

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)
und dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforschung
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. R. Huber)

**Immunchemische und chemische Charakterisierung
einer nodulären, auf die Unterhaut beschränkten
Amyloidose vom AL κ ₁-Typ:
Klinische Relevanz und Therapieoptionen**

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

vorgelegt von

Natalie Marietta Wiegel

aus Ingolstadt

2007

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. P. Linke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Bartl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Priv. Doz. Dr. med. A. Wollenberg

Prof. Dr. rer. nat. Th. Brocker

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

I.	EINLEITUNG	1
1.	Allgemeiner Überblick über die Krankheitsgruppe der Amyloidosen	1
1.1	Einführung	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Internationale Klassifikation der natürlich vorkommenden Amyloidosen	2
1.1.3	Grenzfälle und „künstliches“ Amyloid	4
1.1.4	Einordnung innerhalb der Proteinspeicherkrankheiten	4
1.2	Struktur von Amyloidablagerungen und Hypothesen zur Amyloidogenese	5
1.2.1	Molekulare Zusammensetzung von Amyloiddeposits	5
1.2.2	Amyloid enhancing factor (AEF)	6
1.2.3	Weitere „Kontaminanten“ innerhalb von Amyloidablagerungen	6
1.2.4	Die Amyloidogenese begünstigende Faktoren	7
1.2.5	Modell zur Fibrillogenese	8
1.2.6	Fibrillenstruktur und Kongorotbindung	9
1.2.7	Fibrillenstruktur in vivo	9
1.3	Klinische Bedeutung der Amyloidosen	10
1.3.1	Epidemiologie	10
1.3.2	Klinische Manifestationen und makroanatomische Befunde	10
1.3.3	Diagnostik	11
1.3.4	Therapie	14
2.	AL/AH-Amyloidosen als Folge monoklonaler Gammopathien	16
2.1	Monoklonale Gammopathien	16
2.1.1	MGUS: Monoklonale Gammopathie von unbestimmter Signifikanz	16
2.1.2	Multiples Myelom, Smouldering Myelom und solitäre Plasmozytome	17
2.1.3	Makroglobulinämie	18
2.1.4	Schwerekettenkrankheit	19
2.1.5	Ablagerungskrankheiten	19
2.1.6	Besondere klinische Symptome und Syndrome	19
2.1.7	Beziehung von monoklonalen Gammopathien zu Proteinthesaurosen vom Immunglobulin-Typ	20
2.2	AL-Amyloidosen	20
2.2.1	Epidemiologie	20
2.2.2	Klinik	21
2.2.3	Diagnostik	22
2.2.4	Therapie	23
2.2.5	Prognose	24
3.	Biochemische Grundlagen zur Entstehung von AL-Amyloidosen	25
3.1	Immunabwehr	25
3.2	Die 5 Immunglobulinklassen	26
3.2.1	Schwere Kette	26
3.2.2	Leichte Kette	26
3.2.3	Antikörper-Aufbau	26
3.3	Erzeugung der Antikörpervielfalt	28
3.3.1	Rekombinatorische Vielfalt	29
3.3.2	Ungenaue Verknüpfung	32
3.3.3	Somatische Hypermutation	32

3.3.4	Pathologische Zustände	33
3.4	Struktur der Kappa-Leichtkette	33
II.	ZIELSETZUNG	38
III.	FALLBERICHT	39
IV.	MATERIAL	41
1.	Chemikalien und Geräte	41
2.	Seren	41
2.1	Normalserum des Menschen (NHS)	41
2.2	Patientenserum	41
2.3	Fötale Kälberserum (FCS)	41
2.4	Normalserum vom Schaf (NSS)	41
3.	Antikörper	42
3.1	Polyklonales Antikörpersystem	42
3.2	Monoklonales Antikörpersystem	43
4.	Kontrollantigene	43
5.	Gewebeproben	44
5.1	Nativgewebe	44
5.2	Gewebeschnitte	44
6.	Tiere	44
7.	Patientenurin	44
V.	METHODEN	45
1.	Protein-Extraktion	45
1.1	Amyloid-Fibrillen-Extraktion	45
1.1.1	Prinzip	45
1.1.2	Durchführung	46
1.2	Proteinfällung aus dem Urin	48
1.2.1	Prinzip	48
1.2.2	Durchführung	48
2.	Dialysieren und Lyophilisieren	48
2.1	Dialyse	48
2.2	Lyophilisierung	49
3.	Gelelektrophorese	49
3.1	Gelherstellung	49
3.2	Prinzip der Proteinwanderung	51
3.3	Praktische Durchführung der Gelelektrophorese	52
4.	Coomassieblau-Färbung	54
4.1	Coomassie brilliant blue	54
4.2	Kolloidales Coomassie blue	54
5.	Geltrocknung	55

6. Elektrotransfer	55
6.1 Elektrotransfer auf Nitrozellulose	55
6.2 Elektrotransfer auf Immobilon	56
7. Ponceau-Färbung	56
8. Reduzieren und Alkylieren von Proteinen	57
8.1 Prinzip	57
8.2 Durchführung	57
9. Gelfiltration / Säulenchromatographie	58
9.1 Prinzip	58
9.2 Material	58
9.3 Durchführung	59
10. Immunchemie	61
10.1 Zweidimensionale Immundiffusion	61
10.1.1 Prinzip	61
10.1.2 Vorgehen	63
10.2 Immunhistochemie	65
10.2.1 Antikörper, Amplifikatoren, spezifisches Fenster und Kontrollen	65
10.2.2 Praktische Anwendung der Immunhistochemie	70
10.3 Western Blot	74
10.3.1 Prinzip	74
10.3.2 Durchführung	74
11. Amidoschwarzfärbung	75
12. Kongorotfärbung	75
13. Herstellung von Antikörpern im Kaninchen	76
13.1 Immunisierung	77
13.2 Blutabnahmetechnik	77
13.3 Serumgewinnung	79
14. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel	79
15. Direkte enzymatische Spaltung des isolierten Proteins	81
16. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	81
17. Aminosäuresequenzanalyse	82
18. Massenspektrometrie	83
19. Mikroskopie	83
20. Dokumentation	83
VI. ERGEBNISSE	85
1. Amyloidnachweis und erste immunhistochemische Untersuchungen am Paraffinschnitt	85
2. Amyloidextraktion aus dem Gewebe	86
3. Auftrennung in der SDS-PAGE und Molekulargewichtsabschätzung	89

4. Aminoterninale Sequenzierung	92
5. Ein polyklonales Antiserum gegen das Amyloidprotein ALκ (UNK)	93
5.1 Impfschema und Antiserumgewinnung	93
5.2 Austestung der Reaktivität der gewonnenen Antiseren	93
5.3 Austestung der Sensitivität und Spezifität von Anti-AL κ (UNK)	94
5.4 Austestung der optimalen Konzentration von Anti-AL κ (UNK) zum Einsatz in der Immunhistochemie	95
5.5 Austestung anderer κ -Antiseren gegen AL κ (UNK) im Gewebeschnitt	96
5.6 Einsatz von Anti-AL κ (KRA-UNK) in der routinemäßigen Immunhistochemie	97
5.7 Konsistenz und Inkonsistenz in der Anfärbung	100
5.8 Kongorot- und immunhistochemische Darstellung von AL κ (UNK)	100
5.9 Morphologische Befunde	104
6. Untersuchung der aus dem Gewebe extrahierten Proteine im Western Blot	105
7. Präparative Proteinisolierung mittels Säulenchromatographie	107
8. Chemische Bestimmung des Kappa-Subtyps durch tryptische Spaltung im Gel, HPLC und Sequenzierung	111
9. Untersuchung weiterer Gewebeproben, Serum und Urin der Patientin UNK	112
9.1 Suche nach Amyloid in Rektum- und Knochenmarksbiopsien	112
9.2 Urin	112
9.3 Vergleich der Proteine in Serum, Urin und Amyloid	114
9.4 Vergleich von Serum und Urin durch Western Blot	114
9.5 Immunchemischer Vergleich von Serum und Urin im Ouchterlony-Test	117
10. Immunologische Charakterisierung des Amyloids (UNK) mit Hilfe der Immundiffusion (Ouchterlony-Test)	118
10.1 Immunchemischer Beweis, dass es sich bei A (UNK) um AL κ -Amyloid handelt	118
10.2 Subklassenzuordnung	119
11. Vollständige Sequenzierung des ALκ (UNK)-Proteins	120
11.1 Tryptische Spaltung im Gel	121
11.2 Asp-N Spaltung im Gel	128
11.3 Chymotryptische Spaltung der Säulenfraktion C 713/714 IV	131
11.4 Vollständige Sequenz	134
11.5 Charakterisierung von κ -Ketten-Fragmenten in AL κ (UNK)	135
VII. DISKUSSION	138
1. Aminosäuresequenz des untersuchten Amyloids ALκ_1 (UNK)	139
1.1 Sequenz im Vergleich mit anderen κ -Leichtketten	139
1.1.1 C-Region	139
1.1.2 V-Region	140
1.2 Kalkulation der Amyloidogenität von AL κ (UNK) aus der Aminosäuresequenz	142
1.2.1 Amyloid-typische Mutationen	142
1.2.2 Austausch in hochkonservierten Regionen	144
1.2.3 Abnahme der Hydrophilie	144

1.2.4	Glykosylierung und akzessorische Proteine	145
1.2.5	Bewertung des „strukturellen Amyloidogenitäts-Risikos“	145
1.3	Bedeutung der C-Region	146
1.4	Fragmentierung	147
1.5	Hinweise auf eine Affinitätsreifung von AL κ (UNK)	151
1.6	Überlegungen zur Quartärstruktur	152
2.	Klinische Manifestation	152
2.1	Kutane Amyloidosen	152
2.2	Kutane Manifestation bei systemischen AL-Amyloidosen	153
2.3	Einordnung von AL κ (UNK)	155
2.4	Überlegungen zur Pathogenese	155
3.	Diskussion der immunologischen Methoden	157
3.1	Verwendete Antikörper	158
3.2	Spezifität eines Anti-AL κ -Antiserums im Besonderen	158
3.3	Antigene	160
3.4	Konkrete Auswirkungen auf diese Arbeit	161
3.4.1	Immunhistochemische Kreuzreaktionen	161
3.4.2	Fehlende immunchemische Subgruppenzuordnung	161
3.4.3	Initiales Versagen von Anti-AL κ (SIN) bei der Detektion von AL κ (UNK)	162
4.	Krankheitsverlauf und Prognose, Therapieoptionen, Ausblick	163
VIII.	ZUSAMMENFASSUNG	166
IX.	ANHANG	169
X.	LITERATURVERZEICHNIS	171

