzen (S. 66, Abb. 4.26/ Abb. 4.27). Diese Zellen lassen sich prinzipiell auch bei Balb/c-Mäusen nachweisen, jedoch in augenscheinlich geringerer Anzahl (SCID-Mäuse haben keine follikulären Strukturen in der Milz). Von der Lokalisation und Morphologie der Zellen könnte es sich um sogenannte Sternenhimmel-Makrophagen handeln. Mit diesem Begriff werden Makrophagen bezeichnet, die im Zentrum von Lymphfollikeln lokalisiert sind und Zelldebris von Lymphozyten phagozytiert haben [194, 182]. Sie sollen eine Rolle bei der Regulation der Keimzentrumsreaktion spielen [182]. Zumindest für Cathepsin B ist eine sehr starke Expression des Enzyms in diesen Zellen beschrieben worden [40].

Der zeitliche Verlauf der Cathepsinexpression während der Entzündungsreaktion unterscheidet sich grundsätzlich nicht zwischen Amyloid- und Nicht-Amyloidmäusen. Ob sich die Cathepsinexpression in den einzelnen Makrophagen quantitativ zwischen Amyloid- und Nicht-Amyloidmäusen unterscheidet, lässt sich anhand der immunhistochemischen Färbungen nicht abschließend sagen. Zumindest ließen sich keine augenscheinlichen Unterschiede zeigen.

Dazu sei angemerkt, dass am Tag 35, als die Cathepsin-Expression in den Kupferzellen am intensivsten war, nur noch eines der Tiere größere Amyloidmengen aufwies. Überdies sind andere Methoden zur Quantifizierung der Expression geeigneter, als die zwangsläufig subjektive Beurteilung der Intensität einer histologischen Färbung.

Cathepsin B und L wurde in dem Leberpräparat, das substantielle Mengen von Amyloid aufwies, vermehrt innerhalb der Leberzellen exprimiert (S. 63, Abb.4.22/Abb. 4.23). Für Cathepsin B ist eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Hepatozyten sehr wahrscheinlich. Es wurde gezeigt, dass sich eine Apoptose von Leberzellen nach toxischer Schädigung durch Knockout von Cathepsin B verhindern lässt [71]. Es lässt sich vermuten, dass die Leberzellen auch durch Amyloid in der Weise geschädigt werden, dass sie mit verstärkter Cathepsin B und L Expression reagieren. Dies ist insofern interessant, als dass lange Zeit galt, dass Amyloid durch einen reinen Verdrängungseffekt die Zellen von der Blutzufuhr abnabelt. Inzwischen sind direkte toxische Effekte von in vitro synthetisierten Amyloidfibrillen auf Körperzellen demonstriert worden [225, 122, 97]. Als Mechanismen für die toxische Wirkung sind oxidativer Stress [166, 69], Destruktion der Zellmembran [93, 52] und die Bildung pathologischer Ionenkanäle [126, 52] diskutiert worden. Der Zelltod scheint jeweils durch einen apoptotischen Mechanismus ausgelöst zu werden [211], was zu einer verstärkten Cathepsin B-Expression passen würde. Die starke Anfärbbarkeit von Cathepsin B und L in Hepatozyten könnte also auf eine tatsächliche toxische Wirkung des Amyloids auf diese Zellen hindeuten.

Alle drei Cathepsine wurden am Ende der Entzündungsreaktion innerhalb der Makrophagen heraufreguliert, unabhängig davon, ob die Tiere Amyloid entwickelt hatten oder nicht. Es sieht folglich nicht danach aus, als ob Cathepsine als spezifische Reaktion auf das Amyloid verstärkt exprimiert werden. Dies muss jedoch nicht ausschließen, dass sie im Rahmen einer entzündungsbedingten Heraufregulation Amyloid abbauen könnten. Die Amyloidablagerungen verschwinden bei der AA-Amyloidose der Maus bekanntermaßen im Zeitverlauf. Bezieht man ein, dass neutrophile Granulozyten zum Zeitpunkt dieses Verschwindens nicht in der Nähe der Ablagerungen zu finden sind, Ablagerungen in der Spätphase der Entzündung regelhaft von Makrophagen umgeben sind und diese in der Zellkultur isolierte AA-Amyloidfibrillen auch spalten können [200], dann lässt sich vermuten, dass es am

ehesten die Makrophagen sind, die für die Regression des Amyloids verantwortlich sind. Wenn Makrophagen nun regelmäßig Cathepsine exprimieren, könnten diese auch für die Auflösung des Amyloids mitverantwortlich sein.

Insbesondere für Cathepsin K lässt sich eine Art Abräumfunktion im Rahmen der Entzündungsreaktion vermuten, und weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Cathepsin K-Knockout-Mäuse signifikant mehr Amyloid bilden als Balb/c-Mäuse (unveröffentlichte Untersuchungen), so dass ein Zusammenhang mit einem Abbau von Amyloid naheliegt.

Eine Beeinflussung und ggf. Verstärkung der metabolischen Funktion von Makrophagen auf der Ebene der Cathepsine wäre ein neuer Ansatzpunkt zur Therapie von Amyloidosen, der im Gegensatz zu den bisherigen Therapieoptionen den Abbau von bereits entstandenen Amyloidablagerungen ermöglichen würde.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Amyloid unterliegt nach heutigem Wissensstand dynamischen Umbauprozessen. Welche Faktoren an Aufbau und Regression der Ablagerungen beteiligt sind ist bisher nicht bekannt. Die Cysteinproteasen Cathepsin B, K und L sind ubiquitär am lysosomalen Abbau von Proteinen beteiligt, u. a. spielen sie beim Umbau von Bindegewebe und Knochengewebe eine wichtige Rolle. Insbesondere Cathepsin L und K sind hochpotent in der Spaltung von Elastin und verschiedenen Kollagentypen. Cathepsin B und L konnten in allen, Cathepsin K in rund der Hälfte der untersuchten Präparate von AA- und AL-Amyloidpatienten immunhistochemisch neben den Ablagerungen nachgewiesen werden. Alle drei Enzyme spalten SAA und AA-Amyloidproteine.

Die Hypothese der vorgelegten Arbeit ist, dass Cathepsin B, K und L als ubiquitär, auch neben Amyloid exprimierte Proteasen, im Sinne ihrer bekannten Funktionen an der Pathogenese der systemischen Amyloidosen beteiligt sein könnten.

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob Cathepsine AL-Amyloidproteine und Amyloidablagerungen spalten können und in welchem räumlichen und zeitlichen Zusammenhang ihre Expression mit Aufbau und Regression des Amyloids steht.

Hierzu wurden Degradationsexperimente an aufgereinigten AL-Amyloidproteinen und nativen AL-Amyloidablagerungen bei saurem und physiologischem pH durchgeführt. Desweiteren wurde immunhistochemisch die Lokalisation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Cathepsin B, Cathepsin K und Cathepsin L bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen nach Induktion einer systemischen AA-Amyloidose zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass auch AL-Amyloid ein Substrat für Cathepsin B, K und L darstellt. Cathepsin B, K und L konnten aufgereinigte Amyloidproteine

und im Nativzustand im Gewebe vorliegende Amyloidablagerungen bei sauren pH-Werten effizient spalten. Cathepsin K war in der Lage die Amyloidproteine komplett aufzulösen. Die Degradation der Amyloidproteine ließ sich in abgeschwächtem Maße auch bei physiologischem pH-Wert nachweisen.

Bei allen drei Mausspezies waren Makrophagen unabhängig vom Zeitpunkt regelmäßig um Amyloidablagerungen zu finden, während sich ein Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und Amyloid nicht feststellen ließ. Es zeigte sich in der Leber eine selektiv um die Amyloidablagerungen stattfindende Herabregulation des Markers F4/80 an Tag 10 und 17, was eine Veränderung der metabolischen Funktionen der Kupfferzellen vermuten lässt. Damit ist, unter Berücksichtigung auch der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, eine Beteiligung von Makrophagen in der Pathogenese der experimentellen AA-Amyloidose als wahrscheinlich zu werten.

Makrophagen wiederum sind reich an Cysteinproteasen wie Cathepsin B, K und L. In der hier vorgestellten Untersuchung waren die Cathepsine bei allen drei Mausstämmen immunhistochemisch innerhalb von Makrophagen um die Amyloidablagerungen regelmäßig nachweisbar. Die Immunreaktion innerhalb der Makrophagen war generell an Tag 35 nach Gabe des Entzündungsstimulus am intensivsten, was auf eine "Abräumfunktion" im Rahmen der Entzündungsreaktion hindeuten könnte.

Damit ist demonstriert worden, dass Cathepsin B, K und L prinzipiell Vorläuferproteine, Amyloidproteine und native Ablagerungen der beiden häufigsten systemischen Amyloidosen spalten können und in einer Lokalisation und zeitlichen Expression nachweisbar sind, die eine solche Spaltung auch ermöglichen würde.

Es drängt sich die Frage auf, warum sich Amyloid bei Patienten anreichert. Gründe hierfür könnten unter anderem auf der Ebene des lysosomalen Proteinabbaus durch Cathepsine liegen, beispielsweise, wenn die entsprechenden Vorläuferproteine durch proteolytische Spaltung überschießend gebildet werden oder durch Insuffizienz des lysosomalen Proteinabbaus die Bildung von Amyloid dessen Abbau übersteigt.

Weitere Untersuchungen, welche Faktoren Makrophagen und die Aktivität von Cathepsinen beeinflussen, wären für ein besseres Verständnis von Amyloidentstehung und -regression hilfreich. Darüber hinaus könnten sich daraus neue Therapieoptionen eröffnen, die spezifisch am Amyloid, insbesondere an der Ermöglichung eines Abbaus von bestehenden Ablagerungen, ansetzen würden.



# Literaturverzeichnis

- [1] L Ailles, R Kisilevsky, and ID Young. Induction of perlecan gene expression precedes amyloid formation during experimental murine AA amyloidogenesis. *Lab Invest*, 69(4):443–448, 1993.
- [2] RC Allen and B Budowle. *Protein staining and identification techniques*, volume IX. Eaton Pub., 1999.
- [3] A Argiles, M Garcia Garcia, and G Mourad. Phagocytosis of dialysis related amyloid deposits by macrophages. *Nephrol Dial Transplant*, 17:1136–1138, 2002.
- [4] LM Atley, JS Mort, M Lalumiere, and DR Eyre. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: Characterization of the cleavage sites generating the cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone*, 26(3):241–247, 2000.
- [5] MA Axelrad, R Kisilevsky, J Willmer, et al. Further characterization of amyloid-enhancing factor. *Lab Invest*, 47(2):139–146, 1982.
- [6] R Badolato, JM Wang, WJ Murphy, et al. Serum amyloid A is a chemoattractant: Induction of migration, adhesion and tissue infiltration of monocytes and polymorphnuclear leukocytes. *J Exp Med*, 180:203–209, 1994.
- [7] KN Balaji, N Schaschke, W Machleidt, et al. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med*, 196(4):493–503, 2002.
- [8] Y Bando, E Kominami, and N Katunuma. Purification and tissue distribution of rat cathepsin L. *J Biochem*, 100(1):35–42, 1986.
- [9] R Bansal, N Ahmad, and JR Kidwai. In vitro conversion of proinsulin to insulin by cathepsin B in isolated islets and its inhibition by cathepsin B antibodies. *Acta Diabetol Lat*, 17(3-4):255–266, 1980.
- [10] R Baron, L Neff, D Louvard, and PJ Courtoy. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol*, 101:2210–2222, 1985.
- [11] C Beers, K Honey, S Fink, et al. Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon  $\gamma$ -treated macrophages. *J Exp Med*, 197(2):169–179, 2003.
- [12] J Bendiske and BA Bahr. Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis - an approach for slowing Alzheimer disease? *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(5):451–463, May 2003.
- [13] K Berglund, C Keller, and H Thysell. Results, principles and pitfalls in the management of renal AA-amyloidosis: A 10-21 year follow-up of 16 patients with rheumatic disease treated with alkylating cytostatics. *J Rheumatol*, 20:2051–2057, 1993.

- [14] CC Blake, MJ Geisow, SJ Oatley, et al. Structure of prealbumin: Secondary, tertiary and quarternary interactions determined by fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol*, 121(3):339–356, 1978.
- [15] S Bohne, K Sletten, R Menard, et al. Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K and L. *J Pathol*, 203(1):528–537, 2004.
- [16] M Botto, PN Hawkins, MC Bickerstaff, et al. Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nat Med*, 3(8):855–859, 1997.
- [17] D Brömme and K Okamoto. Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary. Molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 376:379–384, 1995.
- [18] D Brömme, K Okamoto, BB Wang, and S Biroc. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. *J Biol Chem*, 271(4):2126–2132, 1996.
- [19] D Brömme, A Steinert, S Friebe, et al. The specificity of bovine spleen cathepsin S - a comparison with rat liver cathepsins L and B. *Biochem J*, 264:475–481, 1989.
- [20] P Brown, CJ Gibbs Jr, P Rodgers-Johnson, et al. Human spongiform encephalopathy: The National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*, 35(5):513–529, 1994.
- [21] MR Buck, DG Karustis, NA Day, et al. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues. *Biochem J*, 282:273–278, 1992.
- [22] F Bühling, A Reisenauer, A Gerber, et al. Cathepsin K - a marker of macrophage differentiation ? *J Pathol*, 195(3):375–382, 2001.
- [23] F Bühling, N Waldburg, S Krüger, et al. Expression of cathepsins B, H, L, and S during human fetal lung development. *Dev Dyn*, 225(1):14–21, 2002.
- [24] JN Buxbaum, JV Chuba, GC Hellman, et al. Monoclonal immunoglobulin deposition disease: Light chain and light and heavy chain deposition disease and their relation to light chain amyloidosis (Review). *Ann Int Med*, 112(6):455–464, 1990.
- [25] EM Castano, F Prelli, M Prass, and B Frangione. Apolipoprotein E carboxy-terminal fragments are complexed to amyloids A and L. *J Biol Chem*, 270(29):17610–17615, 1995.
- [26] AM Cataldo, CY Thayer, ED Bird, et al. Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer’s disease: Evidence for a neuronal origin. *Brain Res*, 513(2):181–192, 1990.
- [27] BR Celli, A Rubinow, AS Cohen, and JS Brody. Patterns of pulmonary involvement in systemic amyloidosis. *Chest*, 74(5):543–547, 1978.
- [28] SJ Chan, B San Segundo, MB McCormick, and DF Steiner. Nucleotide and amino acid sequence of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:7721–7725, 1986.
- [29] HA Chapman, RJ Riese, and G-P Shi. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*, 59:63–88, 1997.
- [30] C Cheers and R Walker. Activated macrophages in congenitally athymic “nude” mice and in lethally irradiated mice. *J Immunol*, 115:844–847, 1975.

- [31] G Chevrel, C Jenvrin, B McGregor, and P Miossec. Renal type AA amyloidosis associated with rheumatoid arthritis: A cohort study showing improved survival on treatment with pulse cyclophosphamid. *Rheumatology*, 40(7):821–825, 2001.
- [32] SF Chowdhury, J Sivaraman, and J Wang. Design of noncovalent inhibitors of human cathepsin L from the 96-residue proregion to optimized tripeptides. *J Med Chem*, 45:5321–5329, 2002.
- [33] AS Cohen and E Calkins. The isolation of amyloid fibrills and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. *J Cell Biol*, 21:481–486, 1964.
- [34] AS Cohen and T Shirahama. Animal model for human disease: Spontaneous and induced amyloidosis. *Am J Pathol*, 68(2):441–444, 1972.
- [35] FE Cohen, KM Pan, Z Huang, et al. Structural clues to prion replication. *Science*, 264:530–531, 1994.
- [36] LW Cohen, C Fluharty, and LC Dihel. Synthesis of papain in escherichia coli. *Gene*, 88(2):263–268, 1990.
- [37] RL Comenzo, E Vosburgh, RH Falk, et al. Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL amyloidosis: Survival and responses in 25 patients. *Blood*, 91(10):3662–3670, 1998.
- [38] RL Comenzo, E Vosburgh, RW Simms, et al. 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.
- [39] GG Cornwell, WL Murdoch, RA Kyle, et al. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med*, 75(4):618–623, 1983.
- [40] J Crocker, D Burnett, and Jones EL. Immunohistochemical demonstration of cathepsin B in the macrophages of benign and malignant lymphoid tissues. *J Pathol*, 142(1):87–94, Jan 1984.
- [41] H David, I Uerlings, and P Reinke. The perisinusoidal functional unit in amyloidosis. *Exp Pathol*, 32:153–162, 1987.
- [42] EJP de Koning, JJG van den Brand, VL Mott, et al. Macrophages and pancreatic islet amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest*, 5(4):247–254, 1998.
- [43] JM Delaisse, Y Eeckhout, and G Vaes. In vivo and in vitro evidence for the involvement of cysteine proteinases in bone resorption. *Biochem Biophys Res Comm*, 125(2):441–447, 1984.
- [44] KR Desikan, MV Dhokapkar, A Hough, et al. Incidence and impact of light chain associated (AL) amyloidosis on the prognosis of patients with multiple myeloma treated with autologous transplantation. *Leuk Lymphoma*, 27(3-4):315–319, 1997.
- [45] V Dhillon, P Woo, and D Isenberg. Amyloidosis in the rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 48:696–701, 1989.
- [46] MV Dhodapkar, MA Hussein, E Rasmussen, et al. Clinical efficacy of high-dose dexamethasone with maintenance dexamethosone/alpha interferon in patients with primary systemic amyloidosis: Results of United States Intergroup Trial Southwest Oncology Group. *Blood*, 104(12):3520–3526, 2004.
- [47] A Diaz, AC Willis, and RB Sim. Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Mol Med*, 6(8):648–659, 2000.

- [48] SW Dubrey, K Cha, J Anderson, et al. The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement. *QJM*, 91:141–157, 1998.
- [49] P Edwards, DA Cooper, J Turner, et al. Resolution of amyloidosis (AA type) complicating chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95(3):810–815, 1988.
- [50] R Elliott-Bryant, JS Liang, JD Sipe, and ES Cathcart. Catabolism of lipid-free recombinant apolipoprotein serum amyloid A by mouse macrophages in vitro results in removal of the amyloid fibril forming amino terminus. *Scand J Immunol*, 48:241–247, 1998.
- [51] P Emmerling, H Finger, and J Boekemuhl. *Listeria monocytogenes* infection in nude mice. *Infect Immun*, 12:437–439, 1975.
- [52] I Engström, G Ronquist, L Petterson, and A Waldenström. Alzheimer amyloid beta-peptides exhibit ionophore-like properties in human erythrocytes. *Eu J Clin Invest*, 25:471–476, 1995.
- [53] M Eulitz, DT Weiss, and A Solomon. Immunoglobulin heavy-chain-associated amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6542–6546, 1990.
- [54] V Everts, E van der Zee, L Creemers, and W Beertsen. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *J Histochem*, 28(4), 1996.
- [55] RAB Ezekowitz, J Austyn, PD Stahl, and S Gordon. Surface properties of *Bacillus Calmette-Guerin*-activated mouse macrophages. *J Exp Med*, 154:60–75, 1981.
- [56] ME Figueiredo-Pereira, S Efthimipopoulos, N Tezapsidis, et al. Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid  $\beta$ -proteins A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 respectively. *J Neurochem*, 72(4):1417–1422, 1999.
- [57] A Fuks and D Zucker-Franklin. Impaired Kupffer cell function precedes development of secondary amyloidosis. *J Exp Med*, 161(5):1013–1028, 1985.
- [58] DC Gajdusek and V Zigas. Degenerative disease of the central nervous system in new guinea: The epidemic occurrence of “kuru“ in the native population. *N Engl J Med*, 257:974–978, 1957.
- [59] K Ganowiak, P Hultman, U Engström, et al. Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice. *Biochem Biophys Res Comm*, 199:306–312, 1994.
- [60] M Garcia-Garcia, A Àrgilés, A Gouin-Charnet, et al. Impaired lysosomal processing of  $\beta$ 2-microglobulin by infiltrating macrophages in dialysis amyloidosis. *Kidney Int*, 55:899–906, 1999.
- [61] P Garnerio, O Borel, I Bryalsen, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mamalian proteinases. *J Biol Chem*, 273(48):32347–32352, 1998.
- [62] BD Gelb, GP Shi, HA Chapman, and RJ Desnick. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273:1236–1238, 1996.
- [63] MA Gertz and RA Kyle. Secondary systemic amyloidosis: Response and survival in 64 patients. *Medicine*, 70(4):246–56, 1991.
- [64] MA Gertz, G Merlini, and SP Treon. Amyloidosis and Waldenström’s Makroglobulinemia. *Hematology*, 1:257, 2004.
- [65] CJ Gibbs, DM Asher, A Kobrine, et al. Transmission of Creutzfeld-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57:757–758, 1994.

- [66] JD Gillmore, LB Lovat, MR Persey, et al. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*, 358(9275):24–29, 2001.
- [67] GG Glenner. Amyloid deposits and amyloidosis - the  $\beta$ -fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med*, 302(23):1283–1292, 1980.
- [68] GG Glenner. Amyloid deposits and amyloidosis - the  $\beta$ -fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med*, 302(24):1333–1343, 1980.
- [69] Y Goodman and MP Mattson.  $K^+$  channel openers protect hippocampal neurons against oxidative injury and amyloid beta-peptide toxicity. *Brain Res*, 706:328–332, 1996.
- [70] DN Gosalia, CM Salisbury, JA Ellman, and SL Diamond. High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays. *Mol Cell Proteomics*, 4(5):626–636, 2005.
- [71] ME Guicciardi, H Miyoshi, SF Bronk, and GJ Gores. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis and liver injury. *Am J Pathol*, 159(6):2045–2054, 2001.
- [72] D Ham and SC Skoryna. Generation of amyloid A protein by the cell lines from amyloid-susceptible and -resistant mice. *Scand J Immunol*, 59:117–122, 2004.
- [73] PN Hawkins. Serum amyloid P component scintigraphy for diagnosis and monitoring amyloidosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11:649–655, 2002.
- [74] PN Hawkins. Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement. *J Nephrol*, 16:443–448, 2003.
- [75] PN Hawkins, S Richardson, JE MacSweeney, et al. Scintigraphic quantification and serial monitoring of human visceral amyloid deposits provide evidence for turnover and regression. *QJM*, 86:365–374, 1993.
- [76] MT Heise and HW Virgin. The T-cell-independent role of  $\gamma$ -Interferon and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol*, 69(2):904–909, 1995.
- [77] St Hirsch, JM Austyn, and S Gordon. Expression of the macrophage specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J Exp Med*, 154:713–725, 1981.
- [78] EC Hoefsmit, IL Schadee-Eestermans, and RH Beelen. The development of the resident pattern of endogenous peroxidatic activity in mouse peritoneal macrophages coincides with the expression of the differentiation antigen F4/80. *J Histochem Cytochem*, 34(5):633–640, 1986.
- [79] E Holm, K Sletten, and G Husby. Structural studies of a carbohydrate-containing immunoglobulin-lambda-light-chain amyloid fibril protein AL of variable subgroup III. *Biochem J*, 239:545–551, 1986.
- [80] G Holmgren, BG Ericzon, CG Groth, et al. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet*, 341(8853):1113–1116, 1993.
- [81] FF Hou and WF Owen.  $\beta$ 2-microglobulin amyloidosis: Role of monocytes/macrophages. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11:417–421, 2002.
- [82] WS Hou, Z Li, RE Gordon, et al. Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol*, 159(6):2167–2177, 2001.

- [83] R Hrcic, J Wall, DA Wolfenbarger, et al. Antibody-mediated resolution of light chain-associated amyloid deposits. *Am J Pathol*, 157(4):1239–1245, 2000.
- [84] H-C Hsu, T Zhou, P-A Yang, et al. Increased acute-phase response and renal amyloidosis in aged CD2-fas-transgenic mice. *J Immunol*, 158:5988–5996, 1997.
- [85] MR Hurle, LR Helms, L Li, et al. A role for destabilizing amino acid replacement in light chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:5446–5450, 1994.
- [86] G Husby, T Stenstad, JH Magnus, et al. Interactions between circulation amyloid fibril protein precursors and extracellular matrix components in the pathogenesis of systemic amyloidosis. *Clin Immunol Immunopathol*, 70:2–9, 1994.
- [87] K Ii, K Hizawa, E Kominami, et al. Different immunolocalizations of cathepsins B, H, and L in the liver. *J Histochem Cytochem*, 33(11):1173–1175, 1985.
- [88] B Im, E Kominami, D Grube, and Y Uchiyama. Immunocytochemical localization of cathepsin B and H in human pancreatic endocrine cells and insulinoma cells. *Histochemistry*, 93(2):111–118, 1989.
- [89] S Inoue and R Kisilevsky. A high resolution ultrastructural study of experimental murine AA amyloid. *Lab Invest*, 74(3):670–683, 1996.
- [90] T Inui, O Ishibashi, T Inaoka, et al. Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption. *J Biol Chem*, 272(13):8109–8112, 1997.
- [91] J Isaac, JD Kerby, WJ Russell, et al. In vitro modulation of AL-amyloid formation by human mesangial cells exposed to amyloidogenic light chains. *Amyloid*, 5(4):238–246, 1998.
- [92] PL Jager, BP Hazenberg, EJ Franssen, et al. Kinetic studies with iodine-123-labeled serum amyloid P component in patients with systemic AA and AL amyloidosis and assessment of clinical value. *J Nucl Med*, 39:699–706, 1998.
- [93] J Janson, RH Ashley, D Harrison, et al. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*, 48:491–498, 1999.
- [94] JT Jarrett and PT Lansbury. Seeding “one-dimensional“ crystallization of Amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer disease and Scrapie? (Review). *Cell*, 73:1055–1058, 1993.
- [95] K Johan, G Westermark, U Engström, et al. Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2558–2563, 1998.
- [96] V Jokimaa, S Oksjoki, H Kujari, et al. Expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 7(1):73–78, 2001.
- [97] J Jordàn, MF Galindo, RJ Miller, et al. Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and  $\beta$ -amyloid induced toxicity in rat hippocampal and pyramidal neuronal cultures. *J Neurosci*, 18(1):195–204, 1998.
- [98] N Joss, K McLaughlin, K Simpson, and UK Boulton-Jones. Presentation, survival and prognostic markers in AA amyloidosis. *QJM*, 93(8):535–542, 2000.
- [99] W Kafienah, D Brömme, DJ Buttle, et al. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J*, 331:727–732, 1998.
- [100] JW Kelly. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat Struct Biol*, 7:824–826, 2000.

- [101] R Khurana, A Agarwal, VK Bajpai, et al. Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma. *Endocrinology*, 145:5465–5470, 2004.
- [102] CI Kim, K Franzblau, T Shirahama, and AS Cohen. The effect of papain, pronase, Nagarse and trypsin on isolated amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 181:465–467, 1969.
- [103] Y Kim, JS Wall, J Meyer, et al. Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation. *J Biol Chem*, 275(3):1570–1574, 2000.
- [104] HW Klafki, HD Kratzin, AI Pick, et al. Complete amino acid sequence determinations demonstrate identity of the urinary Bence Jones protein and the amyloid fibril protein in a case of AL-amyloidosis. *Biochemistry*, 31(12):3265–3275, 1992.
- [105] B Kluve-Beckerman, JJ Liepnieks, L Wang, and MD Benson. A cell culture system for the study of amyloid pathogenesis. *Am J Pathol*, 155:123–133, 1999.
- [106] B Kluve-Beckerman, J Manaloor, and JJ KLiepnieks. Binding, trafficking and accumulation of serum amyloid A in peritoneal macrophages. *Scand J Immunol*, 53:393–400, 2001.
- [107] H Koga, H Yamada, Y Nishimura, K Kato, and T Imoto. Multiple proteolytic action of liver cathepsin B: Specificities and pH-dependences of the endo- and exopeptidase activities. *J Biochem*, 110(2):179–188, 1991.
- [108] E Komiani, T Tsukahara, Y Bando, and N Katunuma. Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J Biochem*, 98(1):87–93, 1985.
- [109] RA Kyle, MA Gertz, PR Greipp, et al. A trial of three regimens for primary amyloidosis: Colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalane, prednisone, and colchicine. *N Engl J Med*, 336(17):1202–1207, 1997.
- [110] A Laufer, M Fields, and A Polliak. Lysosomal enzymes and their relation to the distribution and resorption of experimental amyloid. *Acta Path Microbiol Scand A*, 233:183–188, 1972.
- [111] A Lautwein, T Burster, AM Lennon-Dumenil, et al. Inflammatory stimuli recruit cathepsin activity to late endosomal compartments in human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 32(12):3348–57, 2002.
- [112] G Lavie, D Zucker-Franklin, and EC Franklin. Degradation of serum amyloid A protein by surface-associated enzymes of human blood monocytes. *J Exp Med*, 148:1020–1031, 1978.
- [113] GT Layton, SJ Harris, FA Bland, et al. Therapeutic effects of cysteine proteases inhibition in allergic lung inflammation: Inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflamm Res*, 50(8):400–408, 2001.
- [114] Z Li, W-S Hou, and D Brömme. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry*, 39:529–536, 2000.
- [115] E Lindhorst, D Young, W Bagshaw, and other. Acute inflammation, acute phase serum amyloid A and cholesterol metabolism in the mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1339(1):143–154, 1997.
- [116] AW Lyon, S Narindrasorasak, ID Young, et al. Co-deposition of basement membrane components during the induction of murine splenic AA amyloid. *Lab Invest*, 64(4):785–790, 1991.

- [117] RA Maciewicz, SF Wotton, DJ Etherington, et al. Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Letters*, 269(1):189–193, 1990.
- [118] Y Maekawa, K Himeno, H Ishikawa, et al. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J Immunol*, 161(5):2120–2127, 1998.
- [119] JH Magnus, G Husby, and SO Kolset. Glycosaminoglykans are present in purified AA type amyloid fibrils associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 48:215–219, 1989.
- [120] JH Magnus, T Stenstad, G Husby, and SO Kolseth. Isolation and partial characterization of heparan sulphat proteoglycans from human hepatic amyloid. *Biochem J*, 287:225–231, 1992.
- [121] N Marks, MJ Berg, VS Sapirstein, et al. Brain cathepsin B but not metalloendopeptidases degrade rAPP751 with production of amyloidogenic fragments. Comparison with synthetic peptides emulating  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase sites. *Int J Pept Protein Res*, 46(3-4):306–313, 1995.
- [122] PC May, LN Boggs, and KS Fuson. Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: Similarity to alzheimer’s disease amyloid-beta neurotoxicity. *J Neurochem*, 61:2330–2333, 1993.
- [123] VJ McParland, AP Kalverda, and SW Homans. Structural properties of an amyloid precursor of  $\beta(2)$ -microglobulin. *Nat Struct Biol*, 9:326–331, 2002.
- [124] G Merlini and P Westermark. The systemic amyloidoses: Clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies. *J Int Med*, 255:159–178, 2004.
- [125] N Mimassi, P Youinou, and Y-L Pennec. Amylose et vieillissement. *Ann Med Interne*, 6:383–388, 2002.
- [126] TA Mirzabekov, M Lin, and BL Kagan. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem*, 271:1988–1992, 1996.
- [127] T Miyata, R Inagi, and K Kurokawa. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of dialysis-related amyloidosis. *Miner Electrolyte Metab*, 25:114–117, 1999.
- [128] T Miyata, K Kurokawa, and CV Destrihou. Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol*, 11:1744–1752, 2000.
- [129] T Miyata, O Oda, R Inagi, et al.  $\beta$ 2-microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest*, 92:1243–1252, 1993.
- [130] K Moin, NA Day, M Sameni, et al. Human tumor cathepsin B - comparison with normal liver cathepsin B. *Biochem J*, 285:427–434, 1992.
- [131] B Morland and A Pedersen. Cathepsin B activity in stimulated mouse peritoneal macrophages. *Lab Invest*, 41(5):379–384, 1979.
- [132] D Müller, A Roessner, and C Röcken. 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*, 437:521–527, 2000.
- [133] G Münch, R Schinzel, C Loske, et al. Alzheimer’s disease - synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm*, 105:439–461, 1998.



- [134] EA Myatt, FA Westholm, DT Weiss, et al. Pathogenic potential of human monoclonal immunoglobulin light chains: Relationship of in vitro aggregation and in vivo organ deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:3034–3038, 1994.
- [135] R Myllykangas-Luosujärvi, K Aho, H Kautiainen, and M Hakala. Amyloidosis in a nationwide series of 1666 subjects with rheumatoid arthritis who dies during 1989 in Finland. *Rheumatology*, 38:499–503, 1999.
- [136] TY Nakagawa and AY Rudensky. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev*, 38:235–251, 1999.
- [137] SR Nelson, M Lyon, JT Gallagher, et al. Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Biochem J*, 275:67–73, 1991.
- [138] DS Newcombe and AS Cohen. Solubility characteristics of isolated amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 104:480–486, 1965.
- [139] AD Nickol and PF Bonventre. Anomalous high native resistance of athymic mice to bacterial pathogens. *Infect and Immun*, 18(3):636–645, 1977.
- [140] TA Niewold, PR Hol, ACJ van Andel, et al. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest*, 56(5):544–549, 1987.
- [141] KE Olsen, K Sletten, O Sandgren, et al. What is the role of giant cells in AL-Amyloidosis ? *Amyloid: Int J Exp Clin Invest*, 13(6):1438–1445, 1999.
- [142] LA Omtvedt, D Bailey, DV Renouf, et al. Glycosylation of immunoglobulin light chains associated with amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest*, 7:227–244, 2000.
- [143] KD O’Neill, NX Chen, M Wang, et al. Cellular uptake of  $\beta$ 2M in synovial fibroblasts and macrophages. *Nephrol Dial Transplant*, 18:46–53, 2003.
- [144] S Ozaki, M Abe, D Wolfenbarger, et al. Preferential expression of human  $\lambda$ -light-chain variable region subgroups in Multiple Myeloma, AL Amyloidosis and Waldenström macroglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol*, 71:183–189, 1994.
- [145] MB Pepys, TW Rademacher, S Amatayakul-Chantler, et al. Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:5602–5606, 1994.
- [146] KM Hummel PK Petrow, JK Franz, et al. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol*, 25(10):1887–1894, 1998.
- [147] SB Prusiner and SJ DeArmond. Prion diseases and neurodegeneration. *Ann Rev Neurosci*, 17:311–339, 1994.
- [148] H Puchtler and F Sweat. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 13(8):693–694, 1965.
- [149] H Puchtler, FS Waldrop, and SN Meloan. A review of light polarization and fluorescence microscopic methods for amyloid. *Appl Pathol*, 3:5–17, 1985.
- [150] F Quian, SJ Chan, Q Gong, et al. The expression of cathepsin B and other lysosomal proteinases in normal tissues and in tumors. *Biomed Biochim Acta*, 50(4-6):531–540, 1991.

- [151] VY Reddy, Q-Y Zhang, and SJ Weiss. Pericellular mobilisation of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci*, 92:3849–3853, 1995.
- [152] C Reid, L Hebert, G Pozzulo, and F Gervais. Splenic macrophage activation and function in amyloid enhancing factor-induced secondary amyloidosis. Study of phagocytosis, killing, respiratory burst, and MHC II surface expression. *J Leukoc Biol*, 53(6):651–657, 1993.
- [153] JJ Reilly, RW Mason, P Chen, et al. Synthesis and processing of cathepsin L, an elastase, by human alveolar macrophages. *Biochem J*, 257(2):493–498, 1989.
- [154] C Röcken, V Hegenbarth, M Schmitz, et al. Plasmocytoma of the tonsil with AL-amyloidosis: Evidence of post-fibrillogenic proteolysis of the fibril protein. *Virchows Arch*, 436:336–344, 1999.
- [155] C Röcken, R Kientsch-Engel, S Mansfeld, et al. Advanced glycation end products and receptor for advanced glycation end products in AA amyloidosis. *Am J Pathol*, 162(4):1213–1220, 2003.
- [156] C Röcken, R Menard, Buhling F, et al. 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.
- [157] C Röcken, B Stix, B Brömme, et al. A putative role for cathepsin K in degradation of AA and AL amyloidosis. *Am J Pathol*, 158(3):1029–38, 2001.
- [158] JT Rogers, E Balish, and DD Manning. The role of cell mediated immunity in resistance to experimental candidiasis. *J Reticuloendothel Soc*, 20:291–298, 1976.
- [159] CJ Rosenthal and EC Franklin. Variation with age and disease of an Amyloid A protein-related serum component. *J Clin Invest*, 55, 1975.
- [160] R Rysava, M Merta, V Tesar, et al. Can serum amyloid A or macrophage colony stimulating factor serve as a marker of amyloid formation ? *Biochem Mol Biol Int*, 47(5):845–850, 1999.
- [161] P Saftig, E Hunziker, O Wehmeyer, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13453–13458, 1998.
- [162] N Sasaki, M Takeuchi, H Chowei, et al. Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques. *Neurosci Lett*, 326(2):117–120, 2002.
- [163] H Schägger and G Jagow. Tricine-sodium duodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166:368–379, 1987.
- [164] H Schmid, M Koop, S Utermann, et al. Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron. *Biol Chem*, 378(2):61–69, 1997.
- [165] AM Schmidt, SD Yan, SF Yan, and DM Stern. The biology of the receptor of advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta*, 1498:99–111, 2000.
- [166] D Schubert, C Behl, A Brack, et al. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:1989–1993, 1995.

- [167] E Shaw and RT Dean. The inhibition of macrophage protein turnover by a selective inhibitor of thiol proteinases. *Biochem J*, 186(2):385–390, 1980.
- [168] G-P Shi, HA Chapman, SM Bhairi, et al. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endoproteinase and homologue of rabbit OC2. *FEBS Letters*, 357:129–134, 1995.
- [169] T Shirahama and AS Cohen. Lysosomal breakdown of amyloid fibrils by macrophages. *Am J Pathol*, 63(3):463–486, 1971.
- [170] T Shirahama and AS Cohen. An analysis of the close relationship of lysosomes to early deposits of amyloid. *Am J Pathol*, 73:97–114, 1973.
- [171] T Shirahama and AS Cohen. Intralysosomal formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol*, 81:101–116, 1975.
- [172] T Shirahama and AS Cohen. Immunocytochemical study of hepatocyte synthesis of amyloid AA. Demonstration of usual site of synthesis and intracellular pathways but unusual retention on the surface membrane. *Am J Pathol*, 118(1):108–115, 1985.
- [173] T Shirahama, K Miura, S-T Ju, et al. Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. *Lab Invest*, 62(1):61–68, 1990.
- [174] T Shirahama, M Skinner, and AS Cohen. Heterogenous participation of the hepatocyte population in amyloid protein AA synthesis. *Cell Biol Int Rep*, 8(10):849–856, 1984.
- [175] UI Sires, TM Schmid, CJ Fliszar, et al. Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin B. *J Clin Invest*, 95(5):2089–2095, 1995.
- [176] M Skinner, V Sancherawala, DC Seldin, et al. High-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation in patients with AL amyloid: An 8-year study. *Ann Int Med*, 140(2):85–93, 2004.
- [177] M Skinner, T Shirahama, AS Cohen, and CL Deal. The association of amyloid P-component (AP) with amyloid fibril: An updated method for amyloid fibril protein isolation. *Preparat Biochem*, 12(5):461–476, 1983.
- [178] K Sletten, JB Natvig, G Husby, and J Juul. The complete amino acid sequence of a prototype immunoglobulin- $\lambda$  light-chain-type amyloid-fibril protein AR. *Biochem J*, 195:561–572, 1981.
- [179] EC Sleyster and DL Knook. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest*, 47(5):484–490, 1982.
- [180] BF Sloane. Cathepsin B and cystatins: Evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol*, 1(2):137–152, 1990.
- [181] BF Sloane, J Rozhin, D Robinson, and KV Honn. Role for cathepsin B and cystatins in tumor growth and progression. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 371 Suppl.:193–198, 1990.
- [182] JP Smith, GF Burton, JG Tew, and AK Szakal. Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev Immunol*, 6(3-4):285–294, 1998.
- [183] A Solomon, B Frangione, and EC Franklin. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V $\lambda$ VI-subgroup of human light chains with amyloidosis AL $\lambda$ . *J Clin Invest*, 70:453–460, 1982.
- [184] A Solomon, D Weiss, and MB Pepys. Induction in mice of human light-chain associated amyloidosis. *Am J Pathol*, 140(3):629, 1992.

- [185] A Solomon, DT Weiss, and AA Kattine. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med*, 324(26):1845–1851, 1991.
- [186] T Stenstad, JH Magnus, and G Husby. Characterization of proteoglycans associated with mouse splenic AA amyloidosis. *Biochem J*, 15(303):663–670, 1994.
- [187] T Stenstad, JH Magnus, SO Kolset, et al. Macromolecular properties of glycosaminoglycans in primary AL amyloid fibril extracts of lymphoid tissue origin. *Scand J Immunol*, 34:611–617, 1991.
- [188] T Stenstad, JH Magnus, SO Kolset, and G Husby. Identification of glycosaminoglycans in human renal and splenic secondary AA amyloid fibril preparation. *Scand J Rheumatol*, 20:1–7, 1991.
- [189] FJ Stevens, EA Myatt, C-H Chang, et al. A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: Immunoglobulin light chains. *Biochemistry*, 34(34):10697–10702, 1995.
- [190] PJ Stone, JM Campistol, CR Abraham, et al. Neutrophil proteases associated with amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Comm*, 197:130–136, 1993.
- [191] WJ Strittmatter, AM Saunders, D Schmechel, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:1977–1981, 1993.
- [192] GK Sukhova, G-P Shi, DI Simon, et al. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 102(3):576–583, Aug 1998.
- [193] T Suzuki, S Ishikawa, T Motoyama, and S Oboshi. Experimental murine amyloidosis. Evaluation of induction methods and strain differences. *Acta Pathol Jpn*, 30(4):549–56, 1980.
- [194] DC Swartzendruber and CC Congdon. Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. *J of Cell Biol*, 19:641–646, 1963.
- [195] YM Tagouri, PW Sanders, MM Picken, et al. In vitro AL-amyloid formation by rat and human mesangial cells. *Lab Invest*, 74(1):290–302, 1996.
- [196] S Taguchi, S Watabe, H Kouyama, et al. Characterization of porcine adrenocortical lysosomes. *J Biochem*, 89(5):1411–21, 1981.
- [197] M Takahashi, T Yokota, H Kawano, et al. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virch Arch*, 415:411–419, 1989.
- [198] SY Tan, A Irish, CG Winearls, et al. Long term effect of renal transplantation on dialysis-related amyloid deposits and symptomatology. *Kidney Int*, 50(1):282–289, 1996.
- [199] SY Tan, MB Pepys, and PN Hawkins. Treatment of amyloidosis. *Am J Kidney Dis*, 26(2):267–85, 1995.
- [200] GA Tennent, LB Lovat, and MB Pepys. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:4299–4303, 1995.
- [201] AM Teppo and CP Maury. Do serine proteinases degrade amyloid A fibrils? *Scand J Immunol*, 18(4):363–366, Okt 1983.
- [202] K Tezuka, Y Tezuka, A Maejima, et al. Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem*, 269(2):1106–1109, 1994.

- [203] B Turk, I Dolenc, V Turk, and JG Bieth. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 32:375–380, 1993.
- [204] B Turk, I Dolenc, E Zerovnik, et al. Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry*, 33:14800–14806, 1994.
- [205] J Varga, MSM Flinn, T Shirahama, et al. The induction of accelerated murine amyloidosis with human spleen extract. Probable role of amyloid enhancing factor. *Virch Arch*, 51(3):177–185, 1986.
- [206] KJ Vargas and LC Stephens. Resistance of Rowett athymic (nude) rats to casein-induced amyloidosis. *Am J Vet Res*, 44(8):1597–1599, 1983.
- [207] JA Villadangos, RA Bryant, J Deussing, et al. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 172:109–120, 1999.
- [208] H Vlassara. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med*, 28:419–426, 1996.
- [209] H Vlassara. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*, 46:19–25, 1997.
- [210] BJ Votta, MA Levy, A Badger, et al. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Mineral Res*, 12(9):1396–1406, 1997.
- [211] C-N Wang, C-W Chi, Y-L Lin, et al. The neuroprotective effects of phytoestrogens on amyloid  $\beta$  protein-induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons. *J Biol Chem*, 276:5287–5295, 2001.
- [212] O Werdelin and P Ranov. Amyloidosis in mice produced by transplantation of spleen cells from casein treated mice. *Acta Pathol Microbiol Scand*, pages 1–18, 1966.
- [213] GT Westermark, P Westermark, and K Sletten. Amyloid fibril AA - characterization of uncommon subspecies from a patient with rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, 57(1):57–64, 1987.
- [214] P Westermark, MD Benson, JN Buxbaum, et al. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 12(1):1–4, 2005.
- [215] P Westermark, L Grimelius, JM Polak, et al. Amyloid in polypeptide hormone-producing tumors. *Lab Invest*, 37:212–215, 1977.
- [216] P Westermark, K Sletten, B Johansson, and GB Cornwell III. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:2843–2845, 1990.
- [217] R Wetzol. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol*, 12:193–198, 1994.
- [218] B Wiederanders, D Brömme, H Kirschke, et al. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J Biol Chem*, 267(19):13708–13713, 1992.
- [219] SI Woodrow, RJ Steward, R Kisilevsky, et al. Experimental AA amyloidogenesis is associated with differential expression of extracellular matrix genes. *Amyloid*, 6(1):22–30, 1999.
- [220] JR Wright, AI Ozdemir, M Matsuzaki, et al. Amyloid resorption: Possible role of multinucleated giant cells. The apparent failure of penicillamine treatment. *Johns Hopkins Med J*, 130(5):278–288, 1972.

- [221] T Yamada, B Kluge-Beckerman, JJ Liepnieks, and MD Benson. 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, 1995.
- [222] T Yamada, JJ Liepnieks, B Kluge-Beckerman, and MD Benson. 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.
- [223] SD Yan, H Zhu, A Zhu, et al. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature Med*, 6(6):643–651, 2000.
- [224] GCH Yang, R Nieto, I Stachura, and Gallo GR. Ultrastructural immunohistochemical localization of polyclonal IgG, C3 and Amyloid P component on the Congo-red amyloid-like fibrils of fibrillary glomerulopathy. *Am J Pathol*, 141:409–419, 1992.
- [225] BA Yankner, LR Dawes, S Fisher, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer’s disease. *Science*, 245(4916):417–420, 1989.
- [226] C-H Yeh, L Sturgis, J Haidacher, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*, 50:1495–1504, 2001.
- [227] S Yokota and K Kato. Immunocytochemical localization of cathepsins B and H in rat liver. *Histochemistry*, 88(1):97–103, 1987.
- [228] S Yokota, Y Nishimura, T Kawabata, and K Kato. Immunoenzyme localization of cathepsins in the Golgi region of rat hepatocytes and renal tubule cells. *Histochemistry*, 94(6):629–635, 1990.
- [229] S Yokota, H Tsuji, and K Kato. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat kidney. Electron microscopic study using the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem*, 34(7):891–897, 1986.
- [230] S Yokota, H Tsuji, and K Kato. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat kidney. II. Electron microscopic study using the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem*, 34(7):899–907, 1986.
- [231] T Zhang, Y Maekawa, T Sakai, et al. Treatment with cathepsin L inhibitor potentiates Th2-type immune responses in Leishmania major infected Balb/c mice. *Int Immunol*, 13(8):975–982, 2001.

## Veröffentlichungen

S Bohne, K Sletten, R Ménard, et al.

Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K and L.

*J Pathol*, 203(1): 528-537, 2004

S Bohne, C Röcken, F Bühling, et al.

Pre-eminent role of Cathepsin B-, K-, and L-expressing activated macrophages in the pathogenesis of AA Amyloidosis

-in Vorbereitung-

# Abbildungsverzeichnis

4.1	AL-Amyloidproteine von zwei Patienten . . . . .	42
4.2	Degradationsexperimente bei saurem pH - Patient 1 . . . . .	45
4.3	Degradationsexperimente bei saurem pH - Patient 2 . . . . .	46
4.4	Degradationsexperimente bei physiologischem pH . . . . .	47
4.5	Degradationsexperimente mit amyloidhaltigen Gefrierschnitten . . .	48
4.6	Degradation von amyloidhaltigen Gefrierschnitten - Kongorotfärbung	49
4.7	Entwicklung von Amyloid bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen . .	52
4.8	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Leber - Übersichtsaufnahme: typische Verteilung von Kupfferzellen und Amyloidablagerungen . . . . .	54
4.9	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Leber: Kaum Anfärbbarkeit von Kupfferzellen um Amyloidablagerungen an Tag 10 . . . . .	56
4.10	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Leber: Schwache Anfärbbarkeit von Kupfferzellen um Amyloidablagerungen an Tag 17 . . . .	56
4.11	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Leber: Positive Kupfferzellen um Amyloidablagerungen an Tag 24 . . . . .	56
4.12	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Milz - Übersichtsaufnahme: Typisches Verteilungsmuster von Makrophagen und Amyloidablagerungen . . . . .	57
4.13	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Nebenniere: Makrophagen um Amyloid . . . . .	58
4.14	Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Nebenniere: Vergleichspräparat aus der Kontrollgruppe . . . . .	58
4.15	Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber: Induktion in Hepatozyten . . . . .	60



4.16 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber: Vergleichspräparat aus der Kontrollgruppe . . . . .	60
4.17 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber: Detailaufnahme von Hepatozyten . . . . .	60
4.18 Immunfärbung mit Anti-CathB-Antikörper, Leber: Positive Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	61
4.19 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber: Positive Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	61
4.20 Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper, Leber: Positive Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	61
4.21 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Kongorotfärbung, Leber, Nude-Maus: Positive Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	62
4.22 Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper, Leber: Starke Anfärbbarkeit für Cathepsin L bei massiven Amyloidablagerungen . . . . .	63
4.23 Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper, Leber: Vergleichspräparat mit geringem Amyloidbefall . . . . .	63
4.24 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber: Kaum CathK positive Kupferzellen . . . . .	65
4.25 Immunfärbung mit Anti-CathK-Antikörper, Leber, Nude-Maus: Zahlreiche positive Kupferzellen . . . . .	65
4.26 Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper, Milz, Nude-Maus: Stark positive Zellen im Zentrum des Milzfollikels . . . . .	66
4.27 Immunfärbung mit Anti-CathL-Antikörper, Milz, Nude-Maus: Detailaufnahme . . . . .	66
4.28 Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Kongorotfärbung, Leber: Keine positiven Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	68
4.29 Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Kongorotfärbung, Leber, SCID-Maus: Positive Kupferzellen um Amyloidablagerungen . . . . .	68
4.30 Immunfärbung mit Anti-F4/80-Antikörper, Kongorotfärbung, Milz, SCID-Maus: Spärliche Amyloidablagerungen . . . . .	69
4.31 Immunfärbung mit F4/80-Antikörper, Milz, SCID-Maus: Typisches Färbemuster . . . . .	69

# Tabellenverzeichnis

1.1	humanpathogene Amyloidproteine . . . . .	9
3.1	Antikörper . . . . .	30
4.1	Amyloidentwicklung bei Balb/c-, Nude- und SCID-Mäusen . . . . .	51

# Curriculum vitae

## Persönliche Daten:

Name:	Silvia Bohne
Geburtsdatum:	07.11.1978
Geburtsort:	Rahden
Anschrift:	Schellheimerplatz 1 39108 Magdeburg

## Bildungsweg:

1985-1989	Grundschule Oppenwehe
1989-1998	Söderblom-Gymnasium Espelkamp, Abitur am 09.06.1998
1998-2005	Studium der Humanmedizin an der Otto-von- Guericke-Universität Magdeburg
14.09.2000	Ärztliche Vorprüfung
17.09.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.09.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.10.2003-15.03.2004	Forschungsaufenthalt an der University of Ten- nessee Graduate School of Medicine
08.04.2004-25.02.2005	Praktisches Jahr
10.05.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01.07.2005	Assistenzärztin, Städtisches Klinikum Mag- deburg, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Kopf- Hals-Chirurgie

# Erklärung

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

**In vitro und in vivo Untersuchungen  
zur funktionellen Bedeutung  
der Cathepsine B, K und L  
bei der systemischen AA- und AL-Amyloidose**

im Institut für Pathologie,  
Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
mit Unterstützung durch das Human Immunology and Cancer Program,  
University of Tennessee Health Science Center, Knoxville

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Diese Dissertation wurde von mir bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

# Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. A. Roessner für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in dem unter seiner Leitung stehenden Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchzuführen.

Prof. Dr. med. C. Röcken möchte ich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und Hilfestellung bei der Anfertigung der Arbeit herzlich danken.

Prof. A. Solomon und seinen Mitarbeitern danke ich für die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes an ihrem Institut, die freundliche Aufnahme und gute Betreuung. Besonderer Dank geht an Sallie D. Macy für die technische Einarbeitung.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität für die konstruktive Arbeitsatmosphäre, ganz besonders bei Sophie Mansfeld und Stacy Carl-McGrath für Anleitung und Unterstützung.

Für die Durchsicht der Arbeit danke ich Aline Hohbein, Ulrike Hohbein, Sabrina Löttsch und Kerstin Steinhauff.

Ein großes Dankeschön geht an Christian Hohnstädt für umfassende EDV-technische Hilfe.

Danke an meine Familie für Geduld und Verständnis.