

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prävalenz und Herkunft renaler Amyloidosen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna von Hutten

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Röcken  
2. Prof. Dr. med. Lobeck  
3. Prof. Dr. med. Amann

Datum der Promotion: 09.09.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Amyloid - eine kurze Einführung.....	1
1.1.1 Geschichte des Amyloids .....	1
1.1.2 Definition .....	2
1.1.3 Nomenklatur.....	2
1.1.4 Lokalisation .....	4
1.1.5 Morphologie .....	4
1.1.5.1 Makroskopie .....	4
1.1.5.2 Mikroskopie .....	4
1.1.5.3 Elektronenmikroskopie .....	5
1.2 Amyloidogenese - ein multifaktorielles Geschehen.....	5
1.2.1 Die verschiedenen molekularen Bestandteile in Amyloiddepots .....	5
1.2.2 Amyloidogenese beeinflussende Faktoren .....	6
1.2.3 Fibrillenstruktur in vivo .....	6
1.3 Klinisches Erscheinungsbild – Augenmerk auf renale Veränderungen .....	7
1.3.1 Epidemiologie.....	7
1.3.2 Organschädigende Mechanismen des Amyloids .....	8
1.3.3 Systemische Amyloidoseformen und ihr klinisches Bild .....	8
1.3.3.1 AA-Amyloidose .....	10
1.3.3.2 AL-Amyloidose .....	12
1.3.3.3 Hereditäre Amyloidosen .....	13
1.3.3.3.1 ATTR-Amyloidose.....	13
1.3.3.3.2 AApoA1-/AApoA2- Amyloidose.....	14
1.3.3.3.3 AFib-Amyloidose.....	15
1.3.3.3.4 ALys-Amyloidose .....	15
1.4 Histologische Untersuchungsverfahren zur Diagnostik .....	15

1.4.1	Gewebeprobe.....	15
1.4.2	Kongorot-Färbung .....	16
1.4.3	Elektronenmikroskopie .....	17
1.4.4	Morphologische Differentialdiagnostik.....	18
1.5	Klassifikation .....	18
1.5.1	Immunhistologie .....	18
1.5.2	Proteinbiochemische Verfahren/Aminosäuresequenzanalyse .....	19
1.5.3	Molekularbiologische Verfahren .....	19
1.6	Zielsetzung .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methode .....</b>	<b>22</b>
2.1	Kollektiv .....	22
2.2	Histologie .....	22
2.3	Immunhistochemie .....	22
2.4	DNA Sequenzanalyse .....	24
2.5	Auswertung .....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1	Korrelation der Histologie und Immunhistochemie mit den klinischen Daten ..	26
3.1.1	AL-Amyloidose .....	27
3.1.1.1	AL $\lambda$ -Amyloidose .....	28
3.1.1.2	AL $\kappa$ -Amyloidose .....	30
3.1.1.3	AL-Amyloid n.o.s. ....	31
3.1.2	AA-Amyloidose.....	31
3.1.3	Hereditäre Amyloidosen.....	34
3.1.3.1	AFib-Amyloidose .....	34
3.1.3.2	AApoA1-Amyloidose.....	35
3.1.3.3	ATTR-Amyloidose .....	36
3.1.4	Unklassifizierbare Amyloidosen .....	36

3.2	Verlauf der Häufigkeit renaler Amyloidosen im Allgemeinen, bzw. der relativen Häufigkeiten von AL- und AA-Amyloidosen .....	37
3.3	Analyse der Immunhistochemie .....	38
3.3.1	Abweichung in der Klassifizierung im Vergleich zu bereits bestehenden Diagnosen .....	39
3.3.2	Immunreaktionen mit mehreren Antikörpern .....	39
4	<b>Diskussion</b> .....	42
4.1	Verteilung der Amyloidose .....	42
4.2	AA-Amyloidose .....	43
4.3	Hereditäre Amyloidosen .....	44
4.4	Alters- und Geschlechtsverteilung .....	45
4.5	Morphologische Ablagerungsmuster .....	46
4.6	Proteinurie .....	47
4.7	Immunhistochemische Klassifikation .....	47
4.8	Schlussfolgerung .....	49
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	50
6	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	51
7	<b>Anhang</b> .....	1
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	1
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	3
7.3	Tabellenverzeichnis .....	3
	Eidesstattliche Erklärung .....	4
	Eidesstattliche Erklärung .....	4
7.4	Danksagung .....	5

# 1 Einleitung

## 1.1 Amyloid - eine kurze Einführung

### 1.1.1 Geschichte des Amyloids

1854 berichtete Rudolph Virchow erstmals von einer Gewebeeinfiltration, die er umschreibend Amyloid (= stärkeähnlich) betitelte (Virchow 1854). Schon früher, ab dem 17. Jahrhundert, wurden bereits auf Amyloid zutreffende morphologische Veränderungen beschrieben (Schwartz 1970). Wie der Name Amyloid bereits impliziert, ging Virchow auf Grund von verschiedenen Verhaltensweisen der Substanz von dessen Kohlehydratursprung aus. Obwohl schnell klar wurde, dass es sich eigentlich um eine proteinhaltige Ablagerung handelt (Friedreich und Kekulé 1959), hatte sich der Begriff Virchows bereits in der Medizin etabliert und blieb so trotz irreführender Bedeutung bestehen. Im Laufe der Geschichte kam es zu methodisch-technischen Entwicklungen, wodurch sich die Diagnostik des Amyloids verbesserte: Nach Verwendung der Anilinfärbung (Heschl 1875; Jürgens 1875) setzte sich ab 1932 die Kongorot-Färbung, vor allem durch deren Effekt im polarisierten Licht, zur Diagnostik durch (Bennhold 1932; Puchtler, Sweat et al. 1962). Mit zunehmenden Erkenntnissen über die fibrilläre Zusammensetzung des Amyloids und fortschreitenden methodisch-technischen Untersuchungsmöglichkeiten (Eanes und Glenner 1968; Glenner, Eanes et al. 1972; Glenner, Terry et al. 1973) konnten bis heute über 29 amyloidogene Proteine identifiziert werden.

### 1.1.2 Definition

Amyloidosen bilden eine heterogene Gruppe von Krankheiten. Sie sind alle durch eine intra- oder extrazelluläre Ablagerung autologer Peptide und Proteine, Amyloid, bedingt. In linear polarisiertem Licht weist Amyloid nach Kongorot-Färbung eine anomale Polarisationsfarbe auf. Elektronenmikroskopisch lässt sich die Fibrillenstruktur des Amyloids darstellen. Die Fibrillen liegen starr und unverzweigt in variablen Längen, aber mit definierten Dicken von 7-20 nm vor (Cohen und Calkins 1959; Meinhardt und Fändrich 2009). Die Fibrillen werden aus antiparallel gelagerten Polypeptidketten gebildet. Ihnen liegt immer eine  $\beta$ -Faltblattstruktur zu Grunde.

Hierbei wird ein grundlegender Punkt der Pathogenese der Erkrankung deutlich: Dem Krankheitsgeschehen liegen Peptide und Proteine in veränderter Konformation zu Grunde.

All dies berücksichtigend definiert der ICD-10: E 85 Amyloid/Amyloidosen folgendermaßen:

*Amyloid* ist eine pathologische fibrilläre Polypeptidaggregation mit einer Cross- $\beta$ -Struktur, die intra- und/oder extrazellulär auftritt. *Amyloidosen* sind durch Amyloidablagerung verursachte Krankheiten.

### 1.1.3 Nomenklatur

Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und des „International Nomenclature Committee on Amyloidosis“ richtet sich die Nomenklatur des Amyloids und somit der Amyloidose nach dem jeweils vorliegenden Amyloidprotein (Kazatchkine, Husby et al. 1993; Westermark, Benson et al. 2007). Der von beiden Organisationen empfohlene Buchstabencode besteht aus einem am Anfang stehendem A, was für Amyloid steht, und dem in Kurzform wiedergegebenem Amyloidvorläuferprotein.

In der Tabelle 1 sind die gängigen Abkürzungen wiedergegeben.

Amyloidprotein	Vorläuferprotein	Organbefall	Grunderkrankung
AA	Serum Amyloid A (SAA)	Autonomes Nervensystem, Schilddrüse, Magen-Darm-Trakt, <b>Niere</b> , Milz, Leber	chronisch entzündliche Erkrankungen, familiäre Fiebererkrankungen
AL	monoklonale Immunglobulin-Leichtkette $\lambda$ oder $\kappa$	Haut, Nervensystem, Schilddrüse, Herz, Magen-Darm-Trakt, <b>Niere</b> , Nebenniere, Milz, Leber	klonale Plasmaerkrankungen: monoklonale Gammopathie, Multiples Myelom
ATTR	Transthyretin	Peripheres Nervensystem, Glaskörper, Herz, <b>Niere</b> (v.a. im Spätstadium)	hereditär
	Transthyretin (Wild Typ)	Haut, Herz	altersabhängig
AFib	Fibrinogen $\alpha$ -Kette	<b>Niere</b> (v.a. glomerulär), Milz, Leber	hereditär
AApoA1	Apolipoprotein A1	Haut, Kehlkopf, <b>Niere</b> (v.a. medullär), Leber	hereditär
AApoA2	Apolipoprotein A2	<b>Niere</b>	hereditär
ALys	Lysozym	Speicheldrüsen, Schilddrüse, Lunge, Magen-Darm-Trakt, <b>Niere</b> , Milz, Leber, Lymphatisches System	hereditär
AGel	Gelsolin	Gehirnnerven, Netzhaut	hereditär
ACys	Cystatin C	kranielle Gefäße	hereditär
A $\beta$ 2M	$\beta$ 2-Mikroglobulin	Herz, Magen-Darm-Trakt, Gelenke, Gefäße	Dialyse-bedingt

**Tabelle 1: Systemische Amyloidosen**

#### 1.1.4 Lokalisation

Im Gegensatz zu früheren Vermutungen kann Amyloid sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert sein. Die Ablagerungen können prinzipiell in jedem Organ gefunden werden. Hinsichtlich der Ausbreitung einer Amyloidose kann ein lokales, Organ-begrenztes von einem systemischen, in verschiedenen Organen auftretenden Verteilungsmuster unterschieden werden (Tabelle 1).

Wie Tabelle 1 zeigt, können verschiedene Amyloidvorläuferproteine zu einer renalen Amyloidose führen. Neben der AL- und AA-Amyloidose (Kyle und Greipp 1983; Kyle und Gertz 1995; Gertz, Lacy et al. 2002; Dember 2006) kann die Niere auch von verschiedenen familiären Amyloidosen, wie der AFib-, AApoA1-, ALys- oder ATTR-Amyloidose, betroffen sein (Valleix, Drunat et al. 2002; Yazaki, Farrell et al. 2003; Picken und Linke 2009).

#### 1.1.5 Morphologie

##### 1.1.5.1 Makroskopie

Bei ausgeprägtem Befall kann die Amyloidose bereits makroskopisch erkennbar sein. Hierbei kommt es zu einer Größenzunahme des betroffenen Organs. Durch die Ablagerungen verändert sich die Farbe und Konsistenz des ursprünglichen Gewebes. Es erscheint wächsern bis trocken.

In der Niere kann man makroskopisch zwei Ablagerungstypen unterscheiden: Bei einer glomerulären Amyloidose ist das betroffene Organ häufig vergrößert, blass-braun gefärbt und kann eine glatte bis fein granulierte Oberfläche aufweisen. Bei einem primär medullären Ablagerungsmuster kann eine Markstreifung sichtbar werden.

##### 1.1.5.2 Mikroskopie

Während geringe Mengen von Amyloid in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung nur schwer auszumachen sind, zeigen sich größere Mengen als strukturlose, azelluläre Ablagerungen, die sich schwach eosinrot anfärben lassen. Durch Kongorot-Färbung in Verbindung mit polarisiertem Licht zwischen gekreuzten Polaren zeigt Amyloid die charakteristische anomale Polarisationsfarbe (Howie und Brewer 2009).

### 1.1.5.3 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopisch betrachtet liegen teils geordnete, teils ungeordnete Bündel von bis zu 20  $\mu\text{m}$  starken, starren, nichtverzweigten Fibrillen unterschiedlicher Längen vor. Jede dieser Fibrillen setzt sich aus sich umschlingenden Filamenten zusammen, welche wiederum aus Protofilamenten bestehen.

## 1.2 Amyloidogenese - ein multifaktorielles Geschehen

### 1.2.1 Die verschiedenen molekularen Bestandteile in Amyloiddepots

Der Hauptteil der Amyloidablagerungen besteht aus Amyloidfibrillen, welche aus den jeweils amyloidogenen Vorläuferproteinen zusammengesetzt sind. Daneben finden sich ebenfalls heparan- und dermatansulphathaltige Proteoglykane. Sie haben die Neigung, sich in Gewebe ähnlich dem der Proteinfibrillen abzulagern und dort in Wechselwirkung mit Elementen der Extrazellulärmatrix, wie Laminin, Elastin und Kollagen IV, zu treten (Kisilevsky, Ancsin et al. 2007). Somit tragen sie maßgeblich zu dem kohlenhydrathaltigen Bestandteil von Amyloid bei.

Zusätzlich findet sich in jeder Amyloidablagerung das vom Plasmaglykoprotein Serum-Amyloid-P-Component abstammende Amyloid-P-Component. Das der Familie der Pentraxine zugehörige Protein ist auf Grund einer speziellen Calcium-abhängigen Ligandenbindungsstelle in der Lage, mit Amyloidfibrillen jeder Gattung eine Bindung einzugehen (Pepys 2001). Auf Grund seiner hohen proteolytischen Resistenz ist der Abbau der mit ihm verbundenen Amyloidfibrillen erschwert (Tennent, Lovat et al. 1995; Bohne, Sletten et al. 2004). Zusätzlich können sich noch Apolipoprotein E, verschiedene Proteinase-Inhibitoren und eine Vielzahl weiterer Bestandteile in Amyloidablagerungen finden. All diese Moleküle schaffen gemeinsam ein Gerüst, welches die Initialphase der Fibrillennukleation begünstigt. Alle hier genannten Bestandteile bedingen das Ablagerungsverhalten der verschiedenen Amyloidosen wesentlich (Merlini und Bellotti 2003).

Neben diesen konstitutiven Molekülen können sich aber auch Serumproteine wie Immunglobuline oder Akute-Phase-Proteine ablagern. Diese können auf Grund von punktuellen Positivreaktionen Verwirrung bei der immunhistologischen Amyloidklassifizierung schaffen (Röcken, Schwotzer et al. 1996).

### 1.2.2 Amyloidogenese beeinflussende Faktoren

Die molekulare Grundlage der Amyloidbildung ist die intrinsische Eigenschaft der Polypeptidketten, Wasserstoffbrücken innerhalb der Kette auszubilden ohne das Polypeptiderückrad zu ändern. Polypeptidketten sind organische Polymere. Dem zu Folge hat die Amyloidfibrille eine dem Polymercharakter entsprechende Struktur (Meinhardt und Fändrich 2009). Allen Amyloidfibrillen ist eine spezielle Konformation von Polypeptidketten gemein.

Die Entstehung der Fibrille wird von vielen Faktoren beeinflusst. So sind einige Proteine durch ihre Primär- und Sekundärstruktur dazu prädestiniert, Amyloidfibrillen zu bilden. Außerdem können Keimbahnmutationen in bestimmten Protein-determinierenden Genen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen, eine erhöhte Amyloidogenität erzeugen (Benson 2003). Auch beeinflusst die Konzentration, in der das Vorläuferprotein oder dessen Abbauprodukt vorliegt, die Entstehung von Amyloidfibrillen (Verine, Mourad et al. 2007). Die vor Ort herrschende Temperatur und der pH-Wert spielen hierbei ebenfalls eine Rolle (Merlini und Bellotti 2003). Bestimmte Gewebebestandteile, zum Beispiel Proteoglykane in Basalmembranen, können die Nukleationsphase des Amyloids fördern. Auch bereits bestehendes Amyloid kann den Nidus für weitere Amyloidbildung bilden (Röcken 2009\*).

### 1.2.3 Fibrillenstruktur in vivo

Amyloidfibrillen sind eine  $\beta$ -Cross-Struktur aufweisende fibrilläre Polypeptidaggregation. Dabei formen ein oder mehrere nebeneinander angeordnete  $\beta$ -Faltblätter das fibrilläre Rückrad. Die  $\beta$ -Faltblätter entstehen durch gleichmäßige Stapel von Polypeptiden. Dabei sind die  $\beta$ -Stränge der Polypeptide senkrecht zur Fibrillenachse platziert, die Wasserstoffbrückenbindungen liegen parallel zur Achse aus (Meinhardt und Fändrich 2009). Diese Anordnung verschafft den Fibrillen in elektronenmikroskopischen Bildern einen bandartigen Anschein. Die Fibrillenbildung führt über nicht-fibrilläre Aggregate und Protofibrillen zur reifen Amyloidfibrille. Diese stellt eine aus ein oder mehreren linksgedrehten Filamenten bestehende, 10-20 nm starke Struktur dar. Die filamentöse Grundeinheit bilden wiederum Protofilamente (Meinhardt und Fändrich 2009).

## 1.3 Klinisches Erscheinungsbild – Augenmerk auf renale Veränderungen

### 1.3.1 Epidemiologie

Momentan stehen noch keine aussagekräftigen epidemiologischen Daten bezüglich Amyloidosen weltweit zur Verfügung (Simms, Prout et al. 1994). In Nordamerika ist in Hinblick auf die AL-Amyloidose bekannt, dass 8 von 1.000.000 Menschen pro Jahr neu erkranken (Gertz und Rajkumar 2002). Das japanische Informations-Center gibt für die gleiche Amyloidform eine Prävalenzrate von 0,45 pro 100.000 Einwohner pro 5 Jahre an (Nishi, Alchi et al. 2008). Über die vor allem lokal gehäuft vorkommenden hereditären Amyloidosen ist es entsprechend schwierig, eine allgemeingültige Aussage zu fällen. In bestimmten Regionen Portugals liegt die Prävalenz beispielsweise bei bis zu 1:1000 Einwohner (Schmidt, Propsting et al. 1999). Generell kann die Erkrankung in jedem Lebensalter und sowohl bei Männern als auch bei Frauen auftreten (Röcken, Ernst et al. 2006). Es ist aber bekannt, dass die Inzidenz der Erkrankung mit höherem Alter steigt (Satoskar, Burdge et al. 2007) und Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Eriksson, Büttner et al. 2009).

Systemische Amyloidosen befallen häufig die Niere. In Italien geht man von einer Inzidenz renaler Amyloidosen von 2,1 pro 1.000.000 Einwohner aus (Bergesio, Ciciani et al. 2007). In Spanien ergab eine Studie bezüglich renaler Manifestationen eine Inzidenz von 4,6 AL-Amyloidose Fällen und 12,2 AA-Amyloidose Fällen pro 1.000.000 Einwohner (Esteve, Almirall et al. 2006). In der Niere sind diese beiden Formen am häufigsten anzutreffen. In Japan und Europa sind sie in etwa gleich stark vertreten (Nishi, Alchi et al. 2008). Im mediterranen oder auch im südostasiatischen Raum führen das gehäufte Vorkommen von entzündlichen Krankheiten wie dem Familiären Mittelmeerfieber bzw. Tuberkulose bisweilen zu einer höheren Prävalenz renaler AA-Amyloidosen (Singh, Singh et al. 1987; Mehta, Talwalkar et al. 1990; Ensari, Ensari et al. 2005). Auch verschiedene familiäre Amyloidosen, wie die AFib-, AApoA1-, ALys- oder ATTR- Amyloidosen, können zu renaler Amyloidablagerung führen (Valleix, Drunat et al. 2002; Yazaki, Farrell et al. 2003; Picken und Linke 2009; von Hutten, Mihatsch et al. 2009). Die Prävalenz hereditärer Amyloidosen ist bislang weitestgehend unbekannt. Lachmann et al. gehen davon aus, dass es sich bei 10% der als AL-Amyloidose klassifizierten Fälle eigentlich um hereditäre Formen handelt (Lachmann, Booth et al. 2002).

### 1.3.2 Organschädigende Mechanismen des Amyloids

Lange Zeit wurde als Ursache der Organschädigung die Zerstörung der Organarchitektur durch Amyloidablagerung angesehen. Heute ist bekannt, dass auch schon amyloidogene Vorläuferproteine und gefaltete fibrilläre Zwischenprodukte eine von der abgelagerten Form unabhängige Toxizität innehaben, welche das Krankheitsgeschehen entscheidend mitbeeinflusst (Brenner, Jain et al. 2004; Shi, Guan et al. 2010). Diese Erkenntnis erklärt die mangelnde Korrelation zwischen der Menge der Amyloidablagerungen und dem Ausmaß der Organschädigung.

### 1.3.3 Systemische Amyloidoseformen und ihr klinisches Bild

Wie bereits in Tabelle 1 ersichtlich, umfasst die Gruppe systemischer Amyloidosen eine Vielzahl verschiedener Krankheiten. Die einzelnen Formen untereinander, aber auch teilweise innerhalb einer Formengruppe, weisen einen höchst variablen Organbefall auf. Diese Varianz bedingt ein breites klinisches Erscheinungsbild, welches wiederum die Diagnosestellung für Kliniker erschwert.

In der Niere lagert sich Amyloid verschiedenster Herkunft häufig ab. Dort kann es in folgenden Strukturen auftreten: in den Glomeruli, den Gefäßen oder auch im tubulointerstitiellen Raum. Während Amyloid in allen Kompartimenten gleichzeitig vorliegen kann, lässt sich ein rein glomerulärer von einem vornehmlich extraglomerulären Ablagerungstyp unterscheiden. Bei ersterem lagert sich Amyloid vorerst im Mesangium der Glomeruli ab, was im fortgeschrittenen Stadium das gesamte Glomerulum betreffen kann. Die glomeruläre Schädigung zeigt sich klinisch durch Proteinurie (Röcken, Ernst et al. 2006; Helmchen, Velden et al. 2008). Die Spannweite der Proteinausscheidung reicht dabei von subnephrotischen Werten bis hin zu 30 g/d. Der vornehmlich extraglomeruläre, also vaskulo- und/oder tubulo-interstitielle Ablagerungstyp, führt eher zu einer Nierenfunktionsstörung mit reduzierter glomerulärer Filtrationsrate und nur geringer Proteinurie (Uda, Yokota et al. 2006; Verine, Mourad et al. 2007; Sen und Sarsik 2010). Außerdem kann die vaskuläre Beteiligung Bluthochdruck verursachen, ein sonst eher ungewöhnlicher Befund bei Amyloidose (Dember 2006). Ablagerungen um die Sammelgefäße im Nierenmark führen zu seltenen aber gut untersuchten Manifestationen des nephrogenen Diabetes insipidus (Carone und Epstein 1960).

Die renale Klinik mit Proteinurie, nephrotischem Syndrom und progressiver Niereninsuffizienz ist bei einer Vielzahl systemischer Amyloidosen symptomführend (Dember 2006; Ferrario und Rastaldi 2006; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Rysava 2007; Bergesio, Ciciani et al. 2008; Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008). So leiden bereits mehr als ein Viertel der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer systemischen Amyloidose an einem nephrotischen Syndrom (Nishi, Alchi et al. 2008).

Im Folgenden soll ein Überblick über systemische Amyloidosen gegeben werden.

### 1.3.3.1 AA-Amyloidose

Diese, früher als sekundäre Amyloidose bezeichnete Form gehört neben der AL-Amyloidose zu den am häufigsten vertretenen systemischen Formen. Das N-terminale Fragment des Akute-Phase-Proteins Serum-Amyloid A bildet hierbei das Amyloidprotein. Wie das Vorläuferprotein schon vermuten lässt, handelt es sich bei der AA-Amyloidose um eine Folgeerkrankung verschiedener chronischer infektiöser oder inflammatorischer Leiden. In den westlichen Ländern ist die Entwicklung einer AA-Amyloidose heute vor allem an chronisch entzündliche rheumatische, pulmonale oder gastrointestinale Erkrankungen gekoppelt. In anderen Ländern bedingen noch weitere Krankheiten die AA-Amyloidose, wie zum Beispiel das familiäre Mittelmeerfieber in der Türkei (Tabelle 2; Gertz und Kyle 1991; Gillmore, Hawkins et al. 1997; Gillmore, Lovat et al. 2001; Lachmann, Goodman et al. 2007).

---

#### Zu Grunde liegende Krankheiten der AA Amyloidose

---

##### **Nicht-infektiöse Erkrankungen:**

###### *Rheumatoide Erkrankungen:*

Rheumatoide Arthritis  
Juvenile Arthritis  
Adulter Morbus Still  
Spondylitis ankylosans  
Arthritis psoriatica  
Morbus Behcet

###### *Weitere chronische Erkrankungen:*

Morbus Crohn  
Colitis Ulcerosa  
Sprue  
Morbus Whipple  
Familiäres Mittelmeerfieber  
Sarkoidose  
Mukoviszidose

##### **Infektiöse Erkrankungen:**

Tuberkulose  
Chronische *H. pylori*-Gastritis und ander gastrointestinale Infektionen  
Osteomyelitis  
HIV-Infektionen  
Chronische Pyelonephritis

---

**Tabelle 2: Zu Grunde liegende Krankheiten der AA Amyloidose**

So entwickeln ca. 10% der an einer der oben genannten Erkrankungen leidenden Patienten im Laufe ihres Lebens eine AA-Amyloidose (Gratacos, Orellana et al. 1997; Myllykangas-Luosujarvi, Aho et al. 1999; Pepys 2001).

In der Klinik wird eine abnehmende Inzidenz der AA-Amyloidose beobachtet. Dieses erklärt man sich durch verbesserte Therapieverfahren der AA-Amyloidose zu Grunde liegenden Erkrankungen. Man geht davon aus, dass sich die AA-Amyloidose dadurch länger in einer subklinischen Phase befindet (Laiho, Tiitinen et al. 1999; Hazenberg und van Rijswijk 2000; Kaipainen-Seppänen, Myllykangas-Luosujärvi et al. 2000).

Die AA-Amyloidose ist eine systemische Amyloidose. So kann zum Beispiel die Leber, die Milz, die Nebenniere und der Gastrointestinaltrakt betroffen sein (Erdkamp, Gans et al. 1991; Blank und Lorenz 2009; Gioeva, Kieninger et al. 2009; Renzulli, Schoepfer et al. 2009). In fortgeschrittenen Stadien kann es so teilweise zu Malassimilation, Blutungen und Leberzirrhose-ähnlichen Zuständen kommen (Hazenberg, van et al. 2004). Andere Organe, wie zum Beispiel das Herz, werden hingegen eher selten in Mitleidenschaft gezogen (Kieninger, Eriksson et al. 2010).

Fast immer aber betrifft die AA Amyloidose die Niere (Falk, Comenzo et al. 1997; Lachmann, Goodman et al. 2007; Grootsholten, Bajema et al. 2008; von Hutten, Mihatsch et al. 2009). Hierbei kann es ebenfalls zu den in 1.3.3 beschriebenen verschiedenen Verteilungsmustern mit entsprechender Symptomatik wie Proteinurie und progressivem Nierenversagen kommen. Bezüglich der Verteilung der AA-Amyloidose geben Helmchen et al. ein Verhältnis zwischen glomerulärem und ausschließlich vaskulärem Befall von annähernd 4:1 an. Außerdem zeichnet sich der AA-Typ durch seine Affinität zu dem tubulo-interstitiellen Kompartiment aus (Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008).

Je nach Grunderkrankung kommen therapeutisch Zytostatika, TNF- $\alpha$ -Blocker oder Antibiotika zum Einsatz. Die mittlere Patientenüberlebensdauer beträgt ca. 2-4 Jahre (Dember 2006).

### 1.3.3.2 AL-Amyloidose

Die Leichtketten-Amyloidose, früher als primäre Amyloidose bekannt, ist durch eine Plasmazell-Dyskrasie, zu 80% in Form einer monoklonalen Gammopathie, zu 20% durch ein multiples Myelom, bedingt (Kyle 1999; Gertz, Lacy et al. 2002). 10% der an einem multiplen Myelom Leidenden weisen eine AL-Amyloidose auf (Falk, Comenzo et al. 1997). Die übermäßige Produktion monoklonaler Immunglobuline bzw. derer Fragmente führt zur Bildung von Amyloid. Spezielle Aminosäuresequenzen prädisponieren die Immunglobulin-Leichtketten zur Amyloidogenese. Vergleicht man gesunde Erwachsene mit an AL-Amyloidose Erkrankten, fällt auf, dass unterschiedliche Verhältnisse von  $\kappa$ -Leichtketten-Immunglobulinen und  $\lambda$ -Leichtketten-Immunglobulinen vorliegen. Bei Gesunden liegt das  $\kappa$ : $\lambda$ -Verhältnis bei 2:1, bei Erkrankten bei 1:3 (Perfetti, Garini et al. 1995). Dies zeigt eine höhere Amyloidogenität der  $\lambda$ -Leichtketten.

Die AL-Amyloidose ist mit einer Inzidenz von ca. 10 Personen pro 1.000.000 die häufigste und schwerwiegendste Form aller systemischen Amyloidosen (Kyle, Linos et al. 1992; Rysava 2007). Neben der Niere (74%) sind das Herz (60%), die Leber (27%), der Gastrointestinaltrakt (10-20%) und das autonome Nervensystem (18%) die am häufigsten betroffenen Organe (Falk, Comenzo et al. 1997; Rysava 2007). Bei ca. 70% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits mehrere Organe befallen (Obici, Perfetti et al. 2005). Bei der körperlichen Untersuchung können Purpura, Hepato-Splenomegalie, Lymphadenopathie oder Makroglossie bereits vorliegen. Sie sind Ausdruck einer bereits fortgeschrittenen Erkrankung. Müdigkeit und Gewichtsverlust stellen generelle klinische Symptome dar. Je nach Befallsmuster variiert das weitere klinische Bild: Kardialer Befall stellt sich unter anderem durch Herzrhythmusstörungen, diastolische Funktionsstörungen bis hin zu progressiver Herzinsuffizienz dar (Kieninger, Eriksson et al. 2010). Störungen des autonomen Nervensystems können unter anderem eine kardiale Beeinträchtigung verschlimmern (Kyle, Kottke et al. 1966). Polyneuropathien finden sich bei bis zu 35% der Patienten (Röcken, Ernst et al. 2006).

Auch bei dieser Amyloidoseform manifestieren sich frühzeitig renale Funktionsstörungen wie das nephrotische Syndrom (Rysava 2007). Im Vergleich zur AA-Amyloidose ist die Höhe der Proteinurie und die Progression der Nierenfunktionsstörung sogar noch ausgeprägter (Helmchen, Velden et al. 2008).

Neben dem Herzen ist der Nierenbefall mit entsprechender Funktionseinschränkung ein wichtiger prognostischer Faktor. Zur Behandlung der Erkrankung werden heute Chemotherapeutika wie Melphalan und autologe Stammzelltransplantationen eingesetzt. Die mittlere Überlebensrate ist zum Zeitpunkt der Diagnose oft nur noch ein Jahr.

### 1.3.3.3 Hereditäre Amyloidosen

Hereditäre Amyloidosen fassen all jene Amyloidose-Formen zusammen, die auf eine Keimbahnmutation zurückzuführen sind, die Primärstruktur eines Proteins verändern und damit die Bildung von Amyloid begünstigen. Die vor über 50 Jahren erstmals entdeckte ATTR-Amyloidose stellt hierbei die häufigste Form dar (Andrade 1952). Im Laufe der Jahre wurden weitere erbliche Amyloidkrankheiten identifiziert: die AApoA1-, AApoA2, ACys-, ALys- und die AFib-Amyloidose. Wie die Namen bereits verraten, stammt jede Form von autologen, physiologischen Proteinen ab, deren Primärstruktur durch eine Mutation verändert wurde. Durch die jeweils unterschiedlichen Proteinablagerungen und spezielle Ablagerungsmuster zeichnet sich jede Form durch eine eigene Klinik aus. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Formen mit renaler Beteiligung vorgestellt:

#### 1.3.3.3.1 ATTR-Amyloidose

Transthyretin (TTR) bildet sowohl bei der hereditären ATTR-Amyloidose als auch in der senilen kardiovaskulären Form das Amyloidvorläuferprotein. Das größtenteils in der Leber, teilweise auch im Plexus choroideus und im Auge produzierte Protein dient vornehmlich dem Transport des Schilddrüsenhormons Thyroxin (Robbins und Rall 1960). Bis heute sind über 95 amyloidogene Keimbahnmutationen beschrieben worden.

Die Inzidenz der unterschiedlichen Mutationen variiert nach geographischer Lage (Tawara, Nakazato et al. 1983; Jacobson, Pastore et al. 1997; Eriksson, Büttner et al. 2009). Klinisch äußert sich die autosomal-dominant vererbte ATTR-Amyloidose unter anderem durch Polyneuropathien, Malabsorption, kardiale Störungen wie Herzrhythmusstörung und Kardiomyopathien wie auch durch Glaskörpertrübung (Benson 2003; Benson und Kincaid 2007; Connors, Prokaeva et al. 2009). Erst spät kommt es bei dieser Amyloidoseform zu einem prognostisch weniger entscheidenden Nierenbefall (Haagsma, Hawkins et al. 2004).

Die mit dem Wildtyp des Transthyretins assoziierte senile kardiovaskuläre Amyloidose betrifft vornehmlich Organe des Thorax (Eriksson, Büttner et al. 2009). Durch eine Lebertransplantation kann diese hereditäre Amyloidoseform therapiert werden (Ericzon, Larsson et al. 2003; Dember 2006).

#### 1.3.3.3.2 AApoA1-/AApoA2- Amyloidose

Die AApoA1-Amyloidose liegt entweder als nichterbliche Form mit Wildtyp-Proteinablagerungen in atherosklerotischen Plaques oder als autosomal dominant vererbte Form vor (Mucchiano, Jonasson et al. 2001). Bei der letzteren Form kommt es systemisch zu Ablagerungen der Proteinvarianten. Hierbei ist häufig die Niere, die Leber, der Larynx, die Haut und das Myokard (Eriksson, Schönland et al. 2009) betroffen.

Das in der Leber und dem Dünndarm synthetisierte Plasmaprotein ApoA1 stellt den Proteinanteil von Lipoproteinen dar und ist ein Kofaktor der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) (Sorci-Thomas und Thomas 2002). ApoA1 besteht aus 243 Aminosäuren, die auf dem Exon 3 und 4 des ApoA1 Gens codiert sind (Karathanasis, Norum et al. 1983). Bis heute sind bereits 16 Mutationen bekannt, die zu einer AApoA1-Amyloidose führen. Die histoanatomische Verteilung des Amyloids und die dadurch bedingte klinische Manifestation der hereditären AApoA1-Amyloidose scheinen vor allem durch die Lokalisation der Genmutation bedingt zu sein. So führen Mutationen im Codon 173-178 vornehmlich zur Herz-, Larynx- und Hautbeteiligung (Hamidi Asl, Liepnieks et al. 1999). Niere und Leber sind vor allem bei Mutationen im Codon 1-75 betroffen (Benson 2003; Eriksson, Schönland et al. 2009). In der Niere zeichnet sich die AApoA1-Amyloidose durch eine besondere Verteilung aus. Sie tritt häufig als isolierte Markamyloidose auf (Helmchen, Velden et al. 2008).

Die erstmals 2001 entdeckte AApoA2-Amyloidose ist durch Mutationen im Stopcodon des ApoA2-Gens bedingt. Hierdurch kommt es zu einer Proteinerweiterung um 21 Aminosäuren am C-terminalen Ende (Benson, Liepnieks et al. 2001). Bis heute sind vier amyloidogene Mutationen des ApoA2-Gens bekannt, welche sich alle mit einer ähnlichen Klinik, einem langsam progredienten Nierenversagen, präsentieren (Benson 2003; Röcken, Ernst et al. 2006). Momentan stellt die Nierentransplantation die einzige kurative Option dar (Magy, Liepnieks et al. 2003).

#### 1.3.3.3.3 AFib-Amyloidose

Bis heute sind sechs verschiedene Mutationen des in der Leber synthetisierten Plasmaproteins Fibrinogen bekannt, die zu einer AFib-Amyloidose führen können (Eriksson, Schönland et al. 2008). Trotz Mutation erfüllt das Fibrinogen jeweils noch seine Funktion in der Blutgerinnung (Serpell, Benson et al. 2007).

Klinisch präsentiert sich diese hereditäre Amyloidose durch Bluthochdruck und Proteinurie. In der Niere ist der rein glomeruläre Befall charakteristisch für die AFib-Amyloidose (Lachmann, Booth et al. 2002; Dember 2006; von Hutten, Mihatsch et al. 2009). Leber und Milz sind erst bei fortgeschrittenen Krankheitsverläufen betroffen (Benson 2005). Auch hier sind die Therapiemöglichkeiten begrenzt. Eine kombinierte Nieren- und Lebertransplantation stellt den vielversprechendsten Ansatz dar (Mousson, Heyd et al. 2006).

#### 1.3.3.3.4 ALys-Amyloidose

Bei dem ubiquitär vorkommenden Enzym Lysozym sind bis heute über fünf Mutationen entdeckt worden, die zu einer ALys-Amyloidose führen können (Röcken, Becker et al. 2006). Teilweise ist die bakteriolytische Funktion des Proteins in den Amyloidablagerungen noch intakt (Pepys, Hawkins et al. 1993). Typischerweise manifestiert sich diese Amyloidose in der Niere, vor allem in den Glomeruli. Ab dem 30.- bis 40. Lebensjahr kommt es zu Nierenfunktionsstörungen (Benson 2003).

### 1.4 Histologische Untersuchungsverfahren zur Diagnostik

Zur Diagnosestellung von Amyloid ist eine histologische Untersuchung einer Gewebeprobe unerlässlich.

#### 1.4.1 Gewebeprobe

Die Diagnose kann prinzipiell an jeder amyloidhaltigen Gewebeprobe gestellt werden. Bei Verdacht auf Amyloidose eignet sich vor allem die histologische Untersuchung von Gewebeproben symptomatischer Organe.

Da sich alle systemischen Amyloidosen in der Niere manifestieren können, stellt die Nierenbiopsie eine sensitive Methode zum Amyloidnachweis dar. So wird in ca. 1,7-4% aller Nierenbiopsien Amyloid nachgewiesen (Schena, Pannarale et al. 1996; Rivera, Lopez-Gomez et al. 2002; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Nishi, Alchi et al. 2008; von

Hutten, Mihatsch et al. 2009). Teilweise werden allerdings Bedenken bezüglich der Gewebeentnahme an der Niere geäußert, da eine mit Amyloidose assoziierte Gefäßfragilität ein erhöhtes Blutungsrisiko mit sich bringen kann. Bis jetzt liegen aber keine Zahlen vor, die erhöhte Blutungskomplikationen bei Nierenbiopsien an Amyloidosepatienten belegen (Dember 2006).

Falls eine Nierenbiopsie nicht durchgeführt werden kann, stehen weitere Alternativen zur Probengewinnung zur Verfügung. So stellt die von Westermark entwickelte Fettaspirationsbiopsie (FAB) eine einfach durchzuführende, kosten- und komplikationsarme Möglichkeit dar, Amyloid nachzuweisen (Westermark und Stenkvist 1973). Diese Methode zeichnet sich durch eine nahezu 100%ige Spezifität aus. Die Sensitivität liegt bei 50-80% und der positive prädiktive Wert bei 100%. Eine 2010 veröffentlichte Studie untersucht und belegt in diesem Zusammenhang auch erstmals die Eignung des so gewonnenen Materials zur Amyloidklassifizierung (Halloush, Lavrovskaya et al. 2010). Während so bereits AA-, AL- und einige hereditäre (AApoA1-, AApoA2-, AFib-, ALys-) Amyloidosen nachgewiesen werden konnten, werden andere Amyloidosen durch diese Methodik häufig nicht erfasst (Dember 2006; Röcken, Ernst et al. 2006).

Biopsien des Gastrointestinaltraktes, vor allem des Rektums, bieten im Vergleich zu der FAB eine höhere Sensitivität des Amyloidnachweises und gehören heute zu den Standardverfahren. Auch können hierbei die immunhistologischen Untersuchungen in der Regel umfassender durchgeführt werden (Kuroda, Tanabe et al. 2002).

Zur Abklärung einer peripheren Neuropathie kann eine Suralnervbiopsie beispielsweise zur Diagnose einer ATTR- oder AL-Amyloidose führen (Cohen 1994).

Im Allgemeinen ist zu der Sensitivität der unterschiedlichen Gewebeproben und Gewinnungsmethoden zu sagen, dass diese vor allem von der fachgerechten Materialgewinnung, dem Krankheitsstadium und der jeweiligen Amyloidform abhängt.

#### 1.4.2 Kongorot-Färbung

Zur Diagnosestellung „Amyloid“ gilt die am Paraffinschnitt ausgeführte Kongorot-Färbung als Goldstandart (Puchtler, Sweat et al. 1962). Die Färbemethode basiert auf der Fähigkeit der Kongorot-Moleküle, sich längs der Achsen der Amyloidfibrillen anzulagern. In Verbindung mit dem Polarisationsmikroskop ist diese Methodik

hochspezifisch und lässt das Amyloid in einer rötlich bis grünlichen anomalen Polarisationsfarbe erscheinen (Howie und Brewer 2009). Allerdings ist die Sensitivität, besonders bei geringer Amyloidablagerung, eingeschränkt. Durch Erhöhung der Schnittdicke von 2-5  $\mu\text{m}$  auf ca. 5-10  $\mu\text{m}$  lässt sich diese steigern. Auch kann man zuerst die sensitivere Kongorot-Immunfloreszenz verwenden, um dann die dabei orange-fluoreszierenden Herde noch im polarisiertem Licht auf ihre anomale Polarisationsfarbe hin zu untersuchen (Linke 2000).

Da die Kongorot-Färbung bei histologischen Gewebebeurteilungen nicht routinemäßig durchgeführt wird, bleibt aber eine Vielzahl von Amyloidosen, sofern kein Verdacht besteht, auch weiterhin unentdeckt (Dember 2006). Um den Standard der Amyloiddiagnostik weiter zu heben, werden momentan neue Methoden zur Diagnostik entwickelt und erprobt.

#### 1.4.3 Elektronenmikroskopie

Seit den 50er Jahren wird die Elektronenmikroskopie zur Untersuchung von Amyloidablagerungen eingesetzt (Cohen und Calkins 1959). Die dabei dargestellten Fibrillen (siehe auch 1.1.5.3) lassen sich durch eine positive Kongorot-Färbung dem Amyloid zuordnen.

Im Gegensatz zu anderen Geweben beinhaltet die histologische Untersuchung von Nierengewebe standardmäßig eine elektronenmikroskopische Beurteilung. Die im Falle einer Amyloidose vorliegenden Fibrillen sollten so immer, ob der Verdacht auf eine Amyloidose bereits geäußert wurde oder nicht, eine abklärende Kongorot-Färbung nach sich ziehen. Dadurch ist der Anteil unentdeckter renaler Amyloidosen im Vergleich mit anderen Organmanifestationen geringer (Dember 2006).

Die Kryo-Elektronenmikroskopie wird heute eingesetzt, um die Struktur der Amyloidfibrillen genauer zu erforschen (Sachse, Grigorieff et al. 2009).

#### 1.4.4 Morphologische Differentialdiagnostik

Krankheiten wie die Immunglobulin-Leicht- und Schwerkettenablagerungskrankheit, Hyalinosen und Sklerosen lassen sich mit Hilfe der Kongorot-Färbung in Verbindung mit der Polarisationsmikroskopie vom Amyloid abgrenzen. Auf einige weitere Differenzialdiagnosen renaler Amyloidosen soll hier noch im Speziellen eingegangen werden.

So stellt die Differenzierung der fibrillären Glomerulonephritis zur renalen Amyloidose eine gewisse Herausforderung dar. Diese fibrilläre Erkrankung liefert sowohl licht- und elektronenmikroskopisch als auch immunhistologisch dem Amyloid sehr ähnliche Ergebnisse. Doch auch hier unterscheidet die Kongorot-Färbung die beiden Krankheiten von einander. Die Leichtketten-Nephropathien und die immunotaktilen Glomerulonephritiden sind elektronenmikroskopisch durch das Fehlen von Fibrillen leichter vom Amyloid zu trennen.

#### 1.5 Klassifikation

Die Diagnose Amyloid allein reicht heute nicht mehr aus. Mit dem stetigen Wissenswachstum über die verschiedenen Amyloidformen und der Entwicklung spezieller Behandlungsmöglichkeiten für die jeweiligen Amyloidosen, ist die richtige Typisierung des gefundenen Amyloids essentiell. Dazu sind neben einer sorgfältigen klinischen Beurteilung der Symptome vor allem die immunhistologische und gegebenenfalls weiterführend die genetische Diagnostik oder auch proteinbiochemische Verfahren unabdingbar.

##### 1.5.1 Immunhistologie

Die einfachste und kostengünstigste Methode zur Klassifizierung von Amyloid stellt die Immunhistochemie dar. Die Verlässlichkeit dieses Verfahrens wurde bereits in diversen Studien aufgezeigt (Kebbel und Röcken 2006; Linke, Oos et al. 2006; Gioeva, Kieninger et al. 2009; Kieninger, Eriksson et al. 2010). Sie hängt auch vom Einsatz eines umfassenden und zuverlässigen Antikörper-Panels ab. Zur Typisierung systemischer Amyloidosen sollten laut Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Amyloid-Krankheiten e.V. mindestens Antikörper gegen AA-, AApoA1-, AFib-, AL-, ALys- und ATTR-Amyloid verwendet werden. Jeder Antikörper sollte zudem noch neben dem Untersuchungsmaterial an einer Kontrolle überprüft werden (Linke, Oos et al. 2006).

Eine Vielzahl der hier genannten Antikörper ist heute kommerziell erhältlich. Die Qualität der Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte kann durch den direkten Vergleich mit einem Kongorot-gefärbten Serienschnitt gesteigert werden.

#### 1.5.2 Proteinbiochemische Verfahren/Aminosäuresequenzanalyse

Liegen nur geringe Mengen des zu untersuchenden Gewebes vor oder aber führt die Immunhistologie zu keinem Ergebnis, kann das zu identifizierende Amyloidprotein durch Aminosäuresequenzanalyse eindeutig bestimmt werden (Kaplan, Hrcic et al. 1999; Kaplan, Martin et al. 2004). Dieses aufwendige Verfahren eignet sich aber noch nicht zum Einsatz als Routinediagnostik.

#### 1.5.3 Molekularbiologische Verfahren

Die immunhistologische oder proteinbiochemische Typisierung des Amyloids bestätigt noch nicht das Vorliegen einer hereditären Amyloidose. Für die Identifikation einer solchen Form muss die genomische Mutation des im Vorfeld typisierten Amyloidvorläuferproteins durch molekularbiologische Untersuchungen nachgewiesen werden. Die zu untersuchende genomische DNA kann entweder aus Vollblut oder aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe isoliert werden.

## 1.6 Zielsetzung

Amyloidosen bilden eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die alle durch eine pathologische Ablagerung autologer Proteine bedingt sind. Abhängig von der Organverteilung und Befallsschwere kann Amyloid ein progressives und lebensbedrohliches Organversagen bedingen (Merlini und Bellotti 2003). Auf Grund des häufigen renalen Befalls systemischer Amyloidosen, kommt es im Zuge der Erkrankung häufig zu Nierenversagen und/oder Proteinurie (Bergesio, Ciciani et al. 2007; Rysava 2007; Bergesio, Ciciani et al. 2008; Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008). So leiden bereits mehr als ein Viertel der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose an einem nephrotischen Syndrom (Nishi, Alchi et al. 2008). Trotz des häufigen renalen Befalls liegen heute noch keine genauen Angaben über die Häufigkeit der verschiedenen Amyloidosen in der Niere vor. Ziel dieser Arbeit war es, genauere Kenntnisse über nierentypische und -spezifische Verteilungsmuster renaler Amyloidosen zu erlangen, um ihre Diagnose und Klassifikation zu erleichtern.

In dieser Arbeit sollte weiterhin die Prävalenz hereditäre Amyloidosen überprüft werden. Mehrere Studien wiesen in letzter Zeit darauf hin, dass die Prävalenz hereditärer Amyloidosen deutlich über dem bis vor kurzem vermuteten geringen Anteil liegt. Stetige Neudiagnosen bereits bekannter hereditärer Amyloidosen und die Entdeckung immer neuer hereditärer Formen führten zu der wachsenden Zahl hereditärer Amyloidosen. Lachmann et al. vermuten, dass es sich bei 10% der als AL-Amyloidose klassifizierten Fälle eigentlich um hereditäre Formen handelt (Lachmann, Booth et al. 2002). Mit Hilfe dieser Arbeit sollte die Prävalenz hereditärer Amyloidosen in konsekutiven Nierenbiopsiekollektiven ermittelt werden. Ein besonderes Augenmerk war dabei auf fehl-diagnostizierte hereditäre renale Amyloidosen im untersuchten Kollektiv gerichtet. Um die Diagnose hereditärer Amyloidosen in Zukunft zu erleichtern, sollten charakteristische Eigenheiten der verschiedenen hereditären Amyloidosen, wie zum Beispiel typspezifische Verteilungsmuster innerhalb der Niere, herausgearbeitet werden.

Die hier durchgeführte Studie umfasste einen zeitlichen Rahmen von 1990-2007. In dieser Zeit gab es bezüglich der Therapiemöglichkeiten der Grunderkrankungen der AL- und AA-Amyloidose eine Reihe von Verbesserungen und Weiterentwicklungen.

In dieser Arbeit sollten dadurch bedingte Veränderungen in der Inzidenz der renalen AL- und AA-Amyloidose innerhalb der letzten 18 Jahre herausgearbeitet werden.

Innerhalb dieser Zeitspanne kam es neben den gerade beschriebenen Veränderungen der Amyloid-bedingenden Erkrankungen noch zu weiteren Entwicklungen, wie beispielsweise die gestiegene Lebenserwartung. Auf Grund dieser Umstellungen sollte die Analyse der demografischen und klinischen Patientendaten des Kollektivs dazu dienen, das Patientenprofil der jeweiligen Amyloidoseformen zu aktualisieren und somit die tägliche Diagnostik und Klassifikation zu vereinfachen.

Die korrekte Klassifikation der Amyloidosen bildet die Grundlage einer erfolgreichen Therapie. Die immunhistochemische Färbung von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben stellt die gängige Methode in der klinischen Pathologie (Linke, Oos et al. 2006) dar. Die stetig wachsende Zahl identifizierter Amyloidproteine und somit die Erweiterung der zur immunhistochemischen Klassifizierung verwendeten Antikörper ließ eine Neubewertung dieser Methodik erforderlich erscheinen. Somit definierte die Beurteilung der Immunhistochemie zur Klassifizierung von Amyloid ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Kollektiv

Aus den Instituten für Pathologie dreier Einrichtungen (s.u.) wurden retrospektiv alle Fälle herausgesucht, die folgende Kriterien erfüllten: Nierenbiopsie und die Diagnose einer renalen Amyloidose. Das zusammengetragene Kollektiv umfasste schließlich eine Serie von insgesamt 233 Nierenbiopsien von 231 Patienten aus den Jahren 1990-2007. In allen Proben lag eine histologisch gesicherte renale Amyloidose vor. 57 (24,4%) Biopsate stammten aus dem Institut für Pathologie der *Charité*, Berlin, 22 (9,4%) Biopsien wurden vom Institut für Pathologie des *Ernst von Bergmann Klinikum*, Potsdam, bereit gestellt. 154 (66,1%) Biopsien stammten aus dem *Universitätsspital*, Basel, Schweiz. Alle drei Institute erhielten die zu untersuchenden Gewebeproben von klinisch tätigen Ärzten und von niedergelassenen Pathologen. Alle Biopsate enthielten Nierenrinden- und Nierenmarkanteile.

### 2.2 Histologie

Alle Organproben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Die jeweils daraufhin angefertigten Serienschnitte wurden sowohl routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin als auch mit der Perjodsäure-Schiff-Reagenz Reaktion (PAS) und der Kongorot-Färbung nach Puchtler et al. gefärbt. Die Diagnose "Amyloid" wurde durch die anomale Polarisationsfarbe im polarisierten Licht eines mit Kongorot gefärbten Schnittes bestätigt (Puchtler, Sweat et al. 1962; Linke 2000). Die hierbei vorgefundene Menge der Amyloidablagerungen wurde nach einer visuellen Beurteilung in geringgradig (Grad I), moderat (Grad II) oder ausgeprägt (Grad III) eingestuft.

### 2.3 Immunhistochemie

In den Instituten für Pathologie der *Charité* und des *Ernst von Bergmann Klinikum* wurden zur Ausführung der Immunhistochemie folgende Antikörper verwendet: kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen AA-Amyloid (1:600) und polyklonale Antikörper gegen Amyloid P-Component (1:5000), Fibrinogen (1:2000), Lysozym (1:3000), Transthyretin (1:4000),  $\lambda$ -Leichtketten (1:160.000),  $\kappa$ -Leichtketten (1:160.000; alle DAKO, Hamburg Deutschland) als auch nicht kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper, gerichtet gegen Apolipoprotein A1 (Anti-ApoA1-Antikörper;

Verdünnung 1:1000) (Gregorini, Izzi et al. 2005), gegen von  $\lambda$ -Leichtketten-abgeleiteten Amyloidproteine (Anti-AL1-Antikörper; Verdünnung 1:3000; Bohne, Sletten et al. 2004) und Anti- $\lambda$ -Leichtketten-Peptid Antikörper (AL3, Verdünnung 1:250; AL7, Verdünnung 1:500). Die Immunfärbung wurde mit Hilfe des BenchMark<sup>®</sup> XT Immunfärbers unter Verwendung des ultraView<sup>™</sup> Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kits (beide von Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, U.S.A.) durchgeführt. Vor der Inkubation mit den Antikörpern gegen Anti-Amyloid P Component, - $\lambda$ - und - $\kappa$ -Leichtkette, -Transthyretin und -AL7 wurden die zu behandelnden Schnitte mit Cell Conditioning 1 nach Herstellerangaben vorbehandelt (CC1; Ventana). Ebenso mussten vor der Anti-Apo A1-Antikörper Inkubation die Gewebeschnitte für 32 Minuten bei 95°C in Zitratpuffer eingelegt werden. Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch die Verwendung von Gewebeproben mit bereits bekannten Amyloidklassen (AA-, ATTR-, AL $\lambda$ -Amyloid) und durch den vom Hersteller empfohlenen Gebrauch von Positivkontrollen (verbliebene Antikörper) überprüft. Das Weglassen des primären Antikörpers diente als Negativkontrolle.

Im *Universitätsspital Basel* wurden die verwendeten Antikörper gegen AA-Amyloid,  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Leichtkette und Transthyretin freundlicherweise von Prof. Dr. R. Linke gestellt.

Antikörper	Mono-/Polyklonal	Vorbehandlung	Verdünnung	Hersteller/ zur Antikörperherstellung verwendete Peptide
<b>P-Component</b>	P	Zell Konditionierung 1 (Ventana)	1:5000	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b>AA</b>	M		1:600	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b>Apo A1</b>	P	Citrat-Buffer	1:1000	NH <sub>2</sub> -DEPPQSPWDRVKDLAC-CONH <sub>2</sub> und NH <sub>2</sub> -CVLKDSGRDYVSQFEG-CONH <sub>2</sub> <sup>11</sup>
<b>Fibrinogen</b>	P		1:2000	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b><math>\lambda</math>-Leichtkette</b>	P	Zell Konditionierung 1 (Ventana)	1:160000	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b>AL 1 (<math>\lambda</math>)</b>	P		1:3000	Native AL <sub>VIM</sub> Amyloid Proteine <sup>3</sup>
<b>AL 3 (<math>\lambda</math>)</b>	P		1:250	NH <sub>2</sub> -ISCSGSSSNIGSNTV CONH <sub>2</sub> und NH <sub>2</sub> -QRPSGVPDRFSGSKSGTS-CONH <sub>2</sub> <sup>17</sup>
<b>AL 7 (<math>\lambda</math>)</b>	P	Zell Konditionierung 1 (Ventana)	1:500	NH <sub>2</sub> – CLFPPSSEELQANKATLV – CONH <sub>2</sub>
<b>Lysozym</b>	P		1:3000	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b><math>\kappa</math>-Leichtkette</b>	P	Zell Konditionierung 1 (Ventana)	1:160000	DAKO, Hamburg, Deutschland
<b>Transthyretin</b>	P	Zell Konditionierung 1 (Ventana)	1:4000	DAKO, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 3: Für die Reklassifikation der Amyloidablagerungen verwendete Antikörper**

## 2.4 DNA Sequenzanalyse

Für den Nachweis einer Keimbahnmutation im *APOA1*-Gen wurde genomische DNA aus im Vollblut lokalisierten Leukozyten gewonnen. Mit Hilfe des QIAamp-DNA-blood-mini-kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte die DNA-Extraktion nach Herstellerprotokoll. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die Amplifikation des *APOA1* Exon 1-4 unter Verwendung der folgenden spezifischen Primerpaare durchgeführt: Exon 1-2 (489 bp) vorwärts 5'-aagttccacattgccaggac-3' und rückwärts 5'-agaggcagcaggtttctcac-3'; Exon 3 (376 bp) vorwärts 5'-agaggcagcaggtttctcac-3' und rückwärts 5'-aatatctgatgagctgggcc-3'; Exon 4a (493 bp) vorwärts 5'-aagagaagctgagcccact-3' und rückwärts 5'-ccctacagcgacgagctg-3'; Exon 4b (400 bp) vorwärts 5'-ctggaaatgctaggccac-3' und rückwärts 5'-cagcttcttctttgggagaa-3'. Die bei der PCR verwendeten Reaktionslösungen beinhalteten 200 ng DNA, 1 µM des Exon-spezifischen Primers, 1x PCR Puffer, 1,5 U Taq-Polymerase, 0,2 µM dNTPs, und Q-Lösungen jeweils in Konzentrationen nach Herstellervorschlag (Qiagen). Folgende Thermozykler-Einstellungen wurden verwendet: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min, 40 Zyklen bei 94°C für 1 min, 60°C (61°C für das Exon 4a Primer-Paar) für 1,5 min, 72°C für 1 min, finale Elongation bei 72°C für 7 min. Eine Negativ-Kontrolle, mit Reinwasser anstelle von DNA, war bei jedem PCR-Lauf einbezogen. Ebenso lief eine Positiv-Kontrolle mit. Hierzu diente Blut eines Individuums mit Wildtyp *APOA1*. Qualität und Größe der PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem ExoSAP-IT® Clean-up Kit für PCR-Produkte (USB Corp., Cleveland, OH, USA). Nach diesem Schritt erfolgten in beide Richtungen ablaufende Sequenzierreaktionen der PCR-Produkte unter Verwendung des ABI PRISM® BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), wobei das bereits oben beschriebene Primer-Set verwendet wurde. Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer.

## 2.5 Auswertung

Das gesamte Kollektiv wurde mehrfach mikroskopiert. Bei lückenhafter Immunhistochemie wurde versucht, das zu Verfügung stehende Antikörperpanel zu komplettieren. In 44 Fällen konnte so eine vollständige Antikörperpalette eingesetzt werden, in 9 Fällen waren bereits alle Färbungen vorhanden und in 180 Fällen konnten auf Grund von zu geringer oder nicht vorhandener Biopsiemenge nicht alle

Immunreaktionen durchgeführt werden. Das Amyloidprotein wurde immunhistochemisch klassifiziert, wenn eine starke, homogene Anfärbung der gesamten Amyloidablagerungen vorlag. Ungleichmäßig, und vor allem unvollständig angefärbtes Amyloid wurde hingegen nicht als Nachweis eines Amyloidproteins angesehen. Eine starke, gleichmäßige Färbung des gesamten Amyloiddepots mit mehreren Antikörpern verschiedener Amyloid-Vorläuferproteine wurde als nicht klassifizierbar gewertet. Nach Beurteilung der Histologie und der Immunhistochemie wurden die klinischen Angaben zu den Fällen dokumentiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Korrelation der Histologie und Immunhistochemie mit den klinischen Daten

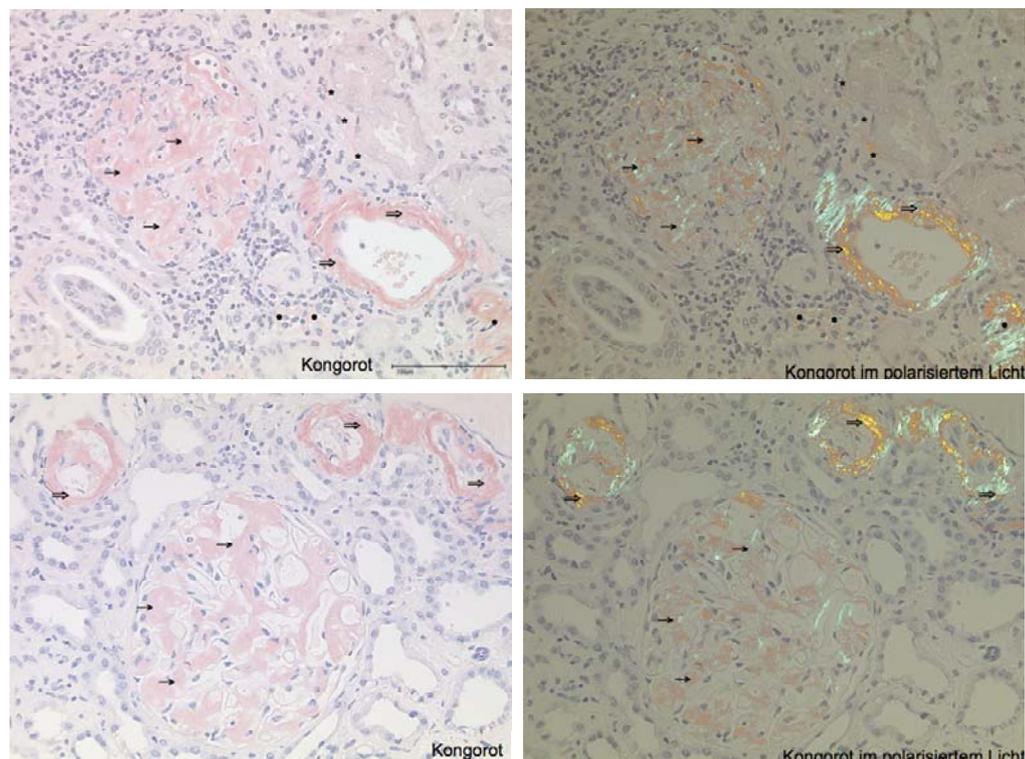
136 Männer und 95 Frauen bildeten das Kollektiv (M:F=1,4:1,0). Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 58,8 Jahren (Altersspanne 6-98 Jahre). Die immunhistochemische Klassifizierung des Amyloids erfolgte in insgesamt 225 (96,6%) Fällen. 8 (3,4%) amyloidhaltige Biopsien konnten nicht klassifiziert werden. Diese werden im Folgenden als *Amyloid, nicht klassifizierbar* betitelt. Eine AL-Amyloidose wurde in 124 (53,2%) von insgesamt 233 Biopsien diagnostiziert. Diese Form der Amyloidose ist somit die häufigste in diesem Kollektiv. Als zweithäufigste Amyloidose fand sich die AA-Amyloidose, die in 94 (40,3%) Biopsien nachgewiesen wurde. Renale Amyloidosen von vermeintlich hereditärem Ursprung wurden bei sieben (3,0%) Patienten diagnostiziert. Diese setzten sich aus vier (1,7%) Fällen mit AFib-Amyloidose, zwei (0,9%) Fällen mit ATTR-Amyloidose und einem (0,4%) Fall mit AApoA1-Amyloidose zusammen. Bei drei Patienten färbten sich die Amyloidablagerungen mit zwei unterschiedlichen Antikörpern regelmäßig und stark an, weshalb bei diesen Fällen eine Misch-Amyloidose vermutet wurde: AA+ATTR (ein Patient), AL $\lambda$ +ATTR (ein Patient) und AL $\kappa$ +ATTR (ein Patient).

	n (%)	Alter n (%)										Geschlecht n (%)		
		0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	Unbekannt	w	m
AL $\lambda$	106 (45,5)				2 (0,9)	9 (3,9)	27 (11,6)	35 (15,0)	28 (12,0)	3 (1,3)	2 (0,9)		48 (20,6)	58 (24,9)
AL $\kappa$	10 (4,3)					1 (0,4)	1 (0,4)	3 (1,3)	4 (1,7)	1 (0,4)			4 (1,7)	6 (2,6)
AL n.o.s.	8 (3,4)						4 (1,7)	4 (1,7)					1 (0,4)	7 (3,0)
AA	94 (40,3)	1 (0,4)	6 (2,6)	7 (3,0)	7 (3,0)	12 (5,2)	15 (6,4)	24 (10,3)	14 (6,0)	5 (2,2)	1 (0,4)	2 (0,9)	36 (15,5)	58 (24,9)
ATTR	2 (0,9)						1 (0,4)	1 (0,4)					1 (0,4)	1 (0,4)
AFib	4 (1,7)					1 (0,4)	1 (0,4)	2 (0,9)					1 (0,4)	3 (1,3)
AApoAI	1 (0,4)						1 (0,4)						1 (0,4)	
Amyloid, nicht klassifi- zierbar	8 (3,4)			1 (0,4)	1 (0,4)	2 (0,9)	2 (0,9)	1 (0,4)	1 (0,4)				4 (1,7)	4 (1,7)
<b>Gesamt</b>	<b>233</b> <b>(100)</b>	<b>1</b> <b>(0,4)</b>	<b>5</b> <b>(2,2)</b>	<b>7</b> <b>(3,0)</b>	<b>10</b> <b>(4,3)</b>	<b>25</b> <b>(10,7)</b>	<b>52</b> <b>(22,3)</b>	<b>70</b> <b>(30)</b>	<b>47</b> <b>(20,2)</b>	<b>12</b> <b>(5,2)</b>		<b>2</b> <b>(0,9)</b>	<b>96</b> <b>(41,2)</b>	<b>137</b> <b>(58,8)</b>

**Tabelle 4: Korrelation des Amyloidproteins mit Alter und Geschlecht der Patienten**

### 3.1.1 AL-Amyloidose

Die 124 Fälle von 123 Patienten mit AL-Amyloidose konnten im Rahmen der immunhistochemischen Färbung weiter in AL-Amyloid vom  $\lambda$ - [106 (85,5%) Biopsien] und  $\kappa$ -Leichtketten Subtyp [10 (8,1%) Biopsien] unterteilt werden (Tabelle 4). Somit ergab sich ein  $\lambda$ -: $\kappa$ -Leichtketten-Verhältnis von 10,6:1,0. In 8 (6,5%) Fällen zeigten weder die  $\lambda$ - noch die  $\kappa$ -Leichtketten Antikörper eine eindeutige Prädominanz bei der Anfärbung der Amyloidablagerungen. Außerdem konnte keine eindeutige positive Immunreaktion mit den übrigen, gegen systemische Amyloidosen gerichteten Antikörpern gefunden werden. Da bei diesen Fällen aber klinische Informationen, wie etwa eine Bence-Jones-Proteinurie, sowie weitere histopathologische Befunde, wie z.B. der histologische Nachweis eines Plasmozytoms in einer Beckenkammbiopsie, die Diagnose einer AL-Amyloidose festigten, wurden diese 8 als „Verdacht auf AL-Amyloid, nicht spezifizierbar (n.o.s.)“ klassifiziert (Tabelle 4).



**Abbildung 1: Amyloidablagerung in den verschiedenen Strukturen der Niere**

*Exemplarische Darstellung der Ablagerungsarten des Amyloids in den Nierenbiopsaten → glomeruläre Amyloidablagerung; ⇒ vaskuläre Amyloidablagerung; • interstitielle Amyloidablagerung; \* peritubuläre Amyloidablagerung; Kongorotfärbung ohne (links) und mit Polarisation; Originalvergrößerung x 200,*

### 3.1.1.1 AL $\lambda$ -Amyloidose

Die Gruppe der AL $\lambda$ -Amyloidosen setzte sich aus 57 (54,2%) Männern und 48 (45,7%) Frauen zusammen (M:F = 1,21). Mit einer Gesamtzahl von 105 Patienten ist diese Untergruppe der AL-Amyloidose die häufigste Form überhaupt in diesem Kollektiv (Tabelle 4). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die Patienten im Durchschnitt 63,1 Jahre alt (Altersspanne: 34-98 Jahre). 85,5% aller Patienten befanden sich zwischen dem 50. und dem 79. Lebensjahr.

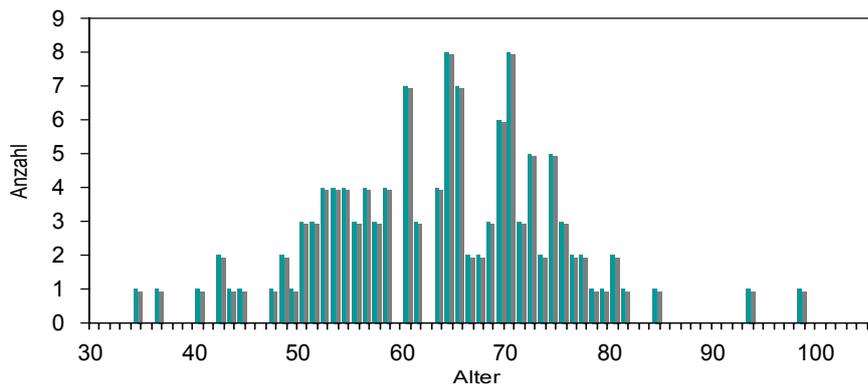


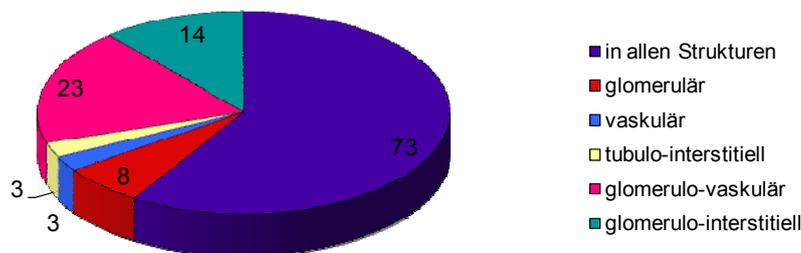
Abbildung 2: Altersverteilung der AL-Amyloidose

Die histologische Beurteilung der Amyloidablagerungen dieser Untergruppe ergab Folgendes: In 32 (30,2%) Biopsien fanden sich geringe Mengen von Amyloid. Des Weiteren wurden in 29 (27,4%) Biopsien mittelgradige und in 45 (39%) Biopsien ausgeprägte Amyloidablagerungen festgestellt.



Abbildung 3: Schweregrad des Amyloidbefalls

Bezogen auf die Lokalisation des Amyloids fand sich in neun (8,5%) Fällen ein rein glomerulärer Ablagerungstyp. Glomerulo-vaskuläre Depots wurden in 21 (19,8%) Fällen beobachtet. Am Häufigsten, in 65 (61,3%) Fällen, befand sich das Amyloid jedoch in allen drei renalen Kompartimenten, in Glomerula, in Gefäßen und im tubulo-interstitiellen Raum. Bezüglich dieser letzten Gruppe ist hinzuzufügen, dass die glomerulären Ablagerungen am stärksten ausgeprägt waren und dass der tubulo-interstitielle Raum nur geringgradig betroffen war. Es lagen von einem Patienten zwei innerhalb eines Jahres entnommene Biopsien vor. Dabei konnte histologisch keine Veränderung der Amyloidablagerungen festgestellt werden.



**Abbildung 4: Verteilung des AL-Amyloids**

Klinische Daten der Patienten waren in 37 (34,9%) Fällen vorhanden, die Auswertung dieser ergab Folgendes: 15 (40,5%) dieser 37 AL $\lambda$ -Amyloidosen waren mit einem Plasmozytom assoziiert. Bei neun (24%) Fällen wurde eine monoklonale Gammopathie diagnostiziert.

Zu Grunde liegende Krankheiten:	AL-Amyloid
<i><u>Nicht-infektiöse Erkrankungen:</u></i>	
Monoklonale Gammopathie	11
Plasmozytom	20
Unbekannt	93
<b>Gesamt</b>	<b>124</b>

**Tabelle 5: Zu Grunde liegende Erkrankungen renaler AL-Amyloidosen**

In 51 (48,1%) von allen 106 AL $\lambda$ -Amyloidosen ist der Schweregrad der symptomatisch aufgetretenen Proteinurie übermittelt worden. Die durchschnittliche Proteinausscheidung pro Tag lag bei 7,2 g  $\pm$  4,5 g. 43 (84,3%) an AL $\lambda$ -Amyloidose leidende Patienten schieden täglich mehr als 3,5 g Proteine im Urin aus, was es zu einer schweren Proteinurie graduiert. Vier (7,8%) Patienten wiesen eine mittelgradige Proteinurie mit Ausscheidungswerten zwischen 1-3,5 g/d auf, und weitere vier (7,8%) eine milde Proteinurie (< 1g/d), (Tabelle 9).

#### 3.1.1.2 AL $\kappa$ -Amyloidose

Bei sechs (60%) Männern und vier (40%) Frauen lag eine AL $\kappa$ -Amyloidose vor. Das Durchschnittsalter dieser 10 Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnose 64,8 Jahre. Die Altersspanne reichte von 40 bis 80 Jahren (Tabelle 4, Abbildung 2).

Die Beurteilung der Amyloidablagerungen in den 10 Biopsien ergab, dass jeweils zwei (20%) Patienten einen milden und einen mittelschweren Befall von Amyloid in der Niere aufwiesen. Bei den übrigen sechs (60%) Fällen wurden hingegen hochgradige Amyloidablagerungen gefunden (Abbildung 3).

Auch in dieser Gruppe konnten verschiedene Verteilungsmuster der Amyloidablagerungen beobachtet werden. Fünf (50%) Fälle wiesen glomeruläre und tubulo-interstitielle Amyloidablagerungen auf. Bei vier (40%) Fällen fand sich in allen drei Kompartimenten Amyloid. In einem (10%) Fall war eine rein vaskuläre Lokalisation zu beobachten (Abbildung 4).

Die Auswertung der klinischen Daten von sieben (70%) Patienten aus dieser Gruppe ergab, dass fünf (71,4%) Patienten im Vorfeld an einem Plasmozytom erkrankt waren (Tabelle 5).

Bei drei Patienten wurde eine Mengenangabe zur Proteinurie übermittelt. Der Durchschnittswert lag bei 12,3 g/d  $\pm$  4,7 g/d. In allen drei Fällen handelte es sich um eine schwerwiegende Proteinurie (> 3,5 g/d) (Tabelle 9).

### 3.1.1.3 AL-Amyloid n.o.s.

In acht (6,5%) Fällen konnte die AL-Amyloidose auf Grund von uneindeutiger Antikörperreaktion nicht weiter subklassifiziert werden. Hier setzte sich die Gruppe aus sieben (87,5%) Männern und einer (12,5%) Frau zusammen (M:F=7:1). Durchschnittlich waren die Patienten 59 Jahre alt (Altersspanne: 54 bis 65 Jahre), als die renale Amyloidose erstmals diagnostiziert wurde (Tabelle 4, Abbildung 2).

Jeweils drei Biopsien (37,5%) waren hochgradig bzw. gering von Amyloid betroffen, zwei (25%) Biopsien wiesen eine mittelgradige Amyloidablagerung auf (Abbildung 3).

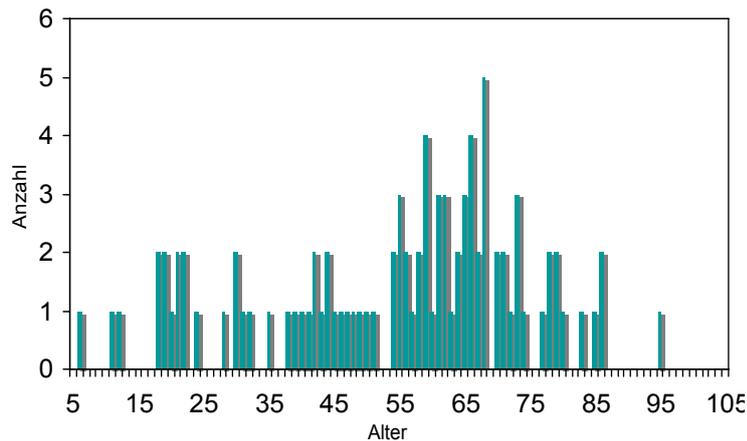
Das Amyloid fand sich in fünf (62,5%) Biopsien in allen Kompartimenten der Niere, d.h. glomerulär, vaskulär und tubulo-interstitiell. Ein rein glomerulo-vaskuläres Verteilungsmuster fand sich in zwei (25%) Biopsien. In einer (12,5%) Biopsie ließ sich Amyloid nur im tubulo-interstitiellen Raum nachweisen (Abbildung 4).

An klinischen Informationen lag bei dieser Gruppe folgendes vor: Vermerkt waren eine Bence-Jones Proteinurie, eine monoklonale Gammopathie und eine monoklonale Gammopathie von unklarer Signifikanz (Tabelle 5).

Ein Patient litt an einer schweren Form der Proteinurie (6 g/d), ein anderer an einer leichten Form (0,5 g/d) (Tabelle 9).

### 3.1.2 AA-Amyloidose

94 (40,3%) Nierenbiopsien enthielten AA-Amyloid. Davon waren 58 (62,3%) Männer und 35 (37,6%) Frauen, was ein Geschlechterverhältnis von 1,6:1 (M:F) ausmacht. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose reichte von 6 bis 86 Jahre (Durchschnittsalter 54,1 Jahre). Dies ergab eine zweigipfelige Altersverteilung mit einem frühen [21 Patienten <40 Jahre (22,3%)] und einem späten Alterspeak [24 Patienten befanden sich in ihrer siebten Lebensdekade (25,5%)](Tabelle 4).



**Abbildung 5: Altersverteilung der AA-Amyloidose**

Die histologische Beurteilung der Biopsien lieferte folgende Ergebnisse: In unserem Kollektiv befanden sich 13 (13,8%) Fälle mit milden AA-Amyloid Ablagerungen, 22 (23,4%) Fälle wiesen einen mittelgradigen und 59 (62,8%) Fälle einen massiven Amyloidbefall auf (Abbildung 3).

Ein Großteil der von AA-Amyloid betroffenen Biopsien [85 (90,4%) von 94 Fällen] wies sowohl ein glomeruläres als auch extraglomeruläres Verteilungsmuster auf. Davon waren 27 (31,8%) durch einen glomerulär-vaskulären Befall gekennzeichnet. Der rein glomeruläre Ablagerungstyp lag in drei (3,2%) Fällen vor, der rein extraglomeruläre hingegen in sechs (6,4%). In dieser Gruppe lagen ebenfalls zu einem Patienten zwei innerhalb eines Jahres entnommene Nierenbiopsien vor. Beim Vergleich der beiden Biopsien konnte kein Unterschied im Ausmaß der Amyloidablagerung gefunden werden.



**Abbildung 6: Verteilung des AA-Amyloids**

Klinische Informationen lagen in 61 (64,9%) Fällen vor. Daraus ergab sich, dass chronische, nicht-infektiöse, inflammatorische Erkrankungen, wie etwa rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew und familiäres Mittelmeerfieber, in 45 (73,8%) von 61 Fällen der AA-Amyloidose zugrunde lagen. Chronische oder rezidivierende infektiöse Erkrankungen bedingten die Entwicklung einer AA-Amyloidose hingegen nur in 15 (24,6%) Fällen.

Zu Grunde liegende Krankheiten:	AA-Amyloid
<i><u>Nicht-infektiös:</u></i>	
<i>Rheumatoide Erkrankungen:</i>	
Rheumatoide Arthritis	18
Spondylitis ankylosans	6
Arthritis psoriatica	3
<i>Weitere chronische Erkrankungen:</i>	
Familiäres Mittelmeerfieber	7
Morbus Crohn	2
Colitis ulzerosa	2
Strahlencolitis	1
Mukoviszidose	2
Urticaria	1
Systemischer Lupus Erythematosus	2
Autoimmunerkrankung unbekanntes Ursprungs	1
<i><u>Infektiös:</u></i>	
Chronische <i>H. pylori</i> -Gastritis	2
Gastrointestinale Infektionen	2
Colitis	2
Duodenitis	1
Diverticulitis	1
Lambliasis	2
Durch zystische Fibrose bedingte chronische Entzündungen	2
Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen mit Bronchiektasien	1
Tuberkulose	2
Unbekannt	36
<b>Gesamt</b>	<b>94</b>

**Tabelle 6: Zu Grunde liegende Erkrankungen renaler AA-Amyloidosen**

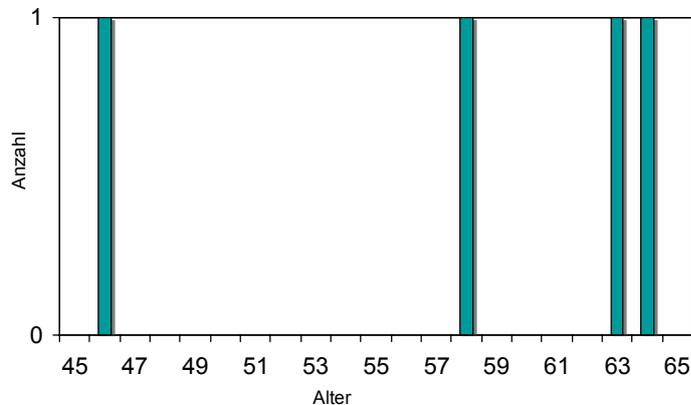
Bei insgesamt 44 Fällen gab es Angaben bezüglich des Schweregrads einer Proteinurie. Patienten mit renaler AA-Amyloidose schieden durchschnittlich  $7,2 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$  Proteine pro Tag über den Urin aus. Von den insgesamt 44 Fällen waren 29 (65,9%) als schwere Proteinurien ( $> 3,5 \text{ g/d}$ ), 11 (25%) als mittelgradige ( $1\text{-}3,5 \text{ g/d}$ ) und 4 (9,1%) als milde Formen ( $<1 \text{ g/d}$ ) einzustufen (Tabelle 9).

### 3.1.3 Hereditäre Amyloidosen

Innerhalb dieses 233 Biopsien umfassenden Kollektivs wurden sieben (3,0%) hereditäre Amyloidosen diagnostiziert: vier (1,7%) AFib-Amyloidosen, zwei (0,9%) ATTR Amyloidosen und eine (0,4%) AApoA1-Amyloidose (Tabelle 4).

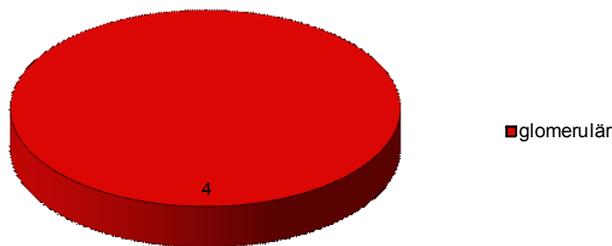
#### 3.1.3.1 AFib-Amyloidose

Eine AFib-Amyloidose konnte in vier (1,7%) Fällen nachgewiesen werden. Hier herrschte eine ausgeglichene Geschlechterverteilung. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 57,8 Jahren (Altersspanne 46 bis 64 Jahren) (Tabelle 4).



**Abbildung 7: Altersverteilung der AFib-Amyloidose**

Alle vier Fälle zeichneten sich durch ein auffälliges histologisches Erscheinungsbild aus. Ein starker und ausschließlich glomerulärer Befall war charakteristisch. Schon in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung waren die wolkenförmig anmutenden Glomerula ein Hinweis auf eine AFib-Amyloidose (Abbildung 3).



**Abbildung 8: Verteilung des AFib-Amyloids**

Klinische Informationen waren bei einem Patienten vorhanden. Dieser litt an einer schweren Proteinurie (Tabelle 9).

Eine molekulargenetische Analyse konnte bei drei dieser vier Patienten durchgeführt werden. Bei allen wurde eine p.Glu526Val Mutation im FGA Exon 5 nachgewiesen (Eriksson, Schönland et al. 2008).

#### 3.1.3.2 AApoA1-Amyloidose

Eine AApoA1-Amyloidose wurde bei einer 59-jährigen Patientin immunhistochemisch diagnostiziert (Tabelle 4).

Histologisch waren milde Amyloidablagerungen in Glomerula, in Gefäßen und im tubulo-interstitiellen Raum zu sehen (Abbildung 3).

Nach Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen konnte hier erstmals folgende Mutation im *APOA1*-Gen nachgewiesen werden: p.Ala154GlyfsX48.

### 3.1.3.3 ATTR-Amyloidose

Diese Form der Amyloidose wurde in zwei Fällen diagnostiziert (M:F=1:1). Zum Zeitpunkt der Diagnose war der Mann 65 und die Frau 54 Jahre alt (Tabelle 4).

In je einer Biopsie fanden sich geringe bzw. mittelgradige Amyloidablagerungen (Abbildung 3).

Ein Fall konnte noch weiter molekulargenetisch untersucht werden. Dies ergab eine p.Val30Met Mutation (Eriksson, Büttner et al. 2009).

Informationen zur symptomatischen Proteinurie wurden bei einem Patienten übermittelt. Täglich schied dieser Patient 2,3 g Protein aus (Tabelle 9).

### 3.1.4 Unklassifizierbare Amyloidosen

Acht (3,4%) amyloidhaltige Biopsien konnten auf Grund von irregulären Antikörperfärbungen nicht klassifiziert werden. Das Geschlechterverhältnis war in dieser Gruppe ausgeglichen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 48,8 Jahren, die Altersspanne erstreckt sich von 26 bis 73 Jahren (Tabelle 4).

Die histologische Bewertung dieser acht Biopsien führte zu folgenden Ergebnissen: In fünf (62,5%) Fällen fanden sich nur milde Amyloidablagerungen, in zwei (25%) Biopsien handelte es sich bereits um einen mittelgradigen Befall. Nur eine (12,5%) Biopsie zeigte hochgradige Amyloidablagerungen (Abbildung 3).

Das Amyloid lagerte sich in zwei (25%) Biopsien in allen drei Kompartimenten ab. Ausschließlich glomeruläre und vaskuläre Strukturen waren in drei (37,5%) Biopsien betroffen. Rein glomerulärer Befall fand sich in einer (12,5%) Biopsie. Des Weiteren war eine (12,5%) Biopsie durch ein vaskuläres und tubulo-interstitielles Verteilungsmuster und eine andere (12,5%) Biopsie durch ein glomeruläres und tubulo-interstitielles gekennzeichnet.

Ferner lagen Daten zur Proteinurie bei drei Patienten vor. Alle schieden mehr als 2,5 g Proteine pro Tag aus (2,9 g/d, 5 g/d, 5,8 g/d) (Tabelle 9).

Eine weitere Typisierung dieser Patienten war nicht möglich, da sie entweder bereits verstorben waren oder nicht kontaktiert werden konnten.

### 3.2 Verlauf der Häufigkeit renaler Amyloidosen im Allgemeinen, bzw. der relativen Häufigkeiten von AL- und AA-Amyloidosen

In dem von der Studie umfassten Zeitraum von 1990 bis 2007 gingen insgesamt 13921 Nierenbiopsate bei den Instituten für Pathologie der *Charité*, des *Ernst von Bergmann Klinikums* und des *Universitätsspitals Basel* ein. Renale Amyloidosen konnten in 233 Biopsien von 231 Patienten nachgewiesen werden. Somit ergab sich für das Vorkommen von Amyloid in Nierenbiopsien eine Häufigkeit von 1,7% im untersuchten Material. Die Häufigkeitsverteilung der AL- und AA-Amyloidose, den zwei fallstärksten Amyloidoseformen des Kollektivs, ließ innerhalb der überprüften 18 Jahre keine Schlüsse über eine steigende oder fallende Prävalenz ziehen. So lag die absolute Prävalenz der AL- bzw. AA-Amyloidose jeweils zwischen 36,8%-61,8% bzw. 28%-50%, die relative Prävalenz zwischen 0,6%-1,5% bzw. 0,5%-1%.

	1990-1994 n (%)	1995-1996 n (%)	1997-1998 n (%)	1999-2000 n (%)	2001-2002 n (%)	2003-2004 n (%)	2005-2006 n (%)	2007 n (%)
Anzahl aller Nierenbiopsate	1482 (100)	1000 (100)	1258 (100)	1374 (100)	2060 (100)	2791 (100)	2731 (100)	1225 (100)
Anzahl aller amyloidhaltiger Biopsien	24 (1.6)	19 (1.9)	26 (2.1)	35 (2.5)	28 (1.4)	34 (1.2)	42 (1.5)	25 (2.0)
Anzahl aller Biopsien mit AA Amyloid	9 (37.5)	9 (47.4)	13 (50.0)	12 (34.3)	12 (42.9)	13 (38.2)	18 (42.9)	7 (28.0)
Anzahl aller Biopsien mit AL Amyloid	11 (45.8)	7 (36.8)	13 (50.0)	21 (60.0)	13 (46.4)	21 (61.8)	22 (52.4)	14 (56.0)

Tabelle 7: Prävalenz renaler Amyloidosen

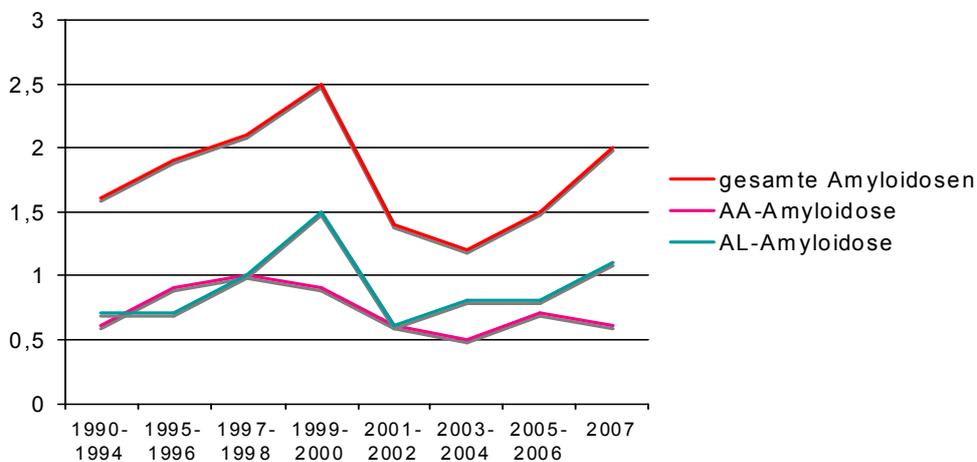
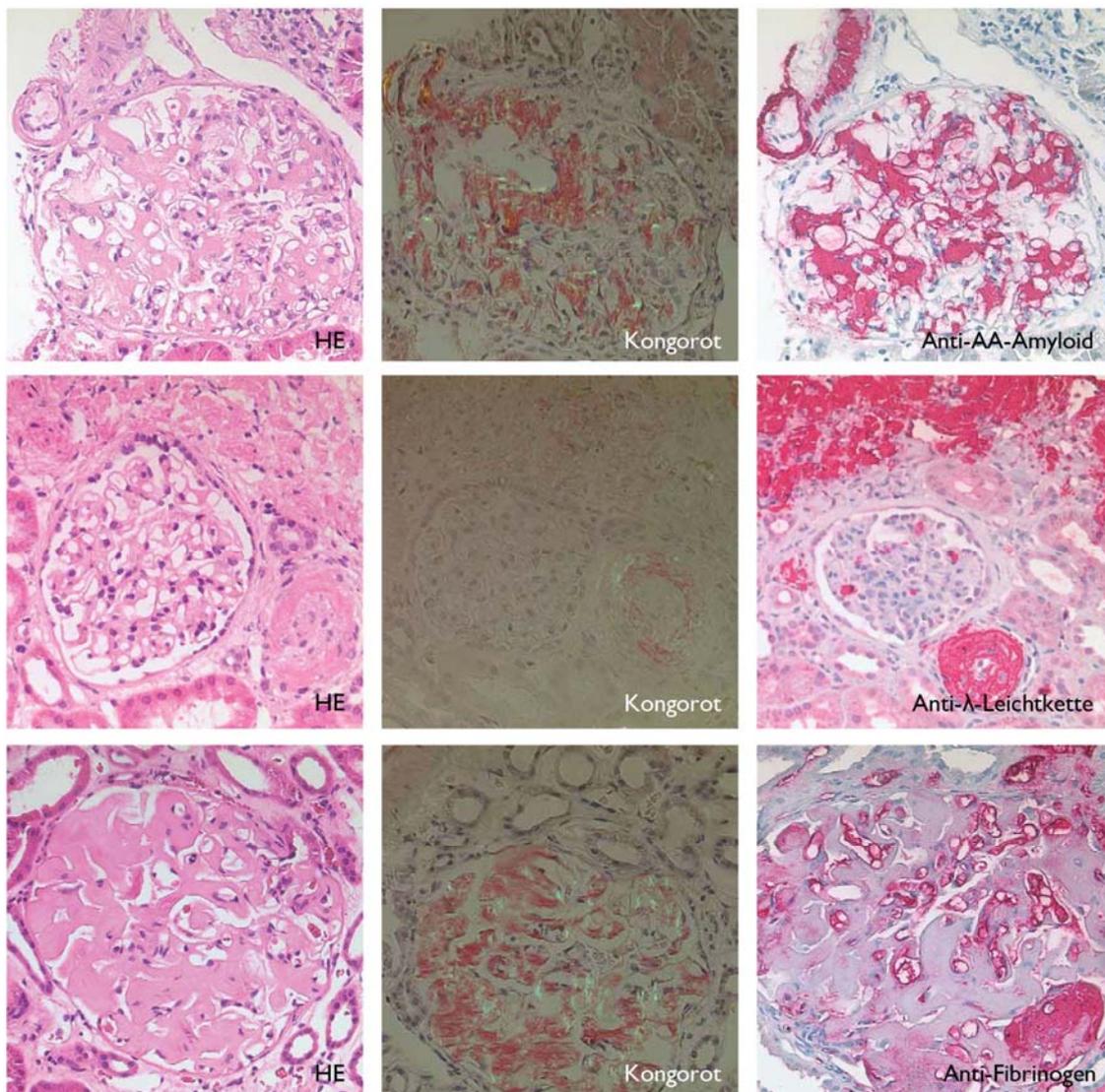


Abbildung 9: Relative Prävalenz renaler AA- und AL-Amyloidosen

### 3.3 Analyse der Immunhistochemie



**Abbildung 10: Immunhistologische Klassifikation des Amyloids dreier Biopsiefälle**

Renale AA- (obere Bildzeile), AL- (mittlere Bildzeile) und AFib- (untere Bildzeile) Amyloidose in Nierenbiopsien. Homogen eosinophiles Material konnte in den Hämatoxylin-Eosin- (HE) gefärbten Serienschnitten in den Glomerula, den Gefäßwänden und dem tubulointerstitiellen Raum gefunden werden. Die jeweiligen Bereiche zeigten in der Kongorot-Färbung die anomale Polarisationsfarbe im polarisierten Licht. Die Amyloidablagerungen reagierten je nach Form immunhistochemisch mit den Antikörpern gegen AA-Amyloid (Anti-AA-Amyloid),  $\lambda$ -Leichtkette (Anti- $\lambda$ -Leichtkette) oder Fibrinogen (Anti-Fibrinogen).

Hämatoxylin Gegenfärbung; Originalvergrößerung x 200; HE: Hämatoxylin-Eosin

(aus von Hutten, H., M. Mihatsch, et al. (2009). "Prevalence and origin of amyloid in kidney biopsies." Am J Surg Pathol 33(8): 1198-205)

### 3.3.1 Abweichung in der Klassifizierung im Vergleich zu bereits bestehenden Diagnosen

Jeder Fall dieses 233 Biopsien umfassenden Kollektivs wurde im Rahmen dieser Arbeit reevaluiert. Teilweise wurden bereits bestehende Färbungen erneut bzw. weitere Antikörper-Färbungen ergänzend durchgeführt. Die dabei erlangte Diagnose stimmte in 219 (94%) Fällen mit der bereits bestehenden überein. Bei fünf (2,1%) Fällen konnte die Diagnose AL-Amyloidose n.o.s. weiter in zwei AL $\lambda$ -Amyloidosen und in drei AL $\kappa$ -Amyloidosen subklassifiziert werden. Bei einem weiteren Fall einer erstmals als AL-n.o.s. klassifizierten Amyloidose musste die Diagnose in AApoA1-Amyloidose revidiert werden. Außerdem wurde in drei (1,3%) Fällen der Verdacht einer Mischamyloidose erhoben. Erstmals diagnostiziert als eine AA-Amyloidose, eine AL $\lambda$ -Amyloidose und eine AL $\kappa$ -Amyloidose wurde bei der Reevaluation jeweils eine Koreaktion des Transthyretin-Antikörpers deutlich. Vier (1,7%) amyloidhaltige Biopsien, die vorausgehend nicht weiter klassifiziert werden konnten, wurden nun Amyloidose Formen zugeteilt: zwei AL $\kappa$ -Amyloidosen und zwei AFib-Amyloidosen. Des Weiteren wurde eine vorangehend betitelte AL-Amyloidose n.o.s. nun als Amyloid, unklassifizierbar eingestuft.

### 3.3.2 Immunreaktionen mit mehreren Antikörpern

Bei insgesamt 129 (55,4%) von 233 Biopsien traten Immunreaktionen mit mehreren Antikörpern, den Amyloid P Component-Antikörper hier ausgenommen, gleichzeitig auf. Es haben sich folgende Reaktionsmuster einteilen lassen:

Die *Gruppe 1* ist durch eine Antikörperreaktion gekennzeichnet, die in dem gesamten Amyloiddepot des Präparates homogen und gleichmäßig auftritt. Dies wurde als Nachweis eines Amyloidproteins gewertet. Zusätzliche Immunreaktionen weiterer Antikörper, meistens handelte es sich hierbei um Anti- $\lambda$ -Leichtkette-, Anti- $\kappa$ -Leichtkette- oder Anti-TTR-Antikörper, sind als ungleichmäßig, nicht in allen Amyloidablagerungen vorliegend zu beschreiben. Auf Grund dieses unregelmäßigen Färbeverhaltens wurden diese Reaktionen bei der Klassifikation des Amyloids als Kontamination der Amyloidablagerung durch Serumproteine interpretiert. Dieser Gruppe konnten insgesamt 105 Biopsien zugeordnet werden.

In *Gruppe 2* befinden sich Fälle mit ausschließlich ungleichmäßigen Immunreaktionen mehrerer Antikörper. Sie umfasst im Ganzen 13 Biopsien. In acht Biopsien kam es zu unregelmäßiger, fleckiger Anfärbung einiger Amyloidherde sowohl mit Anti- $\lambda$ -Leichtkette- als auch mit Anti- $\kappa$ -Leichtkette-Antikörpern. Ohne eindeutig identifizierende Antikörperreaktion wurden diese als AL n.o.s. betitelt. Auf Grund nachträglich erhaltener Informationen, wie etwa die Diagnose eines Plasmozytoms, konnte in fünf dieser Gruppe zugehörenden Fälle AL $\lambda$ - (2) bzw. AL $\kappa$ - (3) Amyloid re-klassifiziert werden. Ferner konnte ein Fall einer AApoA1-Amyloidose zugeordnet werden.

Die *Gruppe 3* beinhaltet drei Fälle, welche zwei verschiedene Amyloidproteine in den Ablagerungen vermuten lassen. So zeigte jeweils der Anti-AA-, der Anti- $\lambda$ -Leichtkette- bzw. der Anti- $\kappa$ -Leichtkette-Antikörper eine kräftige, das gesamte Amyloid betreffende Immunreaktion. Außerdem reagierte in allen drei Biopsien schwach der Anti-TTR-Antikörper.

Der *Gruppe 4* wurden die Biopsien zugeteilt, bei denen eine immunhistochemische Klassifizierung auf Grund der Antikörperreaktionen unmöglich war. Diese Gruppe umfasst neun Biopsien. Trotz des Fehlens einer richtungsweisenden Immunreaktion, konnte ein Fall durch weitere klinische Angaben als AL $\kappa$ -Amyloidose klassifiziert werden, acht Fälle mussten als Amyloid, nicht klassifizierbar, bezeichnet werden.

	AA	ApoA1	AFib	Alys	AL1	AL3	AL7	AL λ	AL κ	ATTR	Diagnose
<b>Gruppe 1</b>											
1								x	(x)	(x)	AL λ
2					x	x		x	(x)		AL λ
3					x			x	(x)		AL λ
4					x			x	(x)		AL λ
5				(x)	x	x	x	x			AL λ
6-8					x	x	x	x	(x)		AL λ
9					(x)	(x)	x	x	(x)		AL λ
10-11					x		x	x	(x)		AL λ
12							x	x	(x)		AL λ
13		(x)			x	x	x	x	(x)		AL λ
14-16								x	(x)		AL λ
17			(x)					x			AL λ
18					(x)				x		AL κ
19					(x)				x	(x)	AL κ
20								(x)	x		AL κ
21	x				(x)			(x)	(x)	(x)	AA
22-23	x							(x)	(x)	(x)	AA
24	x				(x)						AA
25	x				(x)		(x)	(x)	(x)		AA
26	x				(x)						AA
27-29	x									(x)	AA
30	x		(x)						(x)		AA
31	x						(x)	(x)	(x)		AA
32-99	x							(x)			AA
100	x							(x)		(x)	AA
101	x							(x)	(x)		AA
102			x					(x)	(x)		AFib
103			x		(x)			(x)	(x)		AFib
104		x						(x)	(x)		ApoA1
105								(x)		x	ATTR
<b>Gruppe 2</b>											
1-2								x	x	(x)	AL n.o.s.
3								x	x		AL n.o.s.
4							(x)		(x)		AL n.o.s.
5					x	x	x	x	x		AL n.o.s.
6-7								(x)	(x)		AL n.o.s.
8								x	x		AL n.o.s.
9								(x)	(x)		AL κ
10								x	x		AL κ
11						x		x	x		AL κ
12					(x)			x	x		AL λ
13							(x)	x	x		AL λ
<b>Gruppe 3</b>											
1					(x)		(x)	(x)	x	x	AL κ + TTR
2	x									x	AA + TTR
3					x	x		x		x	AL λ + TTR
<b>Gruppe 4</b>											
1									(x)		Amyloid, n. k.
2										(x)	Amyloid, n. k.
3-5	(x)							(x)			Amyloid, n. k.
6	(x)										Amyloid, n. k.
7						(x)					Amyloid, n. k.
8							(x)				Amyloid, n. k.
9	(x)										AL κ

x: homogene und gleichmäßige Antikörperreaktion; (x): unregelmäßige Antikörperreaktion; Amyloid, n.k.: Amyloid, nicht klassifizierbar

**Tabelle 8: Immunreaktion mit mehreren Antikörpern**

## 4 Diskussion

Die hier vorgestellte retrospektive Studie renaler Amyloidosen legt Folgendes dar:

Sie bestätigte die Beobachtung, dass Amyloidosen im Allgemeinen selten in Nierenbiopsaten vorzufinden sind (Prävalenz: 1,7%). Die AL- und AA-Amyloidose sind die häufigsten Formen renaler Amyloidosen. Besonders ältere Menschen (durchschnittlich lag das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 58,8 Jahren) sind von einer renalen Amyloidose betroffen.

### 4.1 Verteilung der Amyloidose

Ein Großteil (93,6%) aller renalen Amyloidosen konnte der AL- oder AA-Amyloidose zugeordnet werden. Bei der Subklassifizierung der AL-Amyloidose zeigte sich eine deutliche Prädominanz der  $\lambda$ -Leichtketten-Amyloidose. Die  $\lambda$ : $\kappa$ -Ratio (10,6:1) lag deutlich auf Seiten der AL $\lambda$ -Amyloidose. Diese Beobachtung, die auch bei anderen Organen gemacht wurde, lässt sich durch die höhere Amyloidogenität der  $\lambda$ -Leichtkette gegenüber der  $\kappa$ -Leichtkette erklären. Somit war die AL $\lambda$ -Amyloidose mit insgesamt 106 Fällen (45,5%) die häufigste Amyloidoseform dieses Kollektivs, gefolgt von 94 (40,3%) Fällen mit AA-Amyloidose (Tabelle 4).

Diese Ergebnisse entsprechen denen anderer Studien und zeigen so, dass die hier vorgestellte Patientenserie als repräsentativ für Nierenbiopsien in der klinischen Pathologie einzuschätzen ist (Bergesio, Ciciani et al. 2008; Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008). Ein ähnliches Verteilungsmuster, 45% AL- und 19% AA-Amyloidosen als die zwei häufigsten Formen, ergab auch die Studie von Kebbel und Röcken, wobei die untersuchten Biopsien nicht nur aus der Niere, sondern aus verschiedenen Organen stammten (Röcken, Schwotzer et al. 1996; Kebbel und Röcken 2006).

Im Hinblick auf das Herz und die Leber ist jedoch noch hervorzuheben, dass AA-Amyloid signifikant seltener bis überhaupt nicht in den entsprechenden Biopsien vertreten ist (Gioeva, Kieninger et al. 2009; Kieninger, Eriksson et al.). Diese Beobachtung spiegelt auch das klinische Erscheinungsbild der unterschiedlichen Amyloidoseformen wider. Symptomatisch treten bei der AA-Amyloidose primär renale Beschwerden gegenüber hepatischen oder kardialen Beeinträchtigungen auf (Dember

2006; Ferrario und Rastaldi 2006; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Rysava 2007; Bergesio, Ciciani et al. 2008; Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008). Deshalb wird bei diesen Fällen vor allem eine Nierenbiopsie durchgeführt, anhand derer dann die Diagnose gestellt wird (Röcken 2009\*; Röcken 2009 ○).

#### 4.2 AA-Amyloidose

Die AA-Amyloidose ist die zweithäufigste Amyloidose in diesem Kollektiv. Das ist bemerkenswert, da im Allgemeinen angenommen wird, dass die Inzidenz der AA-Amyloidose rückläufig sei. Da das Patientenkollektiv aus einem Zeitraum von 18 Jahren stammt, schien es besonders geeignet, um Veränderungen der Inzidenz der AA-Amyloidose herausarbeiten zu können.

Wie auch in anderen Studien beobachtet, fanden sich in diesem Kollektiv hauptsächlich Krankheiten des rheumatischen Formenkreises als Ursache für die Entwicklung einer AA-Amyloidose (Tabelle 6; Hazenberg und van Rijswijk 2000; Lachmann, Booth et al. 2002; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Nishi, Alchi et al. 2008). Auf dieser Beobachtung gründet sich die Hypothese, dass die Prävalenz der AA-Amyloidose innerhalb der Studien-umfassenden Zeit wegen der erheblich verbesserten Therapiemöglichkeiten rheumatoider Erkrankungen sinken müsste. Wie die Tabelle 7 und Abbildung 9 zeigen, konnte aber interessanterweise keine Tendenz einer absoluten oder relativen Abnahme der Fallzahlen renaler AA-Amyloidosen in der untersuchten Serie festgestellt werden.

Dieses Resultat widerspricht klinischen Beobachtungen, wonach die AA-Amyloidose heutzutage als seltener angesehen wird (Myllykangas-Luosujarvi, Aho et al. 1999; Hazenberg und van Rijswijk 2000; Kaipainen-Seppänen, Myllykangas-Luosujärvi et al. 2000). Dieser Widerspruch kann nicht durch den relativ hohen Anteil türkisch abstammender Patienten in Berlin und Potsdam erklärt werden. Von 94 Fällen mit AA-Amyloidose waren nur sieben mit familiärem Mittelmeerfieber assoziiert (Tabelle 6; Grateau 2000; Yonem und Bayraktar 2007). Ebenso wenig konnte eine Veränderung der Biopsieindikation ausgemacht werden, welche die relative Prävalenz der AL- und AA-Amyloidose bedingen könnte. In den letzten 20 Jahren führten vornehmlich Proteinurie, nephrotisches Syndrom und Nierenversagen unbekannter Ursache zu einer Biopsieindikation.

Eine mögliche Erklärung ist, dass moderne Therapien rheumatoider Erkrankungen zwar nicht in der Lage sind, die Prädisposition zur Entwicklung einer AA-Amyloidose zurückzuhalten, aber das Voranschreiten der Krankheit verzögern; somit würden vermehrt Fälle mit AA-Amyloidose in einen subklinischen Bereich fallen (Hazenberg und van Rijswijk 2000). Diese Überlegung deckt sich mit den Ergebnissen von Lachmann et al., die zeigen, dass die Progression renaler AA-Amyloidosen sowohl mit der SAA-Serumkonzentration als auch mit der allgemeinen inflammatorischen Aktivität korreliert (Lachmann, Goodman et al. 2007).

#### 4.3 Hereditäre Amyloidosen

Bei 3% (7) der Patienten wurden immunhistochemisch hereditäre Amyloidosen diagnostiziert: AFib- (1,7%), ATTR- (0,9%) und AApoA1- (10,4%) Amyloidosen (Tabelle 4). Bei fünf Personen dieser Gruppe konnte die genomische DNA analysiert werden, wobei amyloidogene Punktmutationen nachgewiesen wurden. Eine p.Glu526Val Mutation konnte in drei AFib-Amyloidosen nachgewiesen werden. Bei der AApoA1-Amyloidose wurde eine zuvor noch nicht beschriebene p.Ala154GlyfsX48 Mutation gefunden. Eine ATTR-Amyloidose war mit einer p.Val30Met Mutation assoziiert (Eriksson, Schönland et al. 2008; Eriksson, Büttner et al. 2009; Eriksson, Schönland et al. 2009).

Diese 3% liegen deutlich unter den von Lachmann et al. vermuteten 10% hereditärer Amyloidosen (Lachmann, Booth et al. 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte bei den unterschiedlichen Untersuchungskollektiven zu finden sein. Das Patientengut von Lachmann et al. beinhaltet nur an AL-Amyloidose erkrankte Patienten (Lachmann, Booth et al. 2002). Bezieht man in der jetzigen Studie die Prävalenz hereditärer Amyloidosen ebenso nur auf den Anteil der AL-Amyloidose Patienten, ergibt sich bereits ein Anteil von 5,7%. Des Weiteren beinhaltet die Lachmann-Studie Proben unterschiedlicher Organe. Somit ist z.B. die hereditäre ATTR-Amyloidose, die sich vornehmlich im Herzen manifestiert, in unserer Nierenstudie unterrepräsentiert.

Bei den hereditären Amyloidosen wird die Verdachtsdiagnose meist durch das histologische Verteilungsmuster und/oder durch die immunhistochemischen Färbungen erhoben. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigten die Diagnose. Das Vorkommen unterschiedlicher hereditärer Amyloidosen in unserem Kollektiv hebt erneut die Wichtigkeit einer genauen Klassifikation des Amyloidproteins, besonders in Nierenbiopsien, hervor (Lachmann, Booth et al. 2002; Hawkins 2003). Gerade bei hereditären Amyloidosen droht nämlich die Gefahr, sie als AL-Amyloidose fehl zu diagnostizieren und dementsprechend falsch zu therapieren, z.B. durch die Anwendung einer systemischen Chemotherapie oder durch eine Knochenmarkstransplantation (Lachmann, Booth et al. 2002). Der Gebrauch einer umfassenden Antikörper-Palette, welche Antikörper gegen Amyloidproteine von verschiedenen hereditären und nicht-hereditären systemischen Amyloidosen beinhaltet, in Verbindung mit molekularbiologischen Analysen, ist für eine präzise Klassifikation systemischer Amyloidosen sehr zu empfehlen. So konnte beispielsweise der erste Fall einer hereditären ALys-Amyloidose in Deutschland diagnostiziert werden (Röcken, Becker et al. 2006).

Überdies half diese retrospektive Analyse spezielle morphologische Charakteristika in der Niere einiger hereditärer Amyloidosen heraus zu arbeiten. Alle Patienten mit renaler AFib-Amyloidose wurden durch ein pathognomisches histologisches Verteilungsmuster, dem ausgeprägten glomerulären Befall ohne extra-glomeruläre Ablagerungen, charakterisiert (Abbildung 8). Die Glomerula waren allesamt gleichmäßig vergrößert. Einige erinnerten an „Baumwollbällchen“ mit weichen Konturen der Gefäßschlingen. Durch dieses prägnante histologische Erscheinungsbild konnte bereits in der herkömmlichen Hämatoxylin-Eosin-Färbung der hohe Verdacht auf das Vorliegen einer AFib-Amyloidose geäußert werden.

#### 4.4 Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Beurteilung der Altersstruktur des Kollektivs ergab, dass 85,5% der Patienten mit AL-Amyloidose zum Diagnosezeitpunkt zwischen 50 und 79 Jahre alt waren (Tabelle 4; Abbildung 2). Dagegen ließen Patienten mit AA-Amyloidose neben einem späten Altersgipfel auch einen frühen Alterspeak erkennen. 22,3% der Patienten mit AA-Amyloidose befanden sich vor ihrem 40. Lebensjahr, 25,2% waren in ihrer siebten Lebensdekade (Tabelle 4, Abbildung 5). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in

anderen Studien gemacht werden. Somit zeigt sich das Erkrankungsalter unabhängig vom Organbefall (Kebbel und Röcken 2006; Röcken, Ernst et al. 2006; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Nishi, Alchi et al. 2008).

Bezogen auf die Geschlechterverteilung des Untersuchungskollektivs zeigten sich männliche Patienten (58,9%) etwas häufiger betroffen. Diese männliche Prädominanz konnte sowohl in der Gruppe der AL- (57,3%) als auch der AA-Amyloidosen (61,7%) beobachtet werden (Tabelle 4).

Eine mögliche Erklärung dafür kann die männliche Prädominanz bei multiplen Myelomen und schweren Formen der rheumatoiden Erkrankungen sein (Baretton, Linke et al. 1990). Im untersuchten Kollektiv lagen diese beiden auch am häufigstem als zu Grunde liegende Erkrankung vor (Tabelle 5; Tabelle 6).

#### 4.5 Morphologische Ablagerungsmuster

Wie auch in anderen Studien beschrieben, konnte im untersuchten Kollektiv nachvollzogen werden, dass die verschiedenen Amyloidtypen sich nur gering in ihrem Ablagerungsmuster von einander unterscheiden (Abbildung 3; Abbildung 4; Abbildung 6; Dember 2006; Comenzo 2007; Helmchen, Velden et al. 2008; Nishi, Alchi et al. 2008).

Einzig die AFib-Amyloidose ist durch ein unverkennbares Amyloidablagerungsmuster von den restlichen Formen deutlich zu unterscheiden. Wie bereits erwähnt, zeichnete sie sich durch ausgeprägte, rein glomeruläre Ablagerungen aus (Abbildung 8).

Bei den anderen Formen hingegen fand sich Amyloid in unterschiedlicher Ausprägung glomerulär, vaskulär und tubulo-interstitiell. Die relative Verteilung innerhalb dieser drei Kompartimente hingegen variierte bei den unterschiedlichen Amyloidosen. Während sich die AL-Amyloidose vorwiegend auf Glomerula und Gefäßwände beschränkte, fanden sich bei der AA-Amyloidose die Ablagerungen meist in allen drei Strukturen. Dennoch ist keines der genannten Ablagerungsmuster aussagekräftig genug, um ohne immunhistologische Zusatzverfahren Amyloid zu klassifizieren. Die Notwendigkeit der immunhistochemischen Klassifikation, und bei Verdacht einer hereditären Amyloidose, die zusätzliche molekularbiologische Analyse, ist weiterhin unerlässlich.

#### 4.6 Proteinurie

Die eingeschränkte Nierenfunktion ist ein früher Hinweis auf das Vorliegen einer renalen Amyloidose (Bergesio, Ciciani et al. 2007; Helmchen, Velden et al. 2008). Zur Abklärung eines nephrotischen Syndroms kam es auch in diesem Kollektiv oft zu einer Nierenbiopsie. In dieser retrospektiven Studie war es jedoch durch lückenhafte klinische Angaben unmöglich, die Nierenfunktion der Betroffenen mit den verschiedenen Amyloidoseformen in Beziehung zu setzen. Die Beurteilung der Proteinurie ergab, ähnlich wie in anderen Studien, dass 90% aller an AL-Amyloidose erkrankten Patienten an einer schweren Form (>3,5 g/d) litten (Gertz, Lacy et al. 2002; Bergesio, Ciciani et al. 2007; Nishi, Alchi et al. 2008). 66% der Patienten mit AA-Amyloidose schieden täglich mehr als 3,5 g Proteine aus.

Amyloidprotein	Werte der Proteinurie		
	≥ 3,5 g/d	1 - 3,5 g/d	≤1 g/d
AA	29	11	4
AL λ	43	4	4
AL κ	3		
AL n.o.s.	1		1
AFib	1		
ATTR	1		
Amyloid, nicht klassifizierbar	2	1	
<b>Gesamt</b>	<b>80</b>	<b>16</b>	<b>9</b>

**Tabelle 9: Korrelation der Amyloidproteine mit Proteinurie**

Wegen der begrenzt verfügbaren klinischen Angaben konnten auch keine Aussagen zu den Kreatininwerten gemacht werden.

#### 4.7 Immunhistochemische Klassifikation

Es gibt verschiedene Methoden, eine Amyloidose klinisch zu diagnostizieren. Eine sichere Diagnose kann dennoch einzig durch eine Untersuchung von Amyloid-haltigen Gewebeproben gewährleistet werden. Hierbei liegt der Goldstandard immer noch bei der mikroskopischen Untersuchung eines Kongorot-gefärbten Schnittes in polarisiertem Licht (Dember 2006; Picken 2007; Helmchen, Velden et al. 2008; Howie und Brewer 2009). Nachdem Amyloid diagnostiziert worden ist, ist eine Klassifikation der Amyloidose notwendig. Diese gestattet eine Abschätzung der Prognose und ist die Grundlage einer eventuellen Therapie. Die immunhistochemische Färbung von in

Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben ist in der klinischen Pathologie die gängige Methode zur Klassifizierung von Amyloid (Linke, Oos et al. 2006). In dieser Studie wurde die Eignung der Immunhistochemie zur Klassifikation renaler Amyloidosen nur an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben bewertet. Es konnte demnach keine Aussage über die Eignung dieser Methode an nicht fixiertem, gefrorenem Gewebe getroffen werden.

Auf Grund von uneindeutiger bzw. nicht vorhandener Antikörper-Reaktionen konnten in dieser Studie acht von insgesamt 233 Fällen (3,4%) nicht klassifiziert werden (Tabelle 4). Beobachtungen von Larsen et al. und Benson et al. legen die Vermutung nahe, dass sich in dieser Gruppe nicht diagnostizierte ALECT2-Amyloidosen befinden (Benson, James et al. 2008; Larsen, Walker et al. 2010). Diese erst kürzlich entdeckte Amyloidform stammt von dem in der Leber synthetisiertem Leukozyten chemotaktischen Faktor 2 ab. Diese Form weist in der Regel ausgeprägte Amyloidablagerungen in allen Kompartimenten der Niere auf, welche sich stark mit Kongorot anfärben lassen. Zum immunhistochemischen Nachweis dieser Form steht neuerdings ebenfalls ein Antikörper zur Verfügung.

Des Weiteren gab es in der Gruppe der AL-Amyloidose acht weitere Fälle, die nicht weiter subklassifiziert werden konnten (AL n.o.s). Vergleicht man diese Werte mit denen aus älteren Studien, wird deutlich, dass die immunhistochemische Klassifizierung durch die Entwicklung und Verwendung einer größeren Vielzahl von Antikörpern als noch zuverlässiger anzusehen ist (Röcken, Schwotzer et al. 1996; Lachmann, Booth et al. 2002; Gertz 2004; Novak, Cook et al. 2004; Kebbel und Röcken 2006). Ein großer Erfolg unserer Arbeitsgruppe auf diesem Gebiet war die Erweiterung der Antikörper-Palette um drei weitere gegen  $\lambda$ -Leichtkette gerichtete Antikörper. Bei der Gegenüberstellung der AL n.o.s. Werte (3,4%) dieser Studie und der einer früheren (14,2%) werden die durch die Erweiterung erzielten Erfolge deutlich (Kebbel und Röcken 2006). Außerdem bestätigte die Neudiagnose bis dato unentdeckter hereditärer Amyloidosen die Notwendigkeit der molekularbiologischen Verfahren, welche je nach immunhistochemischem Ergebnis erfolgen sollte.

#### 4.8 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz und Herkunft renaler Amyloidosen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass renale Amyloidosen insgesamt selten sind. Neben den am häufigsten vertretenen AL- und AA-Amyloidosen machen hereditäre Amyloidosen einen Anteil von 3% aus. Die stetig wachsende Zahl hereditärer Amyloidosen stellt eine Herausforderung an die korrekte Klassifikation dieser Erkrankung dar. So müssen die verschiedenen Klassifikationsmethoden, wie die Immunhistochemie, sich fortwährend mit den zunehmenden Differentialdiagnosen weiterentwickeln. Nur so kann in Zukunft den an Amyloidose leidenden Patienten eine erfolgversprechende individuelle Therapie zu Teil werden.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden renale Amyloidosen in Nierenbiopsien neu beurteilt. Ein besonderer Fokus lag auf möglicherweise fehldiagnostizierter Amyloidoseformen sowie Veränderungen in der Prävalenz einzelner Formen. Das untersuchte Kollektiv umfasst eine Serie von insgesamt 233 Nierenbiopsien von 231 Patienten aus den Jahren 1990 bis 2007. Die Diagnose "Amyloid" wurde durch die anomale Polarisationsfarbe im polarisierten Licht eines mit Kongorot gefärbten Schnittes bestätigt. Zur immunhistochemischen Klassifikation wurden Antikörper gegen AA-Amyloid, Apolipoprotein A1, Fibrinogen, Lysozym,  $\lambda$ -Leichtkette,  $\kappa$ -Leichtkette, Transthyretin und Amyloid P-Component verwendet. In jeder Biopsie fanden sich Amyloidablagerungen in den Glomeruli, den Gefäßen oder auch im tubulointerstitiellen Raum. Eine Leichtketten (AL)-Amyloidose wurde in 124 (53,2%) von insgesamt 233 Biopsien diagnostiziert und war somit die häufigste Form in diesem Kollektiv. Sie konnte weiter in AL-Amyloid vom  $\lambda$ - [106 (85,5%) Biopsien] und  $\kappa$ -Leichtketten Subtyp [10 (8,1%) Biopsien] unterteilt werden. In acht (6,5%) Fällen konnten die Ablagerungen nicht eindeutig in AL $\lambda$ - oder AL $\kappa$ -Amyloid unterteilt werden und wurden so als AL-Amyloid, nicht weiter klassifizierbar, betitelt. Als zweithäufigste Amyloidose fand sich die reaktive systemische Amyloid A (AA)-Amyloidose, die in 94 (40,3%) Biopsien nachgewiesen wurde. Renale Amyloidosen von vermeintlich hereditärem Ursprung wurden bei sieben (3,0%) Patienten diagnostiziert. Diese setzen sich aus vier (1,7%) Fällen mit Fibrinogen (AFib)-Amyloidose, zwei (0,9%) Fällen mit Transthyretin (ATTR)-Amyloidose und einem (0,4%) Fall mit Apolipoprotein A1 (AApoA1)-Amyloidose zusammen. Acht (3,4%) amyloidhaltige Biopsien konnten nicht klassifiziert werden. 14 (6%) Fälle erhielten im Zuge der Arbeit eine modifizierte Diagnose (zwei AL $\lambda$ -Amyloidosen, vier AL $\kappa$ -Amyloidosen, eine nicht klassifizierbare Amyloidose, zwei AFib-Amyloidosen, eine AApoA1-Amyloidose und drei Amyloidosen mit Verdacht auf Mischformen).

In der Niere sind somit die AL- (53,2%) und die AA-Amyloidosen (40,3%) bei weitem die am häufigsten vertretenen Varianten. Der relative hohe Anteil hereditärer Amyloidosen (3%) verdeutlicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen und umfassenden Klassifikation des Amyloidproteins.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andrade, C. (1952). "A peculiar form of peripheral neuropathy; familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves." Brain **75**(3): 408-27.
- Baretton, G., R. P. Linke, et al. (1990). "[Systemic amyloidoses. Immunohistochemical typing at the time of autopsy using a series of specific antibodies]." Pathologe **11**(2): 71-9.
- Bennhold, H. (1932). "Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot." München Med Wochenschr **69**: 1537-1541.
- Benson, M. D. (2003). "The hereditary amyloidoses." Best Pract Res Clin Rheumatol **17**(6): 909-27.
- Benson, M. D. (2005). "Ostertag revisited: the inherited systemic amyloidoses without neuropathy." Amyloid **12**(2): 75-87.
- Benson, M. D., S. James, et al. (2008). "Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein." Kidney Int **74**(2): 218-22.
- Benson, M. D. und J. C. Kincaid (2007). "The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy." Muscle Nerve **36**(4): 411-23.
- Benson, M. D., J. J. Liepnieks, et al. (2001). "A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein All gene." Genomics **72**(3): 272-7.
- Bergesio, F., A. M. Ciciani, et al. (2008). "Renal involvement in systemic amyloidosis: an Italian collaborative study on survival and renal outcome." Nephrol Dial Transplant **23**(3): 941-51.
- Bergesio, F., A. M. Ciciani, et al. (2007). "Renal involvement in systemic amyloidosis--an Italian retrospective study on epidemiological and clinical data at diagnosis." Nephrol Dial Transplant **22**(6): 1608-18.
- Blank, N. und H. M. Lorenz (2009). "[Diagnostics and therapy of AA amyloidosis]." Pathologe **30**(3): 219-25.
- Bohne, S., K. Sletten, et al. (2004). "Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K, and L." J Pathol **203**(1): 528-37.
- Brenner, D. A., M. Jain, et al. (2004). "Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress." Circ Res **94**(8): 1008-10.

- Carone, F. A. und F. H. Epstein (1960). "Nephrogenic diabetes insipidus caused by amyloid disease. Evidence in man of the role of the collecting ducts in concentrating urine." Am J Med **29**: 539-44.
- Cohen, A. S. (1994). "Proteins of the systemic amyloidoses." Curr Opin Rheumatol **6**(1): 55-67.
- Cohen, A. S. und E. Calkins (1959). "Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins." Nature **183**(4669): 1202-3.
- Comenzo, R. L. (2007). "Current and emerging views and treatments of systemic immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis." Contrib Nephrol **153**: 195-210.
- Connors, L. H., T. Prokajeva, et al. (2009). "Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis." Am Heart J **158**(4): 607-14.
- Dember, L. M. (2006). "Amyloidosis-associated kidney disease." J Am Soc Nephrol **17**(12): 3458-71.
- Eanes, E. D. und G. G. Glenner (1968). "X-ray diffraction studies on amyloid filaments." J Histochem Cytochem **16**(11): 673-7.
- Ensari, C., A. Ensari, et al. (2005). "Clinicopathological and epidemiological analysis of amyloidosis in Turkish patients." Nephrol Dial Transplant **20**(8): 1721-5.
- Erdkamp, F. L., R. O. Gans, et al. (1991). "Endocrine organ failure due to systemic AA-amyloidosis." Neth J Med **38**(1-2): 24-8.
- Ericzon, B. G., M. Larsson, et al. (2003). "Report from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry (FAPWTR) and the Domino Liver Transplant Registry (DLTR)." Amyloid **10 Suppl 1**: 67-76.
- Eriksson, M., J. Büttner, et al. (2009). "Prevalence of germline mutations in the TTR gene in a consecutive series of surgical pathology specimens with ATTR amyloid." Am J Surg Pathol **33**(1): 58-65.
- Eriksson, M., S. Schönland, et al. (2008). "Three German fibrinogen Aalpha-chain amyloidosis patients with the p.Glu526Val mutation." Virchows Arch **453**(1): 25-31.
- Eriksson, M., S. Schönland, et al. (2009). "Hereditary apolipoprotein AI-associated amyloidosis in surgical pathology specimens: identification of three novel mutations in the APOA1 gene." J Mol Diagn **11**(3): 257-62.
- Esteve, V., J. Almirall, et al. (2006). "[Renal involvement in amyloidosis. Clinical outcomes, evolution and survival]." Nefrologia **26**(2): 212-7.
- Falk, R. H., R. L. Comenzo, et al. (1997). "The systemic amyloidoses." N Engl J Med **337**(13): 898-909.

- Ferrario, F. und M. P. Rastaldi (2006). "Renal amyloidosis (Part II)." J Nephrol **19**(3): 242-5.
- Friedreich, N. und A. Kekulé (1959). "Zur Amyloidfrage." Arch Pathol Anat Physiol Klin Med **16**: 50-55.
- Gertz, M. A. (2004). "The classification and typing of amyloid deposits." Am J Clin Pathol **121**(6): 787-9.
- Gertz, M. A. und R. A. Kyle (1991). "Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients." Medicine (Baltimore) **70**(4): 246-56.
- Gertz, M. A., M. Q. Lacy, et al. (2002). "Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney." Kidney Int **61**(1): 1-9.
- Gertz, M. A. und S. V. Rajkumar (2002). "Primary systemic amyloidosis." Curr Treat Options Oncol **3**(3): 261-71.
- Gillmore, J. D., P. N. Hawkins, et al. (1997). "Amyloidosis: a review of recent diagnostic and therapeutic developments." Br J Haematol **99**(2): 245-56.
- Gillmore, J. D., L. B. Lovat, et al. (2001). "Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein." Lancet **358**(9275): 24-9.
- Gioeva, Z., B. Kieninger, et al. (2009). "[Amyloidosis in liver biopsies]." Pathologie **30**(3): 240-5.
- Glenner, G. G., E. D. Eanes, et al. (1972). "The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the  $\beta$ -conformation." J Histochem Cytochem **20**(10): 821-6.
- Glenner, G. G., W. D. Terry, et al. (1973). "Amyloidosis: its nature and pathogenesis." Semin Hematol **10**(1): 65-86.
- Gratacos, J., C. Orellana, et al. (1997). "Secondary amyloidosis in ankylosing spondylitis. A systematic survey of 137 patients using abdominal fat aspiration." J Rheumatol **24**(5): 912-5.
- Grateau, G. (2000). "The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis." Curr Opin Rheumatol **12**(1): 61-4.
- Gregorini, G., C. Izzi, et al. (2005). "Renal apolipoprotein A-I amyloidosis: a rare and usually ignored cause of hereditary tubulointerstitial nephritis." J Am Soc Nephrol **16**(12): 3680-6.
- Grootscholten, C., I. M. Bajema, et al. (2008). "Interobserver agreement of scoring of histopathological characteristics and classification of lupus nephritis." Nephrol Dial Transplant **23**(1): 223-30.

- Haagsma, E. B., P. N. Hawkins, et al. (2004). "Familial amyloidotic polyneuropathy with severe renal involvement in association with transthyretin Gly47Glu in Dutch, British and American-Finnish families." Amyloid **11**(1): 44-9.
- Halloush, R. A., E. Lavrovskaya, et al. (2010). "Diagnosis and typing of systemic amyloidosis: The role of abdominal fat pad fine needle aspiration biopsy." Cytojournal **6**: 24.
- Hamidi Asl, K., J. J. Liepnieks, et al. (1999). "A novel apolipoprotein A-1 variant, Arg173Pro, associated with cardiac and cutaneous amyloidosis." Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 584-8.
- Hawkins, P. N. (2003). "Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement." J Nephrol **16**(3): 443-8.
- Hazenberg, B. P., G. van, II, et al. (2004). "Diagnostic and therapeutic approach of systemic amyloidosis." Neth J Med **62**(4): 121-8.
- Hazenberg, B. P. und M. H. van Rijswijk (2000). "Where has secondary amyloid gone?" Ann Rheum Dis **59**(8): 577-9.
- Helmchen, U., J. Velden, et al. (2008). "Klinische Pathologie der renalen Amyloidose." Nephrologe **3**: 203-215.
- Heschl, R. (1875). "Eine hübsche à-vista Reaktion auf Amyloid-degeneriertes Gewebe." Wien Med Wochenschr **25**: 713-718.
- Howie, A. J. und D. B. Brewer (2009). "Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms." Micron **40**(3): 285-301.
- Howie, A. J., D. B. Brewer, et al. (2008). "Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light." Lab Invest **88**(3): 232-42.
- Jacobson, D. R., R. D. Pastore, et al. (1997). "Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans." N Engl J Med **336**(7): 466-73.
- Jürgens, R. (1875). "Eine neue Reaktion auf Amyloidkörper." Arch Pathol Anat Physiol Klin Med **65**: 189-195.
- Kaipainen-Seppänen, O., R. Myllykangas-Luosujärvi, et al. (2000). "Intensive treatment of rheumatoid arthritis reduces need for dialysis due to secondary amyloidosis." Scand J Rheumatol **29**(4): 232-235.
- Kaplan, B., R. Hrcic, et al. (1999). "Microextraction and purification techniques applicable to chemical characterization of amyloid proteins in minute amounts of tissue." Methods Enzymol **309**: 67-81.
- Kaplan, B., B. M. Martin, et al. (2004). "Biochemical subtyping of amyloid in formalin-fixed tissue samples confirms and supplements immunohistologic data." Am J Clin Pathol **121**(6): 794-800.

- Karathanasis, S. K., R. A. Norum, et al. (1983). "An inherited polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene locus related to the development of atherosclerosis." Nature **301**(5902): 718-20.
- Kazatchkine, M. D., G. Husby, et al. (1993). "Nomenclature of amyloid and amyloidosis- WHO-IUIS nomenclature sub-committee " Bull WHO **71**: 105-108.
- Kebbel, A. und C. Röcken (2006). "Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited." Am J Surg Pathol **30**(6): 673-83.
- Kieninger, B., M. Eriksson, et al. (2010). "Amyloid in endomyocardial biopsies." Virchows Arch **456**(5): 523-32.
- Kisilevsky, R., J. B. Ancsin, et al. (2007). "Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications." Amyloid **14**(1): 21-32.
- Kuroda, T., N. Tanabe, et al. (2002). "Comparison of gastroduodenal, renal and abdominal fat biopsies for diagnosing amyloidosis in rheumatoid arthritis." Clin Rheumatol **21**(2): 123-8.
- Kyle, R. A. (1999). "Clinical aspects of multiple myeloma and related disorders including amyloidosis." Pathol Biol (Paris) **47**(2): 148-57.
- Kyle, R. A. und M. A. Gertz (1995). "Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases." Semin Hematol **32**(1): 45-59.
- Kyle, R. A. und P. R. Greipp (1983). "Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases." Mayo Clin Proc **58**(10): 665-83.
- Kyle, R. A., B. A. Kottke, et al. (1966). "Orthostatic hypotension as a clue to primary systemic amyloidosis." Circulation **34**(5): 883-8.
- Kyle, R. A., A. Linos, et al. (1992). "Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989." Blood **79**(7): 1817-22.
- Lachmann, H. J., D. R. Booth, et al. (2002). "Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis." N Engl J Med **346**(23): 1786-91.
- Lachmann, H. J., H. J. Goodman, et al. (2007). "Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis." N Engl J Med **356**(23): 2361-71.
- Laiho, K., S. Tiitinen, et al. (1999). "Secondary amyloidosis has decreased in patients with inflammatory joint disease in Finland." Clin Rheumatol **18**(2): 122-3.
- Larsen, C. P., P. D. Walker, et al. (2010). "Prevalence and morphology of leukocyte chemotactic factor 2-associated amyloid in renal biopsies." Kidney Int **77**(9): 816-9.

- Linke, R. P. (2000). "Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence." Virchows Arch **436**(5): 439-48.
- Linke, R. P., R. Oos, et al. (2006). "Classification of amyloidosis: misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it." Acta Histochem **108**(3): 197-208.
- Magy, N., J. J. Liepnieks, et al. (2003). "Renal transplantation for apolipoprotein AII amyloidosis." Amyloid **10**(4): 224-8.
- Mehta, H. J., N. C. Talwalkar, et al. (1990). "Pattern of renal amyloidosis in western India. A study of 104 cases." J Assoc Physicians India **38**(6): 407-10.
- Meinhardt, J. und M. Fändrich (2009). "[Structure of amyloid fibrils]." Pathologe **30**(3): 175-81.
- Merlini, G. und V. Bellotti (2003). "Molecular mechanisms of amyloidosis." N Engl J Med **349**(6): 583-96.
- Mousson, C., B. Heyd, et al. (2006). "Successful hepatorenal transplantation in hereditary amyloidosis caused by a frame-shift mutation in fibrinogen Aalpha-chain gene." Am J Transplant **6**(3): 632-5.
- Mucchiano, G. I., L. Jonasson, et al. (2001). "Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerosis. Its association with plasma levels of apolipoprotein A-I and cholesterol." Am J Clin Pathol **115**(2): 298-303.
- Myllykangas-Luosujarvi, R., K. Aho, et al. (1999). "Amyloidosis in a nationwide series of 1666 subjects with rheumatoid arthritis who died during 1989 in Finland." Rheumatology (Oxford) **38**(6): 499-503.
- Nishi, S., B. Alchi, et al. (2008). "New advances in renal amyloidosis." Clin Exp Nephrol **12**(2): 93-101.
- Novak, L., W. J. Cook, et al. (2004). "AL-amyloidosis is underdiagnosed in renal biopsies." Nephrol Dial Transplant **19**(12): 3050-3.
- Obici, L., V. Perfetti, et al. (2005). "Clinical aspects of systemic amyloid diseases." Biochim Biophys Acta **1753**(1): 11-22.
- Pepys, M. B. (2001). "Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1406): 203-10; discussion 210-1.
- Pepys, M. B., P. N. Hawkins, et al. (1993). "Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis." Nature **362**(6420): 553-7.
- Perfetti, V., P. Garini, et al. (1995). "Diagnostic approach to and follow-up of difficult cases of AL amyloidosis." Haematologica **80**(5): 409-15.

- Picken, M. M. (2007). "New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(3): 196-203.
- Picken, M. M. und R. P. Linke (2009). "Nephrotic syndrome due to an amyloidogenic mutation in fibrinogen A alpha chain." J Am Soc Nephrol **20**(8): 1681-5.
- Puchtler, H., F. Sweat, et al. (1962). "On the binding of Congo red by amyloid." J Histochem Cytochem **10**: 355-364.
- Renzulli, P., A. Schoepfer, et al. (2009). "Atraumatic splenic rupture in amyloidosis." Amyloid **16**(1): 47-53.
- Rivera, F., J. M. Lopez-Gomez, et al. (2002). "Frequency of renal pathology in Spain 1994-1999." Nephrol Dial Transplant **17**(9): 1594-602.
- Robbins, J. und J. E. Rall (1960). "Proteins associated with the thyroid hormones." Physiol Rev **40**: 415-89.
- Röcken, C. (2009\*). "[Amyloid and amyloidosis in "Der Pathologe"]." Pathologe **30**(3): 173-4.
- Röcken, C. (2009 ◦). "[Update on immunohistological classification of amyloidoses]." Pathologe **30 Suppl 2**: 121-3.
- Röcken, C., K. Becker, et al. (2006). "ALys amyloidosis caused by compound heterozygosity in exon 2 (Thr70Asn) and exon 4 (Trp112Arg) of the lysozyme gene." Hum Mutat **27**(1): 119-20.
- Röcken, C., J. Ernst, et al. (2006). "[Interdisciplinary guidelines on diagnosis and treatment for extracerebral amyloidoses--published by the German Society of Amyloid Diseases ([www.amyloid.de](http://www.amyloid.de))]." Dtsch Med Wochenschr **131**(27 Suppl 2): S45-66.
- Röcken, C., E. B. Schwotzer, et al. (1996). "The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice." Histopathology **29**(4): 325-35.
- Rysava, R. (2007). "AL amyloidosis with renal involvement." Kidney Blood Press Res **30**(6): 359-64.
- Sachse, C., N. Grigorieff, et al. (2009). "Elektronenmikroskopie an Alzheimer-Fibrille." Bioforum **32**(2): 26.
- Satoskar, A. A., K. Burdge, et al. (2007). "Typing of amyloidosis in renal biopsies: diagnostic pitfalls." Arch Pathol Lab Med **131**(6): 917-22.
- Schena, F. P., G. Pannarale, et al. (1996). "Clinical and therapeutic aspects of renal amyloidosis." Nephrol Dial Transplant **11 Suppl 9**: 63-8.
- Schmidt, H. H., M. J. Propsting, et al. (1999). "[Hereditary amyloidosis]." Internist (Berl) **40**(5): 493-501.

- Schwartz, P. (1970). "Amyloidosis. Cause and Manifestation of senile deterioration." Illinois: Charles C. Thomas Springfield: 57-70.
- Sen, S. und B. Sarsik (2010). "A proposed histopathologic classification, scoring, and grading system for renal amyloidosis: standardization of renal amyloid biopsy report." Arch Pathol Lab Med **134**(4): 532-44.
- Serpell, L. C., M. Benson, et al. (2007). "Structural analyses of fibrinogen amyloid fibrils." Amyloid **14**(3): 199-203.
- Shi, J., J. Guan, et al. (2010). "Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4188-93.
- Simms, R. W., M. N. Prout, et al. (1994). "The epidemiology of AL and AA amyloidosis." Baillieres Clin Rheumatol **8**(3): 627-34.
- Singh, R., M. M. Singh, et al. (1987). "Tuberculosis as a continuing cause of secondary amyloidosis in northern India." J Indian Med Assoc **85**(11): 328-32.
- Sorci-Thomas, M. G. und M. J. Thomas (2002). "The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration." Trends Cardiovasc Med **12**(3): 121-8.
- Tawara, S., M. Nakazato, et al. (1983). "Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type)." Biochem Biophys Res Commun **116**(3): 880-8.
- Tennent, G. A., L. B. Lovat, et al. (1995). "Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4299-303.
- Uda, H., A. Yokota, et al. (2006). "Two distinct clinical courses of renal involvement in rheumatoid patients with AA amyloidosis." J Rheumatol **33**(8): 1482-7.
- Valleix, S., S. Drunat, et al. (2002). "Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family." Kidney Int **61**(3): 907-12.
- Verine, J., N. Mourad, et al. (2007). "Clinical and histological characteristics of renal AA amyloidosis: a retrospective study of 68 cases with a special interest to amyloid-associated inflammatory response." Hum Pathol **38**(12): 1798-809.
- Virchow, R. (1854). "Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose." Virchows Arch Pathol Anat **6**: 135-137.
- von Hutten, H., M. Mihatsch, et al. (2009). "Prevalence and origin of amyloid in kidney biopsies." Am J Surg Pathol **33**(8): 1198-205.
- Westermarck, P., M. D. Benson, et al. (2007). "A primer of amyloid nomenclature." Amyloid **14**(3): 179-83.

Westermarck, P. und B. Stenkvist (1973). "A new method for the diagnosis of systemic amyloidosis." Arch Intern Med **132**(4): 522-3.

Yazaki, M., S. A. Farrell, et al. (2003). "A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis." Kidney Int **63**(5): 1652-7.

Yonem, O. und Y. Bayraktar (2007). "Secondary amyloidosis due to FMF." Hepatogastroenterology **54**(76): 1061-5.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Amyloid
<b>Ala</b>	Alanin
<b>ApoA1</b>	Apolipoprotein A1
<b>ApoA2</b>	Apolipoprotein A2
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>β2M</b>	β 2 Mikroglobulin
<b>C</b>	Kohlenstoff
<b>ca.</b>	Circa
<b>Cys</b>	Cystatin C
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>et al.</b>	et alii/aliae
<b>FAB</b>	Fettaspirationbiopsie
<b>Fib</b>	Fibrinogen
<b>FGA</b>	Fibrinogen-α-Ketten-Gen
<b>Fs</b>	Rasterschub
<b>g, g/d</b>	Gramm, Gramm pro Tag
<b>Gel</b>	Gelsolin
<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>Gly</b>	Glycin
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HIV</b>	humanes Immundefizienz-Virus

<b>H. pylori</b>	Helicobacter pylori
<b>ICD-10</b>	internationale Klassifikation der Krankheiten 10
<b>L</b>	monoklonale Immunglobulin-Leichtkette
<b>LCAT</b>	Lecithin-Cholsterin-Acyltransferase
<b>LECT2</b>	Leukozyten-abgeleitetes Chemotaxin 2
<b>Lys</b>	Lysozym
<b>Met</b>	Methionin
<b>min</b>	Minute
<b>M:F</b>	männlich:weiblich
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>N</b>	Stickstoff
<b>N</b>	Anzahl
<b>n.o.s.</b>	nicht klassifizierbar
<b>PAS</b>	Periodsäure-Schiff-Reagenz
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>SAA</b>	Serum Amyloid A
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TTR</b>	Transthyretin
<b>WHO</b>	Welt gesundheitsorganisation
<b>U</b>	Unit
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>Val</b>	Valin
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amyloidablagerung in den verschiedenen Strukturen der Niere .....	27
Abbildung 2: Altersverteilung der AL-Amyloidose .....	28
Abbildung 3: Schweregrad des Amyloidbefalls .....	28
Abbildung 4: Verteilung des AL-Amyloids .....	29
Abbildung 5: Altersverteilung der AA-Amyloidose .....	32
Abbildung 6: Verteilung des AA-Amyloids .....	32
Abbildung 7: Altersverteilung der AFib-Amyloidose .....	34
Abbildung 8: Verteilung des AFib-Amyloids .....	35
Abbildung 9: Relative Prävalenz renaler AA- und AL-Amyloidosen .....	37
Abbildung 10: Immunhistologische Klassifikation des Amyloids dreier Biopsiefälle .....	38

## 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systemische Amyloidosen .....	3
Tabelle 2: Zu Grunde liegende Krankheiten der AA Amyloidose .....	10
Tabelle 3: Für die Reklassifikation der Amyloidablagerungen verwendete Antikörper ..	23
Tabelle 4: Korrelation des Amyloidproteins mit Alter und Geschlecht der Patienten .....	26
Tabelle 5: Zu Grunde liegende Erkrankungen renaler AL-Amyloidosen .....	29
Tabelle 6: Zu Grunde liegende Erkrankungen renaler AA-Amyloidosen .....	33
Tabelle 7: Prävalenz renaler Amyloidosen .....	37
Tabelle 8: Immunreaktion mit mehreren Antikörpern .....	41
Tabelle 9: Korrelation der Amyloidproteine mit Proteinurie .....	47

### Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Johanna von Hutten, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Prävalenz und Herkunft renaler Amyloidosen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

#### 7.4 Danksagung

Zu aller erst möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Röcken für die Bereitstellung des Themas, seine große Geduld und seine herzliche Unterstützung danken.

Ferner bin ich Herrn Prof. Mihatsch, Herrn Prof. Lobeck und Frau Dr. Rudolph zu großen Dank verpflichtet, da auch sie mir ihre Ressourcen für diese Arbeit großzügigerweise zu Verfügung gestellt haben.

Ich möchte auch allen an der Arbeit beteiligten medizinisch-technischen Assistentinnen aus dem Institut für Pathologie der Charité sehr für ihre Mitarbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen der AG Röcken, ganz besonders Barbara Kieninger, für die schöne Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Adrian Fekete, Florian Köhler, Anne Schira, Rosa Schmuck und Erik Kcumhcs für die nette Unterstützung bei allen Computerfragen.

Stefan von Bartha danke ich für seine Gastfreundschaft, die ich eine Woche lang in Anspruch nehmen durfte, als ich in Basel mein Kollektiv erweiterte.

Nuka Matthies und meiner Mutter danke ich dafür, dass sie meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

Mein ganz privater Dank gilt meinen Freunden, hierbei ganz besonders meinem Freund Lorne Meder, für ihre liebevolle Unterstützung.