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Angström = 10^{-10} m
AA	Amyloid vom Serumamyloid-A-Ursprung
AANF	Amyloid vom ANF-Ursprung
AApoAI	Amyloid vom ApoAI-Ursprung
AApoAII	Amyloid vom ApoAII-Ursprung
A β	Amyloid beta-Protein bei M. Alzheimer u.a.
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
a. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A β_2 M	Amyloid vom β_2 -Mikroglobulin-Ursprung
A β PP	Amyloid-beta-Vorläuferprotein
ABri	Amyloid bei britischer Demenz
ABriPP	Ursprungprotein des Amyloids bei britischer Demenz
abs.	absolut / absorbiert
ACal	Amyloid vom Thyreocalcitonin-Ursprung
ACys	Amyloid vom Cystatin C-Ursprung
ADan	Amyloid bei dänischer familiärer Demenz
ADanPP	Ursprungprotein des Amyloids bei dänischer familiärer Demenz
a. dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
a. demin.	demineralisiertes Wasser
AEC	Aminoethylcarbazol
AEF	amyloid enhancing factor
AFibA	Amyloid vom Fibrinogen A α -Ursprung
Ag	Antigen
AGel	Amyloid vom Gelsolin-Ursprung
AH γ	Amyloid vom Immunglobulin-(schwere Kette γ)-Ursprung
AIAPP	Amyloid des Inselamyloidpolypeptids
AIg	Amyloid vom Immunglobulin-Ursprung
AIns	Amyloid vom Insulin-Ursprung
Ak	Antikörper
AKer	Amyloid vom Keratinursprung (chemisch nicht gesichert)
ALac	Amyloid vom Lactoferrin-Ursprung
α AL κ (UNK)	Kaninchen-Antiserum gegen AL κ (UNK)
AL κ	Amyloid vom Immunglobulin-(Leichtkette Kappa)-Ursprung
AL λ	Amyloid vom Immunglobulin-(Leichtkette Lambda)-Ursprung
ALys	Amyloid vom Lysozym-Ursprung
Am	Eingangs-Nummer des Patienten
AM	Nummer der Amyloidextraktion
AMed	Amyloid vom Lactadherin-Ursprung, genannt Medin
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Anti-	Antikörper gegen
Anti-IL-6-R-AK	Anti-Interleukin-6-Rezeptor-Antikörper
ApoAI	Apolipoprotein AI
ApoAII	Apolipoprotein AII
ApoE	Apolipoprotein E

APro	Amyloid vom Prolaktin-Ursprung
APrP = PrP ^{Sc}	Amyloid bei Scrapie und CJD, z.T. infektiöses Amyloid (Prion)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
aSAA	Akutphasen-Serumamyloid A
A(tbn)	Amyloid beim Pindborg-Tumor
ATTR	Amyloid vom Transthyretin-Ursprung
BB	Blutbild
BJP	Bence-Jones-Protein
β_2 M	Beta-2-Mikroglobulin
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CD	cluster of differentiation (Zell-Oberflächenmerkmal)
CDR	complementarity determining region
CEA	karzinoembryonales Antigen
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CR	Congo red = Kongorot
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag(e)
3D	dreidimensional
DD	Differentialdiagnose
d.h.	das heißt
Diff-BB	Differentialblutbild
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP- ϵ -Lysin	Dinitrophenyl- ϵ -Lysin
DTT	Dithiothreitol
EFM	electron force microscopy
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
et al.	et alii = und Mitautoren
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FAP	familiäre Amyloidpolyneuropathie
FC-Rezeptor	Rezeptor für das "fragment crystallable" der schweren Ketten eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum

FMF	familiäres Mittelmeerfieber
FR	framework region
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HC α	Schwerekettenkrankheit mit Überproduktion von monoklonalen defekten α -Ketten
HCDD	Schwerekettenablagerungskrankheit, monoklonal
HC γ	Schwerekettenkrankheit mit Überproduktion von monoklonalen defekten γ -Ketten
HCl	Salzsäure
HC μ	Schwerekettenkrankheit mit Überproduktion von monoklonalen defekten μ -Ketten
H γ	Gamma-Schwerekette eines Immunglobulins
HLA	human leukocyte antigen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
H ₂ O-Ü	Wasser-Überstand nach Homogenisieren in a. bidest. und Zentrifugieren
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie / high performance liquid chromatography
HV	hypervariable Region
I	Iod
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
IFN α	Interferon α
Ig (G,A,M,D,E)	Immunglobulin vom Isotyp G,A,M,D,E
IL-6	Interleukin 6
In	Indium
Inv	Marker, Pos 191 der C-Region der Kappa-Leichtkette
IP	Immunhistochemische Färbung unter Peroxidaseinsatz
IPSID	immunoproliferative small intestinal disease
i.S.	im Serum, im Sinne
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH	Krankheit(en)
KM	Knochenmark
konz.	konzentriert
UNK, HAR etc.	Akronyme für die untersuchten Patienten mit Amyloidose
kV	Kilovolt
l	Liter
LCDD	Leichtkettenablagerungskrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA 3	leucocyte function-associated antigen 3 = Leukozytenfunktionsantigen 3
LHCDD	Leicht- und Schwerekettenablagerungskrankheit
L λ , L κ	Lambda bzw. Kappa Leichtkette eines Immunglobulins
LPA-3	Lysophosphatidsäure-Rezeptor 3

M	Mol / molar
M.	Morbus
mA	Milliampère
mc	monoklonal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MGUS	monoklonale Gammopathie von unbestimmter Signifikanz
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimol(ar)
MM	multiples Myelom
m/m	Massenanteil : Massenanteil
MPI	Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18a, Martinsried
M-Protein	Myelomprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	multiple Sklerose
MSA	Multisystematrophie
mTc	metastabiles Technetium
m/v	Massenanteil : Volumenanteil
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cutt-off: Kritisches Molekulargewicht, unterhalb dessen Moleküle die Membran des Dialyseschlauches ungehindert passieren können
N	Normal
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NC	Nitrozellulose(membran)
N-CAM	neural cell adhesion Molecule = neurales Zelladhäsionsmolekül
n.d.	nicht durchgeführt
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHS	normales Humanserum (gesunder Proband)
NI	Niereninsuffizienz
nm	Nanometer
NSS	normales Schafsserum
O*	Sauerstoffradikal
o.g.	obengenannt
OT	Objektträger
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PA	Präalbumin
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase(-Komplex)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7.4 vgl. V.1.1.2
PBS-Ü	Überstand nach Zentrifugieren in PBS
pc	polyklonal

PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNP	Polyneuropathie
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	langer Arm eines Chromosoms
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RL	rainbow-low-Molekulargewichtsmarker
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P-Komponente
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SM	smouldering Myelom
s.o.	siehe oben
Ssp	Spatelspitze
s.u.	siehe unten
Tbc	Tuberkulose
tbn	für Pindborg-Tumore charakteristisches Protein
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	time of flight
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTR	Transthyretin
u.a.	unter anderem
u.g.	unten genannt
V	Volt
vgl.	vergleiche
V_{\max}	maximale Laufgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteil : Volumenanteil
v/w	Volumenanteil : Gewichtsanteil
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewichtanteil : Volumenanteil
w/w	Gewichtsanteil : Gewichtsanteil
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I. Einleitung

1. Allgemeiner Überblick über die Krankheitsgruppe der Amyloidosen

1.1 Einführung

1.1.1 Definition

Der Begriff „Amyloid“ (griechisch: stärkeähnlich) stammt aus der Botanik. Er wurde 1854 in die Pathologie von RUDOLF VIRCHOW eingeführt, der pathologische Ablagerungen im Zentralnervensystem mit Lugolscher Lösung (= alkoholische Iodlösung) im Sauren anfärben konnte und sie ob dieser tinktoriellen Eigenschaft für eine Art tierischer Stärke hielt. Bereits 1859 konnten jedoch FRIEDREICH UND KEKULÉ die Proteinnatur dieser Ablagerungen nachweisen. Dennoch wurde die Bezeichnung Amyloid beibehalten.

Heute fasst man unter den Amyloidosen eine große Gruppe von Proteinspeicherkrankheiten zusammen, die zwar bezüglich Ursache, Art des abgelagerten Proteins und insbesondere in ihrem klinischen Bild höchst heterogen sind (Tabelle I-13), jedoch bemerkenswerte ultrastrukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. GLENNER et al. publizierten 1974 eine immer noch gültige Definition von Amyloid, die die zugleich notwendigen und hinreichenden Bedingungen, die Amyloid gegenüber anderen extrazellulären Proteinablagerungen auszeichnen, prägnant zusammenfasst:

1. Spezifische **Kongorotbindung** (PUCHTLER et al. 1962) mit apfelgrüner Doppelbrechung in linear polarisiertem Licht (LADEWIG 1945, MISSMAHL und HARTWIG 1953).
2. **Fibrillennatur**: Es handelt sich um ca. 7-10 nm dicke, unverzweigte Fibrillen von unbestimmter Länge, wobei sich jeweils 2 oder mehr Filamente umeinander winden (COHEN und CALKINS 1959 und 1964), so dass eine Amyloidfibrille aus 2-5 Filamenten besteht (GLENNER et al. 1974).
3. **β -Faltblattstruktur** in der Röntgenbeugung (EANES und GLENNER 1968, TERMINE et al. 1972, GLENNER et al. 1974): Die Amyloidfibrille besteht aus einer antiparallelen Anordnung von Polypeptidketten in β -Faltblattstruktur. Die Ketten verlaufen dabei quer zur Fibrillenachse (Abbildung I-1).

Tabelle I-1: Definition von Amyloid (GLENNER et al. 1974)

Das Besondere und Interessante an den Amyloidosen ist also, dass diese Krankheitsgruppe auf einer spezifischen Proteinkonformation basiert, die verschiedene Proteine annehmen können. GLENNER hat daher bereits 1980 vorgeschlagen, von „ **β -Fibrillosen**“ zu sprechen. CARRELL und LOMAS (1997) verwenden den Begriff der „**Proteinfaltungskrankheiten**“ bzw.

„**Konformationskrankheiten**“, da nicht die Identität des Proteins an sich, sondern die Umfaltung des nativen (Ursprungs-)Proteins über Amyloidvorläufer zur Fibrille das eigentliche pathogenetische Prinzip und ens morbi aller Amyloidosen darstellt.

1.1.2 Internationale Klassifikation der natürlich vorkommenden Amyloidosen

Die Assoziation von Amyloid mit unterschiedlichen klinischen Krankheitsbildern legte schon früh den Verdacht nahe, dass die Ablagerungen auch von unterschiedlichen Ursprungproteinen abstammen könnten (REIMANN et al. 1935, GLENNER et al. 1970). Die Natur dieser Proteine konnte jedoch erst auf chemischem Wege aufgedeckt werden (GLENNER et al. 1970, BENDITT et al. 1970, HUSBY 1980), nachdem geeignete Methoden entwickelt worden waren, um Amyloid in ausreichender Reinheit aus dem Gewebe zu isolieren (PRAS et al. 1968). Man kennt heute ca. 25 Proteine, die die amyloide Konformation im Organismus annehmen können, und für die meisten der in-vivo-vorkommenden Amyloidosen das lösliche Ursprungprotein (Tabelle I-2, modifiziert nach WESTERMARK et al. 2002):

Akronym	Ursprung	klinisches Syndrom	Literatur
AIg - AL λ , κ - AH γ	L λ L κ	MGUS, SM, Multiples Myelom, Heavy chain disease, Light chain disease, extraossäre Plasmozytome, lokale Plasmozytome, idiopathisch	GLENNER et al. 1970
	H γ	wie AL	EULITZ et al. 1990
ATTR	TTR = PA Wildtyp	senile systemische Amyloidose, kardiovaskuläre Greisenamyloidose Tenosynovium (Carpaltunnelsyndrom)	SLETTEN et al. 1980 SARAIVA et al. 1983 WESTERMARK et al. 1990
	TTR mutiert	familiäre (autosomal dominant) Amyloidpolyneuropathie (FAP)	COSTA et al. 1978
A β_2 M	β_2 M	Arthropathie bei chronischer Hämodialyse Gelenkmanifestationen, Nierenproteinsteine	GEJYO et al. 1985 LINKE et al. 1986
AA	aSAA	idiopathisch erworben: - chronisch-rheumatische KH: rheumatoide Arthritis, M. Bechterew, Kollagenosen - chronisch-entzündliche KH: Colitis ulcerosa, M. Crohn - chronische Infekte: Bronchiektasen, Osteomyelitis, Tbc, Lepra, Lues - maligne Neoplasien mit Fieber: M. Hodgkin - Immundefekte hereditär: - familiäres Mittelmeerfieber (FMF, autosomal dominant) Typ I +II - Muckle-Wells-Syndrom - periodisches Fieber mit Arthritis	LEVIN et al. 1972 LINKE et al. 1975 BENSON et al. 1975 BENDITT et al. 1977
AApoAI	ApoAI	familiäre (autosomal dominant) Amyloidneuropathie Iowa (Irland) (FAP), aortales Amyloid	NICHOLS et al. 1988 WESTERMARK et al. 1995

AApoAII	ApoAII	familiär	KUNISADA et al. 1986 YONEZU et al. 1986 BENSON et al. 2001
AGel	Gelsolin	familiäre (autosomal dominant) finnische kraniale Amyloidpolyneuropathie (FAP)	MAURY et al. 1990 HALTIA et al. 1990
ALys	Lysozym, mutiert	familiäre (autosomal dominant) Amyloidose mit Nephropathie ohne PNP (FAP)	PEPYS et al. 1993
AFibA	Fibrinogen A α mutiert	familiäre (autosomal dominant) Amyloidose mit Nephropathie ohne PNP (FAP)	BENSON et al. 1993
ACys	Cystatin C	familiäre (autosomal dominant) isländische Apoplexie (FAP)	COHEN et al. 1983 GHISO et al. 1986
ABri	ABriPP	familiäre Demenz (Großbritannien)	VIDAL et al. 1999 GHISO et al. 2001
<i>ADan</i>	<i>ADanPP*</i>	<i>familiäre Demenz (Dänemark)</i>	<i>VIDAL et al. 2000</i>
A β	β -Protein-Präkursor	M. Alzheimer, familiärer M. Alzheimer, Amyloidangiopathie, Down-Syndrom, hereditäre zerebrale Angiopathie mit Blutung (Dänemark)	GLENNER et al. 1984 GLENNER und WONG 1984 MASTERS et al. 1985
APrP = PrP ^{Sc}	Prion Protein = scrapie associated fibril (SAF)	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), iatrogene CJD, iatrogene Gerstmann-Sträussler-Krankheit, Gerstmann-Sträussler-Krankheit, Kuru	MERZ et al. 1981 PRUSINER 1982 PRUSINER et al. 1982 DIRINGER et al. 1983 MERZ et al. 1983
ACal	Thyreocalzitonin	medulläres Schilddrüsen-Karzinom	SLETTEN et al. 1976 KEDAR et al. 1976
AIAPP	Inselamyloid-polypeptid	senile Inselamyloidose, Insulinom, Diabetes Mellitus Typ II	WESTERMARK et al. 1987 CLARK et al. 1988
AANF	ANF	senile Herzamyloidose / Vorhofamyloidose	JOHANSSON et al. 1987 LINKE et al. 1988
APro	Prolaktin	Hypophyse im Alter, Prolaktinome	WESTERMARK et al. 1997
AIns	Insulin	iatrogen bei Diabetes Mellitus Typ I	DISCHE et al. 1988
AMed	Lactadherin	Ablagerung von Medin (Spaltprodukt von Lactadherin) in der Aorta im Alter, Lokalisation v.a. in der tunica media	HAGGQVIST et al. 1999
AKer	Keratoepithelin	Cornea; familiär	KORVATSKA et al. 2000
<i>A(tbn)</i>	<i>tbn**</i>	<i>Pindborg-Tumore</i>	<i>MURPHY et al. 2001</i>
<i>ALac</i>	<i>Lactoferrin</i>	<i>Cornea; familiär</i>	<i>KLINTWORTH et al. 1997</i>
ASgI	Semenogelin I	seniles Samenblasenamyloid	LINKE et al. 2005

Tabelle I-2: Klassifikation der Amyloid-Syndrome, modifiziert nach WESTERMARK ET AL. 2002

Anmerkung: Die Akronyme setzen sich wie folgt zusammen: A steht für amyloid(ogen), danach folgt die Abkürzung des abgelagerten Proteintyps (vgl. Abkürzungsverzeichnis). Bei Punktmutationen ist wie folgt zu klassifizieren (Beispiel ATTR bei einem AS-Austausch von V gegen M in Position 30 bzw. L gegen M an Position 111): ATTR(V30M) oder ATTR(L111M). Diese Nomenklatur ist von der WHO anerkannt (Sub-Komitee W-IN (1993)).

(FAP): gehört zur Gruppe der familiären Amyloidosen mit Polyneuropathie

*: gleiches Gen wie ABri und identische N-terminale Sequenz

** : noch nicht eindeutig identifiziert und benannt

Kursiv: vorläufige Nomenklatur, Änderungen möglich.

Daneben wurden und werden immer noch weitere (seltene) Amyloidosen entdeckt, deren Vorläuferproteine ebenfalls charakterisiert werden müssen.

1.1.3 Grenzfälle und „künstliches“ Amyloid

Nur in vivo vorkommende, extrazelluläre Proteinablagerungen, die die von GLENNER genannte Kriterien (Tabelle I-1) erfüllen, dürfen gegenwärtig als Amyloid im eigentlichen Sinne bezeichnet werden (WESTERMARK et al. 2002). Es bestehen jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die Amyloidogenese auch intrazellulär beginnen kann (SHIRAHAMA und COHEN 1975, WESTERMARK et al. 1995, KLUVE-BECKERMAN et al. 2001). Ob Proteinablagerungen, die die ultrastrukturellen Kriterien von Amyloid erfüllen, jedoch ausschließlich intrazellulär lokalisiert sind, den Amyloidosen zugerechnet werden müssen, wird von unterschiedlichen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert. Intrazelluläres „Amyloid“ findet sich z.B. in Zellen endokriner Drüsen (Nebenniere, Hypophyse, Nebenschilddrüse) sowie im Plexus choroideus (ERIKSSON und WESTERMARK 1990, BOHL et al. 1991).

Noch bevor die chemische Struktur der Amyloidosen bekannt war, konnte man bereits erfolgreich Amyloidosen in Labormäusen experimentell induzieren (CZERNY 1893, DOMAGK 1924, TWORT und TWORT 1932, LINKE 1969). Später gelang es, in vivo erzeugte und dort primär nicht amyloidogene, globuläre Proteine in vitro in die Amyloidkonformation zu bringen (GLENNER et al. 1971, LINKE et al. 1973, GLENNER et al. 1974). LIM et al. (2000) zeigten, dass auch aus synthetischen Peptiden Amyloidfibrillen hergestellt werden können. Diese Experimente belegen, dass Amyloid-ähnliche Aggregate prinzipiell aus vielen Polypeptiden unter entsprechenden (z.T. experimentell geschaffenen und extremen) Bedingungen generiert werden können.

In vitro erzeugte Fibrillen mit allen Eigenschaften von Amyloid bezeichnet man als „*amyloid-like fibrils*“, um sie von den in vivo gefundenen „*amyloid fibrils*“ zu unterscheiden (LINKE et al. 1973, WESTERMARK et al. 2002): Erstere entstehen aus in vitro gereinigten, gleichartigen Polypeptidketten während letztere durch ihren natürlichen Gehalt an akzessorischen Proteinen und weiteren Konstituenten chemisch heterogen sind (I. 1.2.1).

1.1.4 Einordnung innerhalb der Proteinspeicherkrankheiten

Die Amyloidosen bilden den Kongorot-positiven Spezialfall innerhalb der großen Gruppe der Proteinfaltungskrankheiten (GLENNER 1980, CARRELL und LOMAS 1997). Von ihnen unterscheidet man Kongorot-negative Proteinthesaurosen, die wiederum in strukturierte und nicht-strukturierte Ablagerungen unterteilt werden (Tabelle I-3).

Proteinthesaurierung als	Beispiel
Amyloid	AL, vgl. Tabelle 1-2
fibrilläres Protein mit den Eigenschaften von Amyloid außer der Dimension der Fibrille / andere Struktur	paired helical filaments bei Demenz (GLENNER et al. 1974, LINKE 1996, LINKE 1998, SADQI et al. 2002)
nicht strukturierte Deposits	HCDD, LCDD (BUXBAUM 2001)

Tabelle I-3: Formen der Proteinthesaurierung

Interessanterweise können Immunglobulin-Leichtketten sowohl in fibrillärer Form (AL) wie auch in granulär - nicht strukturierter Form (LCDD) thesauriert werden. In beiden Fällen kommt es oft zu Funktionseinschränkungen innerer Organe wie z.B. zur Niereninsuffizienz (GALLO et al. 1980, LINKE 1998, BUXBAUM et al. 2000, LIN et al. 2001)).

1.2 Struktur von Amyloidablagerungen und Hypothesen zur Amyloidogenese

1.2.1 Molekulare Zusammensetzung von Amyloiddeposits

Ein Amyloiddeposit enthält als Hauptkomponente Fibrillen, die von einem einheitlichen, namensgebenden Protein gebildet werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass ein Amyloiddeposit chemisch homogen ist und lediglich aus diesem Protein besteht: Neben den namensgebenden Amyloidfibrillen finden sich regelmäßig zu ca. 10% Glykosaminoglykane und Proteoglykane (MAGNUS et al. 1992, SNOW et al. 1989) sowie bestimmte Glykoproteine, die, z.T. in die Fibrillen eingelagert (ihre genaue Anordnung ist unbekannt), deren Architektur mitbestimmen. Erwähnenswert ist dabei die sogenannte P-Komponente, ein Glykoprotein, das bisher in allen Amyloidablagerungen nachgewiesen werden konnte (SKINNER et al. 1974, WESTERMARK et al. 1976, COHEN und CONNORS 1987, PEPYS et al. 1997), aus untereinander verbundenen pentagonalen Einheiten besteht und eine besondere Affinität zu divalenten Kationen (Ca^{++}) und Polyanionen (Heparin) aufweist (HOLCK et al. 1979). Ein strukturgleiches Protein findet sich physiologischerweise als SAP (Serum Amyloid P-Komponente) im Plasma, wo es offenbar eine modulierende Rolle bei der Steuerung der Phagozytose spielt (BHARADWAJ et al. 2001) und als Lektin an Nukleotide und Zuckerstrukturen bindet. Bei der Maus ist SAP ein Akutphaseprotein, ähnlich dem CRP beim Menschen (LE et al. 1982).

Ein weiteres Beispiel eines mit Amyloidablagerungen assoziiertes Proteins ist ApoE, welches sich in Amyloidablagerungen z.B. vom Typ $\text{A}\beta$ und $\text{A}\beta_2\text{M}$ findet. Der genetische Isotyp von ApoE ist dabei ein entscheidender Risikofaktor für das Auftreten von $\text{A}\beta$ - bzw. $\text{A}\beta_2\text{M}$ -Amyloid (GALLO et al. 1994). Mittlerweile konnte ApoE aber auch in extrazerebralen Amyloiddeposits nachgewiesen werden (Haut: FURUMOTO et al. 1998, Niere: TANIGUCHI et al. 1996).

Welche Rollen der P-Komponente und ApoE innerhalb der Amyloidfibrille zukommen ist noch weitgehend unklar. Man spekuliert jedoch, dass sie in ihrer Interaktion mit den amyloidogenen Präkursorproteinen möglicherweise die Fibrillogenese beeinflussen und durch ihre Anwesenheit die Fibrillen in ihrer Konformation stabilisieren, eventuell sogar den strukturellen Ausgangspunkt für die Nidusbildung darstellen (HUSBY et al. 1994).

1.2.2 Amyloid enhancing factor (AEF)

In Zusammenhang mit der schnellen Erzeugung einer Amyloidose im Tier ist der bislang noch funktionelle Begriff des AEF (*amyloid enhancing factor*) entstanden. Diese Bezeichnung wird verwendet für (noch) unzureichend charakterisierte Extrakte aus Geweben, in denen die Amyloidogenese unmittelbar bevorsteht oder bereits erfolgte und von denen man annimmt, dass sie an der Nidusbildung mitwirken bzw. der Amyloidapposition förderlich sind. Der natürlich vorkommende AEF stellt vermutlich nichts anderes dar, als bereits in β -Faltblattkonformation befindliche fibrilläre Proteine bzw. unmittelbare Vorstufen (NIEWOLD et al. 1987, LUNDMARK et al. 2002) und / oder (oben erwähnte) akzessorische Proteine und Zuckerstrukturen (YOKOTA et al. 1991). Überträgt man AEF auf ein Versuchstier und induziert dann eine Amyloidose, so manifestiert sich die Amyloidose bereits innerhalb weniger Tage, während dies sonst 3-4 Wochen erfordert. Der Amyloidotyp im Empfängerorganismus kann sich dabei interessanterweise von dem im Spenderorganismus unterscheiden (MAMBULE et al. 2000). Auch im Organismus nicht vorkommende Proteine mit β -fibrillärer Struktur, wie z.B. Seide, können AEF-Aktivität besitzen (KISILEVSKY et al. 1999). Wenn man so will, sind auch Prionen, das Substrat der infektiösen Amyloidose, nichts anderes als ein (besonders potenter) AEF.

1.2.3 Weitere „Kontaminanten“ innerhalb von Amyloidablagerungen

Neben konstitutiven Molekülen, denen man eine Bedeutung bei der Amyloidinduktion bzw. -stabilisierung zuschreibt, findet man innerhalb von Amyloidablagerungen oder in deren unmittelbarer Nachbarschaft auch häufig - z.T. entnahmebedingt (z.B. durch nachträgliche Imbibierung der Biopsie mit Serum) oder aufgrund einer lokalen Entzündungsreaktion - Serumproteine wie Immunglobuline oder Akutphasenproteine (LINKE 1985). Wenn sich nun beispielsweise in einem AA-Amyloiddeposit Immunglobuline befinden, kann dies die immunhistochemische Amyloidtypisierung erheblich erschweren (LINKE et al. 1975, ROCKEN et al. 1996): In diesem Fall können Antikörper gegen AL mit einem AA-Amyloiddeposit reagieren. Die Vorfärbung mit Kongorot hilft dann differentialdiagnostisch meist weiter

(LINKE et al. 1995). Ähnlich kann es bei den neueren Verfahren der Amyloidtypisierung mit Hilfe der Mikroextraktion (KAPLAN et al. 2001) zu Fehlbestimmungen kommen, wenn nicht die eigentlichen Amyloidproteine, sondern zufällig in der Nachbarschaft vorhandene Proteine fälschlicherweise charakterisiert werden.

1.2.4 Die Amyloidogenese begünstigende Faktoren

Was genau im konkreten Einzelfall die Umfaltung des Ursprungsproteins zur Fibrille bewirkt, ist bis heute nicht in allen Details geklärt.

Generell sind jedoch Proteine mit hohem Anteil an β -Faltblattkonformation eher zur Umfaltung in Fibrillen prädestiniert als solche mit vorwiegend helikaler Struktur (GLENNER et al. 1974). Als Amyloidpromotoren wirken außerdem bestimmte Mutationen in der primären Aminosäureabfolge, z.B. bei hereditären Amyloidosen (HAMILTON et al. 1992, BUXBAUM und TAGOE 2000, BUXBAUM 2004) oder bestimmten Mutanten von AA (HAMMARSTROM et al. 2002), die massenhafte Produktion identischer Proteine, z.B. Immunglobulin-Leichtketten bei AL, SAA bei AA, A β PP bei A β z.B. infolge von Trisomie 21 (HYMAN et al. 1992); sowie ihre unzureichende oder fehlerhafte Degradation (z.B. bei AA, AL, AH, A β). Auch Umgebungsfaktoren (pH, Temperatur, Ionenmilieu (STINE et al. 2003)) spielen eine Rolle, und Geweberegionen mit reicher Proteoglykanausstattung wie Basalmembranen und Bindegewebe sind überdurchschnittlich häufig Ausgangspunkt der Nidusbildung (KISILEVSKY 1992, OHASHI et al. 2002).

Allerneueste Daten zeigen ein einheitliches Lipidmuster in ganz unterschiedlichen Amyloiden, *Lipidrafts* genannt. An diesen ließen sich in vitro Amyloid-ähnliche Fibrillen erzeugen. Damit sind auch die *Rafts* Kandidaten für die Nidusbildung (GELLERMANN et al. 2005).

Die Tatsache, dass akzessorische Proteine und Zuckerstrukturen regelmäßig einen Anteil von ca. 10% in natürlich vorkommenden Amyloiddeposits darstellen, kompliziert sowohl theoretische Überlegungen wie auch die Etablierung geeigneter in-vitro-Modelle zur Fibrillogenese, da vielfältige molekulare Interaktionen berücksichtigt werden müssen (KISILEVSKY 2000). Nach wie vor unklar ist das genaue Zusammenspiel von amyloidogenen Proteinen und lokalen Strukturproteinen sowie physikalischen und chemischen Milieufaktoren bei der Nidusbildung. Ja sogar, ob nun die häufig in Amyloiddeposits angetroffenen Proteinfragmente bereits in der Zirkulation oder erst an Ort und Stelle vom Vorläufer abgespalten werden, ist nur in Einzelfällen belegt (EULITZ und LINKE 1993). Ferner ist die genaue molekulare Anordnung und Faltung der amyloiden Proteine wie auch der

akzessorischen Proteine und Zuckerstrukturen innerhalb der Fibrille nicht aufgeklärt und ihre Wechselwirkungen im Hinblick auf die Stabilität der Fibrille sind Gegenstand der Forschung.

Unklar ist, worauf der klinisch beobachtete Organotropismus systemischer Amyloidosen in Abhängigkeit vom Vorläuferprotein beruht (Tabelle I-2, Tabelle I-12).

Eine wichtige Frage, die ebenfalls noch nicht endgültig entschieden ist, ist, ob bereits der Prozess der Amyloidogenese an sich oder erst das Vorhandensein großer Deposits die klinischen Symptome besser erklären kann, wobei neuere Untersuchungen ersterer Hypothese eine größere Bedeutung beimessen (BELLOTTI et al. 2000, REIXACH et al. 2004). ZEIER et al. (2003) zeigten, dass kleine Deposits als solche wenig pathogen sind.

Die Entstehung einer Amyloidose ist also ein multifaktorielles Geschehen. Gegenwärtig ist es (noch) nicht möglich, für ein beliebiges Protein exakte Voraussagen hinsichtlich seiner Amyloidogenität oder gar der resultierenden klinischen Manifestationen zu treffen.

1.2.5 Modell zur Fibrillogenese

LANSBURY publizierte 1999 ein interessantes spekulatives Modell zur Umfaltung nativer Proteine in die fibrilläre Struktur. Danach kommt es durch eine Überlastung des Chaperonsystems (welches normalerweise durch korrekte Faltung der im rER synthetisierten Polypeptidkette eine quasi unendliche Verdünnung instabiler Proteinvorstufen bewirkt) zur Konzentrationserhöhung fehlgefalteter Proteine - sogenannter protofibrillärer Intermediate -, die nur unvollständig abgebaut werden, akkumulieren, und zu Fibrillen aggregieren können. LANSBURY stützt sich dabei auf frühere in-vitro Untersuchungen, die eine hohe Proteinkonzentration klar als Promotor der Fibrillogenese belegen (HARPER et al. 1997) und spekuliert, dass das Auftreten vieler β -Fibrillosen in typischerweise höherem Lebensalter durch eine Abnahme der Chaperonaktivität mit dem Alter erklärbar sei, bzw. auch eine pathologische Überproduktion identischer, aufgrund ihrer Struktur schwer abbaubarer Proteine das Chaperon-/Proteasomsystem überlasten könne. Die von LANSBURY geforderten Intermediate wurden zum Teil bereits nachgewiesen (EULITZ und LINKE 1993, WALSH et al. 1997, LASHUEL et al. 1998). Ihre Existenz und die Annahme, dass sie toxisch auf ihre Umgebung wirken (CRAWFORD et al. 1998, KIRKITADZE et al. 2001, BUXBAUM 2004), kann die in vivo gemachten Beobachtungen (ZEIER et al. 2003), dass vor allem der Prozess des Anwachsens der Deposits und nicht die Ablagerungen selbst zu klinischen Funktionsstörungen führen, gut erklären. Damit wäre der Prozess der Fibrillogenese als alternativer Eliminationsweg toxischer Proteine zu sehen, der bei Überlastung regulärer Abbausysteme zum Einsatz kommt (ANDERSSON 2002).

1.2.6 Fibrillenstruktur und Kongorotbindung

Amyloid ist durch Anfärbbarkeit mit Kongorot und grüne Doppelbrechung unter polarisiertem Licht gekennzeichnet. Diese tinktorielle Eigenschaft beruht auf der gerichteten Anlagerung von Kongorot-Molekülen an die Amyloidfibrillen längs der Fibrillenachse (DIVRY und FLORKIN 1927, COOPER et al. 1974, GLENNER et al. 1974). Die Ultrastruktur aller Amyloidfibrillen ist nämlich trotz unterschiedlichster Aminosäuresequenzen der Vorläuferproteine (GLENNER et al. 1980) sehr ähnlich:

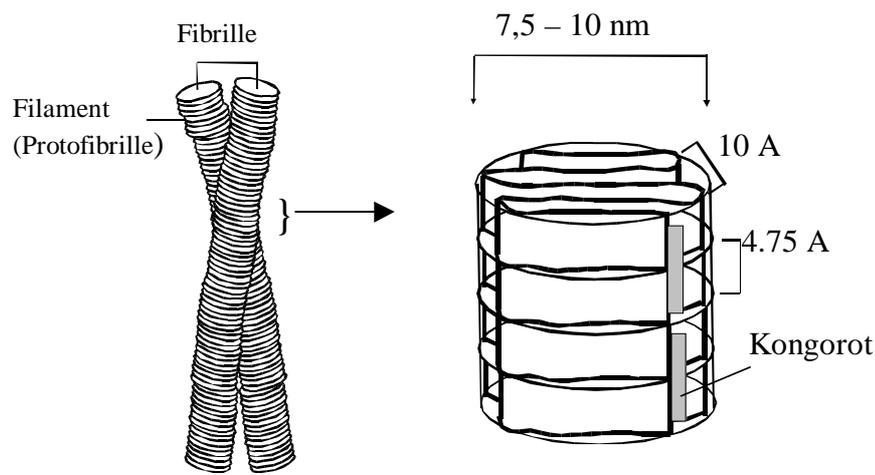


Abbildung I-1: Aufbau der Amyloidfibrille, modifiziert nach GLENNER et al. 1980. Links: Die Amyloidfibrille besteht aus umeinander gewundenen Filamenten. Rechts: Durchmesser eines Filaments = 7,5 – 10 nm. Höhe einer repetitiven Beta-Faltblatt-Einheit = ca. 4,75 Angström. Abstand zwischen zwei Beta-Sheets = ca. 10 Angström. Grau hinterlegt: an ein Filament gebundene Kongorotmoleküle.

1.2.7 Fibrillenstruktur in vivo

Das von GLENNER 1980 vorgeschlagene Fibrillenmodell beruht auf Daten, die an in vitro erzeugten bzw. aus dem Gewebe isolierten Amyloidfibrillen erhoben worden sind. Beim Extraktionsvorgang verändert sich aber die Fibrillenzusammensetzung derart, dass akzessorische Proteine, denen man in situ eine wichtige Rolle bei der Fibrillenstabilisierung zuschreibt, aus der Fibrillenarchitektur gelöst werden können, so dass die Struktur der isolierten Fibrillen möglicherweise vom Nativzustand abweicht. Insbesondere bestehen vollständig in vitro durch limitierte Proteolyse aus dem Ursprungprotein generierte Amyloidfibrillen im Gegensatz zur Situation in vivo nur aus amyloidotischen Proteinen.

Um ein realistischeres Bild über die tatsächlichen Verhältnisse zu bekommen, haben INOUE et al. (1996, 1997, 1998) die Struktur mehrerer Amyloidfibrillen in situ an Glutaraldehydfixierten Geweben und Kryostatschnitten untersucht. Sie kommen dabei zu folgenden, noch spekulativen (weil nicht bestätigten) Ergebnissen: Während in vitro hergestellte Fibrillen aus

1-5 direkt umeinandergewundenen Filamenten bestehen können, weisen in situ betrachtete Fibrillen zusätzlich ein noch spekulatives zentrales, vermutlich aus extrazellulärer Matrix bestehendes Gerüst auf, um das herum die in Filament- (Glutaraldehydfixation) bzw. Helix-Struktur (Kryostatschnitt) von 1-3 nm Durchmesser vorliegenden Amyloidproteine angeordnet sind. Damit dürfte die 1-3 nm-Helix der in vivo vorliegenden Amyloidstruktur am nächsten kommen.

Derartige Untersuchungen müssen weitergeführt werden, weil sie wichtige Erkenntnisse liefern könnten, was Fibrillogenese und molekulare Fibrillen-Matrixinteraktion anbetrifft.

1.3 Klinische Bedeutung der Amyloidosen

1.3.1 Epidemiologie

Die altersadjustierte Inzidenz der mit 85% häufigsten systemischen Amyloidose (der AL-Amyloidose) in den USA wird auf 5.1-12.8 pro Millionen Personen-Jahre geschätzt (KYLE et al. 1989, KYLE et al. 1992), die Inzidenz der ATTR-Amyloidose auf etwa 1/10 davon (FALK et al. 1997).

Die Prävalenz der Amyloidosen steigt mit dem Alter stark an. So fand sich beispielsweise bei einer Autopsieserie von 237 Patienten über 90 Jahren in 65% eine kardiale Amyloidose vom ATTR-Typ, die bei 22 der Patienten als Todesursache angenommen wurde (LIE et al. 1988).

Die Prävalenz des manifesten M. Alzheimer liegt in den USA bei 1.5% (HERBERT et al. 2003). Bei weitem seltener sind die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), sowie die aus den Medien bekannten infektiösen Amyloidosen Scrapie und BSE im Tierreich (Inzidenz um 1 pro 1 Millionen Menschen / Jahr).

1.3.2 Klinische Manifestationen und makroanatomische Befunde

Amyloidablagerungen können im Organismus in unterschiedlicher Verteilung auftreten (GLENNER 1980, KYLE und GREIPP 1983):

- streng **lokal** („Amyloidome“ z.B. bei solitären Plasmozytomen)
- **organlimitiert** (auf ein Organ oder Organsystem begrenzt z.B. bei Amyloidosen endokriner Drüsen, Lungenamyloidosen, Gehirnamyloidosen)
- **systemisch** (generalisiert, Amyloidablagerungen in multiplen Organen).

Die klinischen Manifestationen sind vom Befallsmuster abhängig. Man versucht sie in verschiedene Amyloidsyndrome einzuteilen, die häufig mit der Art des Vorläuferproteins korrelieren (Tabelle I-2). Zum Beispiel zeigen sich die (immer cerebral lokalisierten) A β -Fibrillosen meist durch die Entwicklung einer Demenz (M. Alzheimer), lassen aber dennoch

Differentialdiagnosen zu (vaskuläre Demenzen). AL- und AA-Amyloidosen hingegen können sich sowohl lokal, organlimitiert wie auch systemisch manifestieren, wobei prinzipiell alle Organe und Körperteile in allen denkbaren Konstellationen betroffen sein können. Entsprechend mannigfaltig sind die resultierenden Krankheitsbilder (Tabelle I-12, Tabelle I-13), die gegen eine Vielzahl internistischer und neurologischer Differentialdiagnosen abgegrenzt werden müssen. Es gibt nur wenige wirklich typische Symptome einer Amyloidose. Davon ist eines die Makroglossie mit sichtbaren Zahnabdrücken am Zungenrand bei AL-Amyloidosen, die aber bei weniger als 10% der Patienten mit AL-Amyloidose zu beobachten und somit wenig sensitiv ist (LINKE, persönliche Mitteilung).

Die beginnende Amyloidose verläuft nicht selten klinisch stumm, solange die Funktion lebenswichtiger Organe noch nicht beeinträchtigt ist. Vor allem bei den systemischen Amyloidosen zeigen sich jedoch schon früh mehr oder minder diskrete Funktionsstörungen wie z.B. Müdigkeit, ungeklärte Gewichtsabnahme, oder allgemeines Schwächegefühl (FALK 1997), die häufig verkannt werden. Massive und rasch wachsende Amyloidablagerungen führen dagegen in der Regel zu spezifischeren Organsymptomen wie Herzrhythmusstörungen, Zeichen der Herzinsuffizienz, Neuropathien, Einschränkung der Nierenfunktion, Malabsorption u.s.w., die jedoch ebenfalls nicht selten zunächst als idiopathisch oder altersbedingt fehlgedeutet werden. Auch heute noch werden viele Amyloidosen nicht in vivo diagnostiziert, sondern erst in tabula als Zufallsbefund.

Makroanatomisch erscheinen die betroffenen Organe in der Regel vergrößert, selten verkleinert, holzig-trocken, zuweilen brüchig, von harter, speckiger Konsistenz, was die alten Pathologen zu Bezeichnungen wie „Sagomilz“, „Schinkenmilz“ angeregt hat. Das klinische Korrelat dazu ist bei parenchymatösen Organen die durch Druckatrophie und Gefäßinfiltration bedingte Funktionsminderung (Niereninsuffizienz), sowie Organbrüchigkeit die bis zu Organrupturen (Milz, Leber) führen kann (OKAZAKI et al. 1986). Im kardiovasulären System stehen Gefügedilatation (Herz), Wandfragilität (Arteriolen, Kapillaren) mit Purpura sowie Makro- und Mikroangiopathien mit Gefäßeinengung im Vordergrund.

1.3.3 Diagnostik

Probenentnahme

Bei Verdacht auf systemische Amyloidose wird als risikoärmste und kostengünstigste Methode die Entnahme von **subkutanem Fettgewebe** mittels Nadelbiopsie und anschließender Herstellung eines Quetschpräparats (2-15 µm) empfohlen (WESTERMARK und

STENKVIST 1973, WESTERMARK et al. 1979, GERTZ et al. 1988). Hierbei finden sich Amyloidablagerungen bevorzugt perivaskulär. Bei organlimitiertem bzw. lokalisiertem Befall kann die Biopsie direkt aus dem betroffenen Organ erfolgen. Biopsiert werden damit üblicherweise subkutanes Bauchfett, Rektum-Submukosa und Haut; gelegentlich Herz, Dünndarm, Niere, Knochenmark, Muskel und Nerv; selten Leber, Synovia, Gingiva und Milz (SIPE 1998). Selbstverständlich sind bei entsprechender Indikationsstellung auch andere Entnahmeorte möglich.

Amyloidnachweis

Um Amyloid nachzuweisen, ist die mikroskopische Beurteilung einer repräsentativen, mit **Kongorot** gefärbten Gewebeprobe unter Durchlicht, im polarisierten und im fluoreszenten Licht der Goldstandard (GLENNER 1980, LINKE 2000). Hier zeigt die orange-gelbe Fluoreszenz die Bindung von Kongorot und die charakteristische apfelgrüne Doppelbrechung im polarisierten Licht das Vorhandensein von Amyloid an. Daneben sind prinzipiell auch andere Färbungen möglich (Thioflavin T (VASSAR und CULLING 1959) - weniger spezifisch; Kaliumpermanganatvorbehandlung mit Verdau und Kongorot (ROMHANYI 1979) bzw. ohne Verdau (WRIGHT et al. 1977) - heute obsolete Färbung, da sie nur zwei verschiedene Arten von Amyloid bei gegenwärtig etwa 25 Amyloidosen unterscheidet; Baumwollfarbstoffe, Kristallviolett, Methylviolett). Sie können jedoch in ihrer Sensitivität und Spezifität nicht mit der Kongorotfärbung konkurrieren.

Falls ein Kongorot-gefärbter Gewebeschnitt trotz dringendem klinischen Verdacht kein Amyloid aufweist, sollten, um Probenfehler zu vermeiden, noch mindestens 10 weitere Gewebeschnitte derselben Biopsie untersucht, und wenn möglich einer sensitiveren Methode der Diagnostik (CRIC: Kombination von Kongorot und Immunzytochemie (LINKE et al. 1995), Kongorotfluoreszenz (LINKE 2000)) unterzogen werden. Gelingt trotz dieser Maßnahmen der Amyloidnachweis nicht, rechtfertigt dies keinesfalls die Diagnose „keine Amyloidose“: vielmehr ist die Biopsie an anderer Stelle und in adäquatem zeitlichen Abstand zu wiederholen (LINKE 1998), da eine Amyloid-negative Biopsie grundsätzlich als nicht-schlüssig (nicht konklusiv) angesehen werden muss (MICHELS und LINKE 1998).

Amyloidklassifikation

Die Klassifizierung einer nachgewiesenen Amyloidose bezüglich des Vorläuferproteins ist zur Einleitung einer adäquaten Therapie zwingend erforderlich (GLENNER 1980, LINKE 1987) und erfolgt am einfachsten und kostengünstigsten **immunhistochemisch** (Immunfluoreszenz-

oder Immunperoxidasefärbung) mit Hilfe spezifischer Antikörper am Gewebeschnitt (LINKE 1984, vgl. Kapitel V.10.2).

So nicht erfassbare (z.B. bislang nicht klassifizierte) Amyloidosen können eine **Proteinsequenzierung** (= Goldstandard) erforderlich machen. Diese kann entweder nach Isolierung der Amyloidfibrillen auf „klassische“ Weise (PRAS et al. 1968) mit anschließender Gelelektrophorese und Blotting auf Immobilion (vgl. Kapitel V.6.2), oder durch eine Mikroextraktion entweder aus der nativen Biopsie (z.B. nach LINKE 1985), oder aus formalinfixiertem (Paraffin-)material (LINKE et al. 1983, KAPLAN et al. 2001) mit nachfolgender chemischer Charakterisierung erfolgen. Beim Auffinden einer hereditären Amyloidose müssen außerdem DNA-Studien zur Identifikation von Mutationen durchgeführt werden, da die Prognose und Therapie von der Kenntnis der genetischen Faktoren abhängt (ADAMS 2001, BUXBAUM und TAGOE 2000, BUXBAUM 2004).

Bildgebende Verfahren zum Amyloidnachweis

Bislang konnten nur aus dem klinischen Bild (Organkompromittierung) in Verbindung mit histologischen Befunden Rückschlüsse auf Verteilung und Ausmaß der Amyloidablagerung gezogen werden, die bei der bekanntermaßen hohen Variabilität der Amyloidablagerungen unsicher waren. Seit einigen Jahren werden neuere bildgebende Verfahren zur in-vivo Amyloid-Lokalisationsdiagnostik entwickelt, um die Ausdehnung der Deposits (befallene Organe) und ihre Dynamik unter Therapie besser einschätzen zu können. Dabei wird mit i.v. applizierten, radioaktiv markierten Substanzen (*Tracern*) gearbeitet, die spezifisch an Amyloid binden sollen und szintigraphisch detektiert werden (Tabelle I-4):

Radiopharmakon	Darstellung von	Literatur
Gallium	renales Amyloid	LEE et al. 1983
^{99m} Tc-PYP (Pyrophosphat)	Weichteilamyloid	LEE et al. 1986
I-123 Amyloid P-Komponente	alle Amyloidosen	HAWKINS 1994
I-123 SAP (Serum Amyloid P-Komponente)	AA, A β ₂ M >AL, ATTR, Leber, Milz, niemals Herz, Haut, Nerven	NELSON et al. 1991
^{99m} Tc-Aprotinin	Monitoring der Herzamyloidose	APRILE et al. 1995
^{99m} Tc-MAMA-CG (Chrysamin G = Kongorot-Analog)	artikuläres AA-Amyloid im Huhn	DEZUTTER et al. 2001
I-131 β ₂ M In-111 rh β ₂ M-H ₅	β ₂ M-Amyloidose	FLOEGE et al. 2001 LINKE et al. 2000
^{99m} Tc-DPD (3,3 diphono-1,2-propanodicarboxic acid)	ATTR-Amyloid	PUILLE et al. 2002
BSB-like Radiopharmaceuticals ((trans,trans)-1-bromo-2,5,-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styryl-bencene)	A β -Amyloidose (M. Alzheimer)	KUNG et al. 2002

IMPY: 6-iodo-2-(4 ⁻ -dimethylamino-)phenyl-imidazo[1,2-a]pyridin	A β -Amyloidose (M. Alzheimer)	KUNG et al. 2002
Agtrin (ein Proteoglycan), noch nicht radioaktiv markiert	A β -Amyloidose (M. Alzheimer)	COTMAN et al. 2000

Tabelle I-4: Radiopharmaka zur Lokalisationsdiagnostik von Amyloidablagerungen

Wegen ihrer hohen Invasivität und oft noch geringen Spezifität und Sensitivität (VIGUSHIN 1993) konnten sich diese Verfahren jedoch mit den derzeitig verfügbaren Tracern (noch) nicht allgemein durchsetzen und bleiben bislang Spezialinstituten vorbehalten. Insbesondere vermag die Anwendung der radioaktiv markierten P-Komponente nicht, alle Amyloiddeposits in einem Patienten oder alle Patienten mit Amyloidose zu erfassen (PUILLE et al. 2002, LINKE 2003).

1.3.4 Therapie

Grundsätzlich gibt es theoretisch fünf mögliche Therapieansätze: Reduzierung des Vorläufermoleküls (1), Behinderung der Umfaltung (2), Behinderung der Apposition (3), Reduzierung des abgelagerten Amyloids (4), symptomatische Therapie (5).

Die Punkte 2,3 und 4 sind heute noch im experimentellen Stadium, so dass in der Praxis die z.T. schon erfolgreiche Beherrschung einer ursächlichen Grundkrankheit (Punkt 1) bzw. die symptomatische Therapie (Punkt 5) ganz im Vordergrund stehen. Je nach Amyloid-Syndrom werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt:

Bei reaktiver AA-Amyloidose zielt die Therapie (HAZENBERG 1994) auf eine Kontrolle des Entzündungsprozesses (operative Sanierung von chronischen Entzündungsherden, Antibiotikagabe, Immunsuppression), bei hereditären AA-Amyloidosen gilt die Prävention mit Colchizin als sicherste Methode (ZEMER et al. 1986, LINKE 1993). Bei der AL-Amyloidose steht die Unterdrückung oder Beseitigung des monoklonalen Plasmazellklons (Chemotherapie mit Melphalan und Prednison, (KYLE et al. 1997), Hochdosischemotherapie mit autologer (COMENZO et al. 1998, COMENZO und GERTZ 2002, PERZ et al. 2004) oder allogener (GILLMORE et al. 1998) Stammzelltransplantation) im Vordergrund. Bei ATTR und AFib kommt eine Lebertransplantation in Betracht (ERICZON et al. 1995, HOLMGREN et al. 1993, KRÜGER et al. 1997, ZELDENRUST et al. 2003), bei A β ₂M die Nierentransplantation (DRÜECKE 2000). Lokale Amyloidknoten können durch Exzision therapiert werden (KAKANI et al. 2001). Im Bereich der Amyloidosen vom AA-Typ wurde von teilweise guten Behandlungserfolgen berichtet, z.B. im Fall der juvenilen rheumatoiden Arthritis (TAN et al. 1995, MICHELS et al. 1993). Bei anderen systemischen Formen (AApoAI, ALys, ATTR (Wildtyp)) wiederum sind

Therapien nicht bekannt. Hier könnten Ansätze aus Punkt 2 und 3 in Zukunft erfolgversprechend sein.

Auf die Therapie speziell der AL-Amyloidose wird in I.2.2 eingegangen.

2. AL/AH-Amyloidosen als Folge monoklonaler Gammopathien

Bei den AL/AH-Amyloidosen werden monoklonale leichte bzw. schwere Ketten von Immunglobulinen thesauriert. Notwendige - jedoch nicht hinreichende - Voraussetzung für die Entstehung einer AL/AH-Amyloidose ist die monoklonale Gammopathie mit einer stark gesteigerten Produktion von monoklonalen Immunglobulinen durch einen autonomen, d.h. sich unabhängig von antigenen Stimuli vermehrenden Plasmazellklon.

Damit ist die AL-Amyloidose eine Folgekrankheit monoklonaler Gammopathien. Die Vertreter dieser Krankheitsgruppe sollen hier kurz genannt werden, nicht zuletzt um das breite klinische Symptomenspektrum des Krankheitsbildes der AL/AH-Amyloidose, welches oft wesentlich vom Verlauf der monoklonalen Gammopathie mitgeprägt wird, zu vergegenwärtigen.

Die folgende Einteilung beruht auf vom Tumorzentrum München (1998) herausgegebenen Leitlinien „Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Multiples Myelom“ und ist, da sie z.T. nach klinischen, z.T. nach biochemischen Kriterien erfolgt, nicht ganz überschneidungsfrei.

2.1 Monoklonale Gammopathien

2.1.1 MGUS: Monoklonale Gammopathie von unbestimmter Signifikanz

Die MGUS fasst alle Zustände zusammen, bei denen eine moderate monoklonale Paraproteinproduktion gefunden wird, ohne dass Zeichen einer Progression, klinische Symptome (Ausnahme: Polyneuropathie) oder der Nachweis einer monoklonalen Plasmazellpopulation im Knochenmark vorliegen. Es spielt keine Rolle, welcher Immunglobulin-Isotyp produziert wird und wo sich die monoklonale Plasmazellpopulation befindet. Daher fällt sowohl ein z.B. „Prä“-Multiples Myelom als auch z.B. eine „Prä“-Makroglobulinämie Waldenström in die Gruppe der MGUS.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - M-Protein < 3,0 g/dl i.S., stabile Werte im Verlauf - kein oder nur in Spuren vorhandenes Bence-Jones-Protein - niedriges β_2M i.S. (<0,3 mg/l) - niedriger Plasmazell-Labeling Index (<1%) - <10% Plasmazellen im KM-Ausstrich, keine Zellatypien - negative KM-Biopsie - keine Osteolysen - keine Anämie - keine Hyperkalzämie - keine Niereninsuffizienz |
|---|

Tabelle I-5: Definition MGUS

Die MGUS wird auch als „Prämyelom“ bezeichnet, da in 10-30 Jahren etwa 30% der Patienten ein Multiples Myelom oder eine andere behandlungsbedürftige Erkrankung mit Paraproteinämie entwickeln (KYLE und LUST 1989, KYLE 1993). Bei den restlichen 70% ist die Paraproteinämie nicht progredient und damit klinisch „ohne Signifikanz“. Das zeigt, dass die MGUS kein einheitliches Krankheitsbild ist. Dennoch kann von jeder Form der MGUS eine Amyloidose ausgehen, wenn sie die entsprechende amyloidogene Leichtkette produziert.

2.1.2 Multiples Myelom, Smouldering Myelom und solitäre Plasmazytome

Von „Myelom“ spricht man, wenn eine monoklonale Plasmazellvermehrung im blutbildenden Knochenmark („Myelon“) stattfindet. Das „multiple Myelom“ ist damit die systemische („multiple“) Infiltration des blutbildenden Knochenmarks durch monoklonale Plasmazellen. Abbildung I-2 fasst für dieses Krankheitsbild typische klinische Manifestationen zusammen.

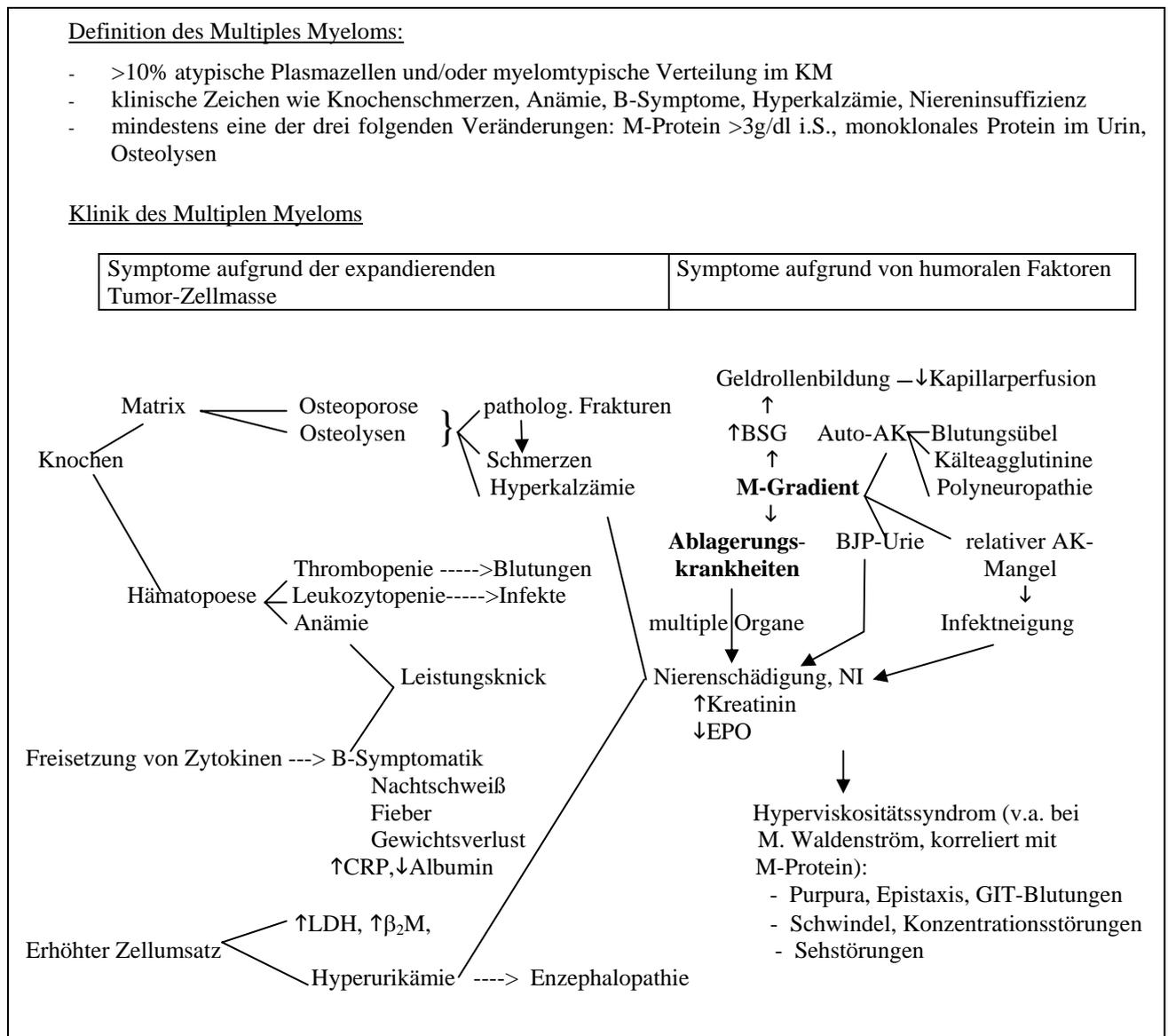


Abbildung I-2: Definition und Klinik des multiplen Myeloms

Eine Art Plateauphase oder „Schwelzustand“ zwischen MGUS und Multiplem Myelom stellt das „**Smouldering Myelom**“ dar: Die histo-morphologischen Kennzeichen des MM sind erfüllt (Nachweis myelomtypischer Plasmazellen im KM). Es fehlen jedoch die rasche Progression und die typische Klinik.

- M-Protein > 3,0 g/dl i.S.
- >10% atypische Plasmazellen im KM und / oder myelomtypische Verteilung.
- Keine Progredienz, keine myelomtypische Klinik

Tabelle I-6: Definition des Smouldering Myelom

Außer der systemischen Form wurden auch lokalisierte Varianten des Multiplen Myeloms beschrieben, die sogenannten **solitäre Plasmozytome**:

<u>Definition des solitären Plasmozytoms des Knochens:</u>	<u>Definition des solitären extramedullären Plasmozytoms:</u>
Einzelner, histologisch gesicherter Knochenherd ohne Hinweis auf systemischen Befall (Beckenkammbiopsie, Bildgebung), serologische Befunde können positiv oder negativ sein	Einzelner, histologisch gesicherter Herd, mit primärer Weichteillokalisierung (z.B. oberer Aerodigestivtrakt), ohne Hinweis auf systemischen Befall, serologische Befunde können positiv oder negativ sein

Tabelle I-7: Definition des solitären medullären und extramedullären Plasmozytoms

In der Literatur werden daneben noch **multifokale** und **sarkomatöse** Wuchsformen von Plasmozytomen beschrieben.

Wenn die Plasmazellen das Knochenmark verlassen und massenhaft im Blut erscheinen, spricht man von einer **Plasmazelleukämie**.

- >20% Plasmazellen im Differentialblutbild (2000/ μ l)
- kann sich aus einem MM entwickeln oder initial vorliegen

Tabelle I-8: Definition der Plasmazelleukämie

2.1.3 Makroglobulinämie

Sie ist definiert durch die monoklonale Produktion von **IgM**.

In 40% liegt ein niedrig malignes NHL zugrunde (mit primärem Lymphknoten-Befall, jedoch ist in >85% auch das Knochenmark mit lymphoplasmazytischen Zellen infiltriert), nur selten ein Multiples Myelom.

Liegt klinisch ein Hyperviskositätssyndrom vor, spricht man vom **M. Waldenström**.

2.1.4 Schwerekettenkrankheit

Heterogene Gruppe, definiert durch Produktion von fehlgebildeten schweren Ketten oder Fragmenten davon, die meist im Urin erscheinen.

HCγ : in 40% lymphoplasmozytoide Zellen wie bei Makroglobulinämie, in 15% Plasmazellen, selten bei CLL oder hochmalignem Lymphom, z.T. kein Tumor nachweisbar
HCμ : meist Ausdruck einer CLL, gelegentlich beim Multiplen Myelom; in 50% werden zusätzlich Leichtketten produziert
HCα : beim gastrointestinalen NHL vom mediterranen Typ (IPSID: „Immunoproliferative small intestinal disease“), kein Knochenmarksbefall

Tabelle I-9: Varianten der Schwerekettenkrankheit

2.1.5 Ablagerungskrankheiten

Mit monoklonaler Gammopathie assoziierten Krankheiten die durch die Art der Ablagerung der Tumorprodukte definiert sind (BUXBAUM und GALLO 1999):

LCDD (light chain deposition disease):	Ablagerung von globulären monoklonalen Leichtketten, amorph
HCDD (heavy chain deposition disease):	Ablagerung von globulären monoklonalen Schweren Ketten, amorph
LHCDD (light and heavy chain deposition disease):	Ablagerung von globulären monoklonalen leichten und schweren Ketten, amorph
Immunotaktoide Glomerulopathie:	Ablagerung von Antikörperteilen in die Glomerula der Niere, biochemisch noch nicht gesichert
Amyloidose:	Ablagerung von monoklonalen leichten oder schweren Ketten oder Fragmenten davon in fibrillärer und amyloidotischer Form

Tabelle I-10: Ablagerungskrankheiten

2.1.6 Besondere klinische Symptome und Syndrome

Schließlich hat man besondere Bezeichnungen für charakteristische klinische Symptome im Rahmen von monoklonalen Gammopathien geprägt:

- **POEMS-Syndrom:** kommt v.a. bei osteosklerotischen Myelomen vor und ist durch Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, monoklonale Gammopathie und Hautläsionen gekennzeichnet.
- **Bence-Jones-Proteinurie:** Ausscheidung monoklonaler leichter Ketten im Urin

Tabelle I-11: Besondere klinische Syndrome und Symptome bei monoklonalen Gammopathien

2.1.7 Beziehung von monoklonalen Gammopathien zu Proteinthesaurosen vom Immunglobulin-Typ

Die Ablagerung von Immunglobulinen und -fragmenten stellt zunächst lediglich eines unter vielen möglichen Symptomen einer monoklonalen Gammopathie dar. Dieses Symptom kann jedoch rasch zu einem eigenständigen, aggressiven Krankheitsbild mutieren, insbesondere wenn die Auswirkungen der pathologischen Proteinspeicherung über die übrigen Symptome der monoklonalen Gammopathie dominieren.

Deutlich wird dies am Beispiel einer Amyloidose auf der Basis einer MGUS: Die MGUS ist definiert durch das Vorhandensein eines Paraproteins in geringer Konzentration bei sonst (auf Dauer) fehlenden Krankheitszeichen. Auch wenn die MGUS den Organismus sonst in keiner Weise beeinträchtigt, reicht die Ablagerung eines Paraproteins aus, um den Körper so zu schädigen, dass nun die Amyloidose zum lebenslimitierenden Faktor der an sich benignen Krankheit MGUS wird. Nicht selten wird eine monoklonale Gammopathie erst aufgrund einer manifesten Amyloidose entdeckt. Zu fordern ist aber gerade die frühzeitige Diagnosestellung, denn nur dann kann eine Organdestruktion durch unverzügliche adäquate Intervention bestmöglich verhindert werden.

Die erwähnten unstrukturierten Proteinthesaurosen LCDD und HCDD werden seltener gefunden, können auf befallene Organe aber prinzipiell ähnlich deletäre Auswirkungen zeigen wie die Amyloidosen (LIE et al. 2001).

Als relativ benigne sind lokalisierte Proteindeposits wie z.B. „Amyloidome“ im Rahmen solitärer Plasmozytome einzustufen, wenn sie chirurgisch leicht zugänglich liegen. Sie sind durch Exzision heilbar. Intrakranielle Amyloidome, auch wenn singulär und lokalisiert, werden oft verkannt und zeigen nicht selten den Verlauf einer ungewöhnlichen Multiplen Sklerose (LINKE et al. 1992).

2.2 AL-Amyloidosen

2.2.1 Epidemiologie

Während die AH-Amyloidosen eine Seltenheit darstellen mit nur wenig beschriebenen Fällen in der Weltliteratur (EULITZ et al. 1990, PASCALI 1995), ist die Leichtkettenamyloidose (AL) mit 85% (KYLE 1995) in den entwickelten Ländern die häufigste zu Lebzeiten des Patienten diagnostizierte systemische Amyloidose. Die Inzidenz der AL-Amyloidosen liegt in den USA bei jährlich 3000 Fällen (GERTZ et al. 1999) bzw. 10 Fällen pro 1 Million Einwohner (KYLE et al. 1992). Dabei liegt in 100% die monoklonale Expansion von Plasmazellen ursächlich zugrunde, die sich in > 80% durch ein monoklonales Protein in der Serum- (49%) oder

Urinelektrophorese (35%) nachweisen lässt (KYLE und BAYRD 1975), wohingegen nur 10-15% der Patienten mit monoklonaler Gammopathie eine Amyloidose entwickeln (GLENNER 1980, KYLE und GERTZ 1990, PASCALI 1995). Das Verhältnis von κ zu λ -Expression ist im menschlichen Serum wie auch beim Multiplen Myelom normalerweise ca. 2:1. Dagegen ist das Verhältnis bei den AL-Amyloidosen umgekehrt, nämlich über 1:2 (bis 1:10), was auf eine stärkere Amyloidogenität der λ -Kette hindeutet (GLENNER 1980, KYLE und GERTZ 1995).

2.2.2 Klinik

Die Klinik der AL-Amyloidosen ergibt sich aus dem Zusammenspiel von Symptomen, die durch die zugrundeliegende monoklonale Gammopathie bedingt sind (I.2.1), und von Symptomen, die aus der fibrillären Ablagerung von Immunglobulinteilen, z.B. in lebenswichtigen Organen, resultieren. Es ist ein lokalisierter, organlimitierter oder systemischer Befall möglich (Tabelle I-12).

a systemisch, alle Organe	h auf Lymphknoten beschränkt
a` systemisch, hauptsächlich kardial	i retroperitoneale Amyloidmasse
a`` systemisch, hauptsächlich hepatisch	k lokale Amyloidome
b systemisch nodulär	l ureterales Amyloid
c Stimmband, nodulär	m ureteral, Harnblase
d pharyngo-tracheal	n Harnblase
e tracheo-bronchial	o auf die Haut beschränkt, diffus, nodulär
f pulmonal, diffus	p Gehirnamyloidome, nodulär, multipel, vaskulär
g pulmonal, nodulär	

Tabelle I-12: Beispiele für AL-Amyloid-Krankheitsbilder nach LINKE 1996

KYLE und GERTZ untersuchten 1995 ein Patientenkollektiv von 474 an AL erkrankten Patienten und fanden in 49% einen Gamma-Spike in der Serumelektrophorese, in 20% eine Hypogammaglobulinämie, in ca. 90% gelang der Nachweis eines monoklonalen Proteins in Serum oder Urin.

Folgende kardiologische Befunde wurden erhoben: Herzinsuffizienz (25%), Niedervoltage, Vorhofflimmern, Blockbilder, abnormales Herzecho (2/3) mit Pseudohypertrophie von rechter und linker Herzkammer, Septumverdickung, abnormale Myokardtextur („granular

sparkling“), Klappenverdickung und Klappeninsuffizienz, Vorhofvergrößerung, Perikarderguß, in frühen Fällen abnormale Relaxation, später restriktive Hämodynamik, zuletzt systolisches Kammerversagen.

Mindestens 50% der Patienten mit systemischer AL-Amyloidose sterben an Herzinsuffizienz und/oder Arrhythmien. Etwa 1/3 der Patienten weist bei Diagnosestellung bereits eine Nierenbeteiligung auf. Bei ca. 10% der Patienten liegt eine periphere sensomotorische Neuropathie vor.

Eine Zusammenschau aller in der Literatur beschriebenen Symptome und Befunde, die mit AL-Amyloidosen assoziierten sind, zeigt Tabelle I-13.

Müdigkeit, Schwächegefühl	kardiale Funktionsstörungen	Leistungsminderung
starker Gewichtsverlust	Koronarinsuffizienz, Herzinfarkt	Lymphknotenvergrößerung
Pseudohypertrophie von Muskeln und Gelenken	Brüchigkeit parenchymatöser Organe (Cave Biopsie!)	eingeschränkte Nierenfunktion (50%) Nephrose, Nierenversagen
Orthostatische Beschwerden	Stiff-heart-Syndrom	Gelenkbeschwerden mit Knotenbildung
Makroglossie (10%)	Digitalisüberempfindlichkeit	Amyloidome (Haut, Knochen, Gehirn)