

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

DISSERTATION

**EXTRAZEREBRALE AMYLOIDOSEN:**  
**Histomorphologische Studien an Leber- und Herzbiopsien**  
**&**  
**Evaluation neuer Detektionsverfahren im Gewebe**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Barbara Kieninger  
aus Tübingen

Gutachter:      1. Prof. Dr. med. C. Röcken  
                     2. Prof. Dr. med. W. Saeger  
                     3. Prof. Dr. med. H. Schmidt

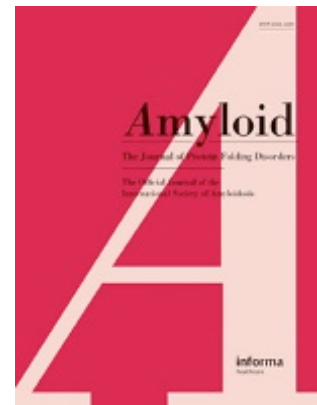
Datum der Promotion: 09.09.2011

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung .....	4 - 14
2.	Anteilerklärung .....	15
3.	Ausgewählte Publikationen	
3.1.	Amyloidosis in liver biopsies .....	16 - 22
3.2.	Amyloid in endomyocardial biopsies .....	23 - 33
3.3.	PTAA and B10: New approaches to amyloid detection in tissue biopsies .....	34 - 40
4.	Lebenslauf .....	41
5.	Komplette Publikationsliste .....	42
6.	Selbstständigkeitserklärung .....	43
7.	Danksagung .....	44

**EXTRAZEREBRALE AMYLOIDOSEN:**  
**Histomorphologische Studien an Leber- und Herzbiopsien**  
**&**  
**Evaluation neuer Detektionsverfahren im Gewebe**

- [1] Gioeva Z, Kieninger B, Röcken C, *Amyloidosis in liver biopsies.*  
 Pathologe. 2009 May;30(3):240-5.
- [2] Kieninger B et al., *Amyloid in endomyocardial biopsies.*  
 Virchows Arch. 2010 May;456(5):523-32.
- [3] Kieninger B et al., *PTAA and B10: New approaches to amyloid detection in tissue - evaluation of amyloid detection in tissue with a conjugated polyelectrolyte and a fibril-specific antibody fragment.*  
 Amyloid. 2011 Jun;18(2):47-52.



## **Abstract**

*Einleitung & Zielsetzung:* Unter Amyloidosen versteht man Krankheiten, bei denen sich verschiedene fehlgefaltete Proteine in diversen Organen ablagern und diese schädigen. Die vorliegende Dissertation sollte zwei Fragestellungen prüfen. 1) Lassen sich aus dem histomorphologischen Vergleich von Leber- und Herzbiopsien Rückschlüsse auf Amyloidtyp, Befallsmuster und demographische Verteilung der Amyloidosen ziehen? 2) Kann durch den Einsatz neuer histochemischer und immunhistochemischer Verfahren der Nachweis des Amyloids im Gewebe verbessert werden?

*Material & Methoden:* Die Kollektive aller drei Studien stammen aus dem Amyloidregister des Instituts für Pathologie der Charité. Zur Klassifizierung des Amyloidtyps wurden immunhistochemische Färbungen mit 11 etablierten Antikörpern durchgeführt, bei myokardialen ATTR-Amyloidosen wurde teilweise zusätzlich eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Nach aufwendiger Etablierung war das Färbeprotokoll von B10 mit einem neu generierten Sekundärantikörper weit aufwendiger als das von PTAA (Polythiophenessigsäure).

*Ergebnisse:* Während sich in 46 Leberbiopsien fast ausschließlich Leichtketten-Amyloidosen fanden, zeigte das 101 Fälle umfassende Kollektiv von Myokardbiopsien einen beinahe ebenso großen Anteil an ATTR-Amyloidosen. Bei einem Viertel der getesteten kardialen ATTR-Amyloidosen konnten Mutationen des *TTR*-Gens nachgewiesen werden. In beiden Kollektiven überwog das männliche Geschlecht und die Erkrankung trat meist im mittleren bis höheren Lebensalter auf. PTAA und B10 zeigten an einem gemischten Kollektiv mit 106 Biopsien uneinheitliche Anfärbungen der Amyloidablagerungen. Die Detektion gelang mit PTAA generell etwas besser, wobei beide Substanzen sowohl Depots in Myokardbiopsien als auch ATTR-Amyloid präziser anfärbten.

*Diskussion:* Auch in unserem Kollektiv konnte gezeigt werden, dass ATTR-Amyloid bevorzugt Herz und Gefäße befällt, teilweise ausgelöst durch amyloidogene Keimbahnmutationen des *TTR*-Gens. Diese Patienten sind meist jünger als die mit einer senilen ATTR-Amyloidose. In Leber- und Herzbiopsien ist die AA-Amyloidose selten zu beobachten, während sie in der Niere weiterhin der zweithäufigste Amyloidtyp ist. Die Immunhistochemie ist zur Klassifikation unentbehrlich und kann durch weitere Antikörper und sorgfältige Titration verbessert werden. Das Überwiegen der männlichen Patienten könnte an der ebenfalls männlichen Prädominanz bei dem AL-Amyloidosen auslösenden Plasmozytom liegen. Die schlechtere Prognose der AL-Amyloidosen

spiegelt sich im Myokard in einem ausgedehnteren Befallsmuster wider. Die Detektion von Amyloid durch PTAA war möglicherweise durch kompetitive Strukturen im Gewebe eingeschränkt. Auch B10 war nicht in der Lage alle Depots anzufärben, was an einer selektiven Erkennung nur bestimmter Fibrillenstrukturen liegen könnte. Die bessere Detektion im Myokard könnte durch geeignetere Vorbehandlung zustande kommen.

### **Einleitung & Zielsetzung**

Amyloidosen sind Proteinablagerungskrankheiten, die sich dadurch auszeichnen, dass unlösliche toxische Proteinaggregate in Beta-Faltblattstruktur in jeglichem Gewebe abgelagert werden und dort zu Organ- und Gewebeschäden führen können. Diese Erkrankungen treten sowohl als systemische Formen als auch als lokale Manifestationen auf, wobei die bevorzugt betroffenen Organe die Niere, der Gastrointestinaltrakt und das Herz sind. Bisher sind über 28 amyloidogene Vorläuferproteine bekannt, die physiologisch vorkommen und im Organismus unterschiedliche Aufgaben übernehmen, bis es aus weitgehend ungeklärter Ursache zur pathologischen Konformationsänderung und Ablagerung im Gewebe kommt, ähnlich wie bei den Prion-Erkrankungen. Die Amyloidosen werden unter anderem anhand der Vorläuferproteine klassifiziert. Am häufigsten sind AL-Amyloidosen aus Immunglobulin-Leichtketten, denen oftmals Plasmazell-Dyskrasien zugrunde liegen. Chronische Entzündungen können AA-Amyloidosen hervorrufen, da es zu einer vermehrten Bildung des Akutphase- und Vorläuferproteins SAA kommt. ATTR-Amyloidosen treten entweder in meist höherem Alter als seniles Amyloid auf oder bei jüngeren Patienten durch eine amyloidogene Mutation im Transthyretin-Gen (*TTR*).

Die korrekte Klassifizierung des Amyloidproteins ist von entscheidender Bedeutung für die Therapie und Prognose des Patienten und kann nur durch den Pathologen erfolgen, meistens durch Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz.

Durch die Klassifizierung, eingehende histologische Charakterisierung und Auswertung der Alters- und Geschlechtsverteilung im Rahmen unserer Studien an großen Kollektiven mit nachgewiesener hepatischer [1] oder myokardialer Amyloidose [2] konnten wir sehr hilfreiche Schlüsse ziehen bezüglich des zu erwartenden Typs der Amyloidose und des Befallsmusters. Bei einem Teil der Myokardbiopsien [2] konnten

wir außerdem durch genetische Untersuchungen einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an hereditären ATTR-Amyloidosen aufdecken.

Der Goldstandard zum Nachweis von Amyloid im Gewebe ist seit über 50 Jahren die hochspezifische Kongorot-Färbung, bei der die Amyloidfibrillen unter polarisiertem Licht eine typische anomale Polarisationsfarbe zeigen. Da dieses Verfahren zum einen nicht sehr sensitiv ist und zum anderen einige Fallstricke aufweist, evaluierten wir zwei neue Konformations-sensitive Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit des Amyloidnachweises im Gewebe [3]. Das konjugierte Polyelektrolyt PTAA und das Kamelantikörperfragment B10 wurden beide an einem großen gemischten Kollektiv Amyloid-positiver Biopsien mit der Kongorot-Färbung verglichen.

## **Material & Methoden**

Sämtliche Amyloid-enthaltenden Biopsien der drei Studien stammen aus dem Amyloid-Register des Instituts für Pathologie der Charité, Campus Mitte, das Zusendungen aus ganz Deutschland erhält.

Für das Leber- [1] und das Herz-Kollektiv [2] wurden alle zwischen 2006 und 2008 eingegangenen entsprechenden Biopsien ausgewählt und der Amyloidbefall mit der Kongorot-Färbung nachgewiesen. Nach immunhistochemischer Färbung mit 11 gegen Amyloidproteine gerichteten Antikörpern (Amyloid P-Komponente, AL $\lambda$ , AL1, AL3, AL7, AL $\kappa$ , AA, ATTR, AFib, ALys, ApoAI) wurde von 2 Untersuchern verblindet die Klassifizierung und histomorphologische Begutachtung vorgenommen. Hierbei wurde das Befallsmuster und eventuelle Begleitreaktionen des Gewebes beschrieben und bei dem Herz-Kollektiv zusätzlich der Schweregrad des Befalls in 3 Stufen (Grad 1 = Befall von weniger als 25% der Biopsie, Grad 2 = 25 – 50%, Grad 3 = mehr als 50%) visuell eingeschätzt.

Bei den ATTR-Fällen unter den Myokardbiopsien [2], bei denen genug Material vorhanden war, wurde zusätzlich eine DNA-Extraktion und Sequenzierung vorgenommen, um senile von hereditären Formen zu unterscheiden.

Für das Kollektiv zur Evaluation von PTAA und B10 [3] wurde dem Amyloid-Register eine konsekutive Serie von Fällen entnommen, die eine große Variationsbreite an Organen und Amyloidtypen zeigte.

Während die Schnitte für die PTAA-Färbung mit Natrium-Carbonat vorbehandelt wurden, wobei kein Sekundärantikörper nötig war, gestaltete sich die Etablierung des Kamelantikörperfragments B10 schwierig. Versuche, den mit Alkalischer Phosphatase oder Promofluor gekoppelten B10-Antikörper ausreichend zu detektieren, misslangen. Der reine B10-Antikörper zeigte zunächst trotz sorgfältiger Titrierung weder an konventionellen noch an Gefrierschnitten ein deutliches Signal. Zur Amplifizierung erzeugten wir schließlich in Kaninchen einen sekundären Anti-B10-Antikörper und fanden so zu unserem endgültigen Färbeprotokoll. Nach Kochen der Schnitte in Citratpuffer und anschließender Biotin-Blockade wurde für je eine Stunde erst mit dem Primärantikörper B10 und dann mit dem Sekundärantikörper Anti-B10 inkubiert. Als Detektionssystem verwendeten wir das Alkalische Phosphatase/RED Rabbit/Mouse-Kit von DAKO.

Unter dem Mikroskop wurde dann das Ausmaß der Übereinstimmung der durch Kongorot markierten Amyloiddepots mit den durch PTAA und B10 gefärbten Bereichen bewertet. Bei Grad 1 wurden weniger als 33% des Amyloids durch die neue Färbung erkannt, bei Grad 2 33 – 66% und bei Grad 3 über 66%. Wenn sich keinerlei Anfärbung im Präparat zeigte, klassifizierten wir als Grad 0.

## **Ergebnisse**

Das Leber-Kollektiv [1] umfasste 46 Biopsien von 29 Männern (63%) und 17 Frauen (37%) mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren (Umfang 34 – 87 Jahre). 40 Patienten (87%) litten an einer AL-Amyloidose, wobei die Ablagerung von  $\lambda$ -Leichtketten mit 26 Fällen (57%) gegenüber der von  $\kappa$ -Leichtketten mit 14 Fällen (30%) überwog. Es fand sich außerdem je ein Fall von ATTR- und AA-Amyloidose (je 2%), bei 4 Leberbiopsien (9%) konnte das Amyloid nicht klassifiziert werden.

In der AL $\lambda$ -Subgruppe zeigte sich ein Überwiegen der Männer (19, 73%) gegenüber den Frauen (7, 27%) und das Durchschnittsalter lag bei 61 Jahren (Umfang 47 – 87 Jahre). Das Befallsmuster war bei 19 Patienten (73%) perisinusoidal, die meisten zeigten auch portale Ablagerungen, die in 21 Fällen (81%) vaskulär und in 23 Fällen (88%) interstitiell vorlagen.

Von den 14 Patienten mit AL $\kappa$ -Amyloidose waren 8 Frauen (57%) und 6 Männer (43%). Das Alter der Patienten reichte von 38 bis 71 Jahren mit einem



Durchschnittsalter von 60 Jahren. Alle Biopsien zeigten sowohl perisinusoidale als auch portale Ablagerungen,

Eine 86-jährige Frau (2%) litt unter einer ATTR-Amyloidose, ein 39-jähriger Mann (2%) unter einer AA-Amyloidose. In 4 Fällen konnte das zugrunde liegende Amyloidprotein aufgrund von Reaktivität von mehreren Antikörpern nicht identifiziert werden.

Die 101 Myokardbiopsien [2] stammten von 63 Männern (62%) und 38 Frauen (38%) zwischen 37 und 85 Jahren (Durchschnittsalter 66 Jahre). 54 Patienten (53%) waren von einer AL-Amyloidose betroffen, wobei AL $\lambda$  etwa 5mal häufiger vertreten war (45, 44%) als AL $\kappa$  (9, 9%). Mit 42 Fällen (42%) war die ATTR-Amyloidose am zweithäufigsten in unserem Kollektiv, in 5 Myokardbiopsien (5%) konnte das Amyloid durch Anfärbung mit mehreren Antikörpern nicht klassifiziert werden.

Auch unter den Patienten mit kardialer AL $\lambda$ -Amyloidose gab es eine männliche Prädominanz mit 29 Männern (64%) und 16 Frauen (36%) und die Patienten waren bei Diagnosestellung im Durchschnitt 61 Jahre alt (Umfang 41 – 81 Jahre). Der Schweregrad des Befalls war in 7 Fällen (16%) als mild einzustufen (Grad 1), 20 Patienten (44%) hatten mäßige (Grad 2) und 18 Patienten (40%) ausgedehnte Ablagerungen (Grad 3). Die Mehrzahl der Biopsien zeigte sowohl interstitiellen als auch vaskulären Befall (32, 71%) und häufiger ein retikuläres Befallsmuster (22 Fälle, 51%) als ein noduläres (8, 19%).

Die kleine AL $\kappa$ -Subgruppe bestand aus 6 Frauen (67%) und 3 Männern (33%) mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren (Umfang 52 – 80 Jahre). Der Befall wurde in 4 Fällen (44%) als Grad 2 eingestuft und in 5 Biopsien (56%) als Grad 3. Auch hier waren die Ablagerungen meistens kombiniert interstitiell und vaskulär (7 Patienten, 78%) und mehr von retikulärer (4, 44%) als von nodulärer Erscheinung (3, 33%).

Die 42 Patienten (42%) mit ATTR-Amyloidose hatten mit 70 Jahren das höchste Durchschnittsalter (Umfang 37 – 85 Jahre). 28 (67%) von ihnen waren männlich und 14 (33%) weiblich. Grad 1-Ablagerungen fanden sich in 9 Fällen (21%), Grad 2 in 21 Biopsien (50%) und 12 Patienten (29%) zeigten ausgedehnten Amyloidbefall (Grad 3). Eine vaskuläre Beteiligung war selten (7 Biopsien, 17%), die große Mehrheit der Fälle zeigte ausschließlich interstitielle Ablagerungen (42, 83%). Das Befallsmuster der ATTR-Amyloidosen zeigte vorwiegend einen nodulären Aspekt (20 Fälle, 48%). Bei 19

von 42 Patienten mit kardialer ATTR-Amyloidose war ausreichend Material für eine DNA-Analyse vorhanden. Unter diesen 19 konnten wir 5 TTR-Mutationsträger (26%) identifizieren, die anstelle des Wildtyp-Transthyretins eine mutierte, amyloidogenere Variante aufwiesen. Wir fanden zweimal die Mutation p.Val30Met und je einmal p.Asp39Val, p.Glu54Asp und p.Val20Ile.

Die Studie zur Evaluation von PTAA und B10 [3] wurde an einem Kollektiv durchgeführt, das 106 Biopsien umfasste. 36 Fälle (34%) stammten aus dem Gastrointestinaltrakt, 28 (26%) aus dem Myokard, 11 Biopsien (10%) waren hepatischen Ursprungs und 31 (29%) kamen aus diversen Organen und wurden der Gruppe „Andere“ zugeordnet. Hinsichtlich der Amyloidtypen gab es 71 AL-Fälle (67%) gefolgt von 22 (21%) mit ATTR-Amyloid. Außerdem gehörten noch 5 Fälle (5%) mit AA-Amyloid und 6 unklassifizierbare Amyloidfälle (6%) zum Kollektiv, sowie je ein AApoAI- und ein Alns-Fall (je 1%).

Bezogen auf alle 106 Biopsien konnte mit der PTAA-Färbung in 57 Fällen (54%) eine deutliche Anfärbung der Amyloidablagerungen im Sinne von Grad 2 oder 3 erzielt werden. Hiervon waren 29 Fälle (27%) dem überzeugenden Grad 3 zuzuordnen, bei dem mehr als 66% des Amyloids detektiert werden, und bei 28 Biopsien (26%) wurde Grad 2 (33 – 66% Detektion) beobachtet. In 11 Fällen (10%) wurden maximal 33% des Amyloids markiert (Grad 1) und bei 38 Proben (36%) zeigte PTAA keinerlei Reaktion (Grad 0). Im Organvergleich gab es deutliche Unterschiede, wobei die Detektion im Myokard mit 19 Fällen Grad 2-3 (68%) der Amyloiderkennung im Gastrointestinaltrakt (19 Biopsien, 53%), in der Leber (6, 55%) und in den anderen Organen (13, 42%) leicht überlegen war. Unter den verschiedenen Amyloidtypen konnte mit PTAA bei den ATTR-Fällen die besten Resultate erzielt werden: 14 Proben (64%) konnten als Grad 2-3 eingestuft werden. In der größeren AL-Gruppe zeigten nur 37 Biopsien (52%) ein derart ausgeprägtes Färbeverhalten.

Das Kamelantikörperfragment B10 war im gesamten Kollektiv von 106 Biopsien nur bei 25 Fällen (24%) in der Lage, mehr als 33% der Amyloidablagerungen zu markieren (Grad 2-3). Nur in 4 Proben (4%) erkannte B10 beinahe das ganze Depot (Grad 3). 62 Biopsien (58%) zeigten fleckige Grad 1-Detektion und 19 Fälle (18%) zeigten überhaupt keine Anfärbung (Grad 0) mit dem Antikörper. Bezogen auf die verschiedenen Organe war die Anfärbung der Amyloidablagerungen analog zu den PTAA-Ergebnissen in den Herzbiopsien deutlich erfolgreicher als in den anderen

Organen. So konnte im Myokard in 13 Fällen (46%) Grad 2-3 erzielt werden, während diese suffiziente Anfärbung nur in 13 – 18% der anderen Organe gelang. Auch bei den Amyloidtypen ähnelte das Färbeverhalten des Kamelantikörperfragments dem von PTAA: bei 11 ATTR-Fällen (50%) wurde das Amyloid gut detektiert (Grad 2-3), während in der AL-Gruppe nur 12 Biopsien (17%) als Grad 2-3 eingestuft werden konnten.

## **Diskussion**

Die relativ geringe Anzahl von Leberbiopsien im Amyloid-Register der Charité im Vergleich zu Myokard- oder anderen Biopsien liegt darin begründet, dass der hepatische Befall trotz hoher Prävalenz bei systemischen Amyloidosen klinisch selten im Vordergrund steht. Oft ist wegen der renal oder kardial führenden Klinik bereits eine entsprechende Biopsie erfolgt und die Diagnose gesichert, so dass die komplikationsreiche Punktion der Leber unterbleiben kann und der Befall erst postmortem als Zufallsbefund festgestellt wird.

Fast alle Patienten in unserem Leber-Kollektiv waren von einer AL-Amyloidose betroffen, wobei das Verhältnis von  $\lambda$ - zu  $\kappa$ -Leichtketten deutlich niedriger war als bei den Myokardbiopsien, was sich durch den Hepatotropismus der  $\kappa$ -Leichtketten erklären lässt.

Im größeren Herz-Kollektiv litten außerdem sehr viele Patienten an einer ATTR-Amyloidose, die aufgrund einer relativ spezifischen anatomischen Verteilung im Herz deutlich häufiger vorkommt als in anderen Organen. Aufgrund des Wesens des Amyloid-Registers als Referenzzentrum für komplizierte Fälle kann eine Fehlerquelle an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden. Man weiß bei der senilen ATTR-Amyloidose, dass sie bevorzugt Herz und Gefäße befällt, wobei sich Amyloid aus Leichtketten in jeglichen Organen ablagern kann. Von den molekularpathologisch untersuchten Fällen zeigte ein Viertel amyloidogene Mutationen im *TTR*-Gen und wurde als hereditäre ATTR-Amyloidose eingeordnet. Der Anteil hereditärer Fälle lag in einer Studie an diversen Organen mit 40% deutlich höher, was die unterschiedlichen Verläufe und Verteilungen im Gewebe widerspiegeln könnte. Die hereditäre ATTR-Amyloidose ist die häufigste erbliche Amyloidose überhaupt. Es sind über 90 Mutationen bekannt, die zum Teil regionale Häufungen zeigen. Manche sind eher mit Polyneuropathie (FAP) vergesellschaftet, während andere fast immer mit einer Kardiomyopathie einhergehen, wie z.B. die p.Val30Met-Mutation, die bei unseren 5 Mutationsträgern gleich zweimal

nachgewiesen werden konnte und die gleichzeitig eine der häufigsten Mutationen überhaupt ist. Wie in unserer Studie sind die Patienten i.d.R. deutlich jünger als Patienten mit seniler ATTR-Amyloidose. Es gibt jedoch Altersüberschneidungen.

AA-Amyloid konnte in nur einer Leberbiopsie und in keiner einzigen Herzbiopsie nachgewiesen werden. Man weiß, dass die AA-Amyloidose kaum eine kardiale Beteiligung zeigt, sondern vor allem die Nieren befällt, wo sie trotz Fortschritten in der Therapie von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Infektionen weiterhin die zweithäufigste Form bleibt. Da die Patienten sich folglich primär mit einer renalen Symptomatik präsentieren, wird die Diagnose meist anhand einer Nierenbiopsie gestellt, so dass von einer gewissen Dunkelziffer an hepatischen und kardialen AA-Fällen auszugehen ist.

Die Klassifizierung der Amyloidtypen durch Immunhistochemie erwies sich bei beiden Organen als geeignete Methode. Sowohl im Leber- als auch im Herzkollektiv konnte jedoch ein geringer Prozentsatz an Fällen nicht klassifiziert werden, weil das Gewebe eine Reaktivität mit mehreren Antikörpern zeigte. Es ist zwar denkbar, dass diesem Phänomen das gleichzeitige Vorhandensein von zwei oder mehr verschiedenen Amyloidproteinen zugrunde liegt, wahrscheinlicher ist jedoch eine Verunreinigung durch Serumproteine oder bei der Leber auch durch in diesem Organ synthetisierte Amyloidvorläuferproteine. Um in komplizierten Fällen dennoch eine Klassifizierung vornehmen zu können, empfiehlt sich die von uns angewendete sorgfältige Titration der Antikörper sowie die Verwendung mehrerer Antikörper gegen verschiedene Epitope der  $\lambda$ -Leichtkette (AL $\lambda$ , AL1, AL3, AL7).

Die Kollektive glichen sich in demographischer Hinsicht dahingehend, dass sich eine männliche Prädominanz zeigte. Die Ursache für den hohen Männeranteil bei AL-Amyloidosen liegt wahrscheinlich darin begründet, dass auch das Plasmozytom als eine häufig zugrunde liegende Erkrankung mehr Männer befällt. Warum auch mehr Männer von ATTR-Amyloidosen betroffen sind, ist bislang unklar.

Die Ablagerung des Amyloids in den Leberbiopsien erfolgte sowohl perisinusoidal als auch im Portalfeld. Rückschlüsse vom Verteilungsmuster auf den Amyloidtyp waren nicht möglich. Bei den Myokardbiopsien zeichneten sich die ATTR-Fälle häufig nur durch ein interstitielles und vorwiegend noduläres Befallsmuster aus, während bei den AL-Amyloidosen meist zusätzlich die Gefäße befallen waren und die Ablagerungen eher retikulär imponierten. Die Biopsien der AL-Patienten zeigten außerdem oft einen ausgedehnteren Befall, was gut mit der schlechteren Prognose

dieser Patienten korreliert. Da Herzbiopsien jedoch in der Regel sehr klein sind, kann man vom Befall der Biopsie nicht unbedingt auf den Befall des ganzen Herzens und damit den Krankheitsverlauf des Patienten schließen.

Der Amyloidnachweis durch PTAA in Biopsien von diversen Organen zeigte uneinheitliche Ergebnisse. Eine deutliche Anfärbung der meisten Amyloid-ablagerungen konnte nur in etwa der Hälfte der Fälle erreicht werden. Die Diskrepanz zu früheren Studien mit PTAA, in denen Amyloid teilweise sehr gut detektiert werden konnte, ist am ehesten durch unsere Standard-Untersuchungsbedingungen mit ausgedehnter Fixierung der Biopsien zu erklären. Gerade in der Anwendung von neuen Konformations-sensitiven Substanzen wie PTAA sind optimierte Protokolle für Vorbehandlung, Lagerung und Umgang mit den Gewebeproben offenbar sehr wichtig.

Mit dem Kamelantikörperfragment B10 konnte keine einheitliche Amyloiddetektion in unserem gemischten Kollektiv erzielt werden. In kaum einem Viertel der Fälle wurden die Amyloiddepots ausreichend erkannt. Erklärungsansätze hierfür sind, dass Antikörper im Allgemeinen kleine fleckförmige Ablagerungen nur schlecht erreichen können. Außerdem hat das Amyloid verschiedener Patienten unterschiedliche Bindungskapazitäten, möglicherweise weil das sogenannte B10-Epitop in seiner Dichte variiert. Dieser Umstand könnte eine konstante Markierung des Amyloids verhindern. Die unvollständige Anfärbung der Depots könnte außerdem Unterschiede in der Fibrillenstruktur widerspiegeln, da bei Amyloidfibrillen ein erheblicher struktureller Polymorphismus besteht. Daher ist B10 möglicherweise besser dazu geeignet, um zwischen verschiedenen Strukturen des Amyloids zu unterscheiden.

Da auch mit dem Kamelantikörperfragment die Amyloidmarkierung im Myokard am besten gelang, ist es fraglich, ob die Fibrillen in diesem Gewebe wirklich eine verbesserte Anfärbbarkeit zeigen oder ob das Gewebe möglicherweise eine geeignetere Vorbehandlung erfahren hat, zumal die meisten Herzbiopsien aus einem einzelnen Institut stammten.

Unter Standard-Untersuchungsbedingungen ist Kongorot weiterhin der Goldstandard zum Nachweis des Amyloids im Gewebe. Unter optimierten Bedingungen mit standardisierten Gewebefixationen und –aufbereitungen können aber andere Substanzen wie PTAA oder B10 zukünftig in der Diagnostik Einzug halten.

## Anhang:

**Tabelle** Systemische Amyloidosen

Amyloidtyp	Vorläuferprotein	Organbefall	Grunderkrankung
<b>AL</b>	monoklonale Immunglobulin-Leichtkette $\lambda$ oder $\kappa$	Haut, Nervensystem, Schilddrüse, Herz, Magen-Darm-Trakt, Niere, Nebenniere, Milz, Leber	klonale Plasmaerkrankungen: monoklonale Gammopathie, Multiples Myelom
<b>ATTR</b>	Transthyretin	Herz, peripheres Nervensystem, Glaskörper, Niere (v.a. im Spätstadium)	hereditär
	Transthyretin (Wildtyp)	Herz, Haut	altersabhängig
<b>AA</b>	Serum Amyloid A (SAA)	Niere, Autonomes Nervensystem, Schilddrüse, Magen-Darm-Trakt, Milz, Leber	chronisch entzündliche Erkrankungen, familiäre Fiebererkrankungen
<b>AApoAI</b>	Apolipoprotein AI	Leber, Kehlkopf, Niere (v.a. medullär), Haut	hereditär
<b>AFib</b>	Fibrinogen $\alpha$ -Kette	Niere (v.a. glomerulär), Milz, Leber	hereditär
<b>ALys</b>	Lysozym	Speicheldrüsen, Schilddrüse, Lunge, Magen-Darm-Trakt, Niere, Milz, Leber, Lymphatisches System	hereditär

Barbara Kieninger hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

[1] Gioeva Z, Kieninger B, Röcken C, *Amyloidosis in liver biopsies.*

Pathologe. 2009 May;30(3):240-5.

- Mitarbeit bei der mikroskopischen Auswertung
- Verfassung des Manuskripts ~ **50%**

[2] Kieninger B et al., *Amyloid in endomyocardial biopsies.*

Virchows Arch. 2010 May;456(5):523-32.

- mikroskopische Auswertung
- demographische Auswertung
- Verfassung des Manuskripts ~ **70%**

[3] Kieninger B et al., *PTAA and B10: New approaches to amyloid detection in tissue - evaluation of amyloid detection in tissue with a conjugated polyelectrolyte and a fibril-specific antibody fragment.*

Amyloid. 2011 Jun;18(2):47-52.

- Etablierung des Färbeprotokolls für B10
- immunhistochemische Färbung des gesamten Kollektivs mit B10
- mikroskopische Auswertung der PTAA- und B10-Färbung
- Verfassung des Manuskripts ~ **80%**

Stuttgart, den 15. April 2011

**Amyloidosis in liver biopsies**

Gioeva Z, Kieninger B, Röcken C.

Pathologe. 2009 May;30(3):240-5. German.

Seite 16 - 22



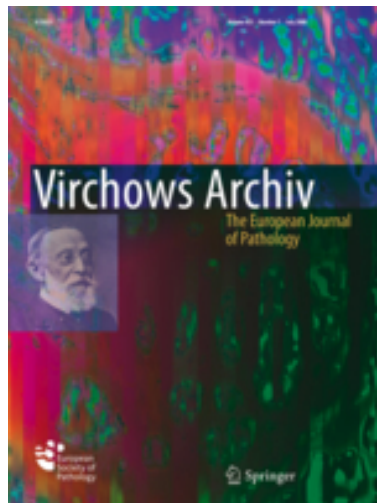


**Amyloid in endomyocardial biopsies**

Kieninger B, Eriksson M, Kandolf R,  
Schnabel PA, Schönland S, Kristen AV,  
Hegenbart U, Lohse P, Röcken C.

Virchows Arch. 2010 May;456(5):523-32.

Seite 23 - 33

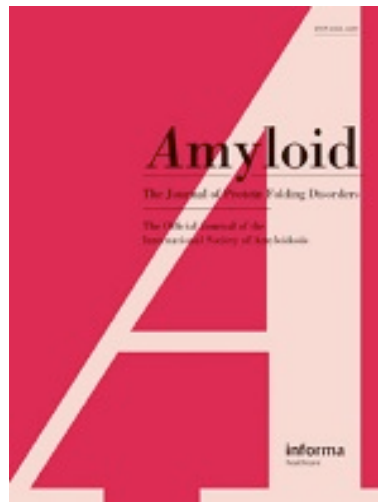


**PTAA and B10: new approaches to amyloid detection in tissue -  
evaluation of amyloid detection in tissue with  
a conjugated polyelectrolyte and  
a fibril-specific antibody fragment**

Kieninger B, Gioeva Z, Krüger S,  
Westermark GT, Friedrich RP,  
Fändrich M, Röcken C.

Amyloid. 2011 Jun;18(2):47-52.

Seite 34 - 40



# LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

- [1] Vortrag *Amyloid in Niere, Herz und Leber* im 23. Amyloidforum in Berlin, 25. Oktober 2008 (mit Johanna von Hutten)
- [2] Gioeva Z, Kieninger B, Röcken C, *Amyloidosis in liver biopsies*. Pathologe. 2009 May;30(3):240-5.
- [3] Vortrag *Amyloid in Myokardbiopsien* im Amyloidforum der 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Freiburg, 7. Juni 2009
- [4] Kieninger B et al., *Amyloid in endomyocardial biopsies*. Virchows Arch. 2010 May;456(5):523-32.
- [5] Haupt C, Bereza M, Kumar ST, Kieninger B, Hortschansky P, Fritz G, Röcken C, Horn U, Fändrich M, *Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils*. J Mol Biol. 2011 May 6;408(3):529-40.
- [6] Kieninger B et al., *PTAA and B10: New approaches to amyloid detection in tissue - evaluation of amyloid detection in tissue with a conjugated polyelectrolyte and a fibril-specific antibody fragment*. Amyloid. 2011 Jun;18(2):47-52.

„Ich, Barbara Kieninger (\*14.10.1982), erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**EXTRAZEREBRALE AMYLOIDOSEN:**

**Histomorphologische Studien an Leber- und Herzbiopsien**

**&**

**Evaluation neuer Detektionsverfahren im Gewebe**

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.“

Stuttgart, den 15. April 2011

# DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem unermüdlichen Doktorvater Prof. Dr. Christoph Röcken, dessen ständige Erreichbarkeit und wissenschaftliche Förderung ihresgleichen suchen.

Auch Sandra Krüger war mit kompetenter und freundschaftlicher Hilfestellung im Labor am Gelingen von Teilen dieser Dissertation maßgeblich beteiligt.

Meinen Freundinnen Johanna von Hutten und Rosa Schmuck ist es zu verdanken, dass ich mich der hochproduktiven AG Röcken angeschlossen habe und dass die Promotion sich streckenweise wie ein Freizeitvergnügen anfühlte.

Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern, denen ich buchstäblich alles verdanke und die durch großzügigste Förderung meine gesamte Studien- und Promotionszeit in dieser fruchtbaren Form erst ermöglicht haben.

Für moralischen Beistand und tatkräftige Unterstützung in dieser speziellen, sowie allen vergangenen und zukünftigen Lebenslagen danke ich meinem ewigen Begleiter Carl Christoph Schneider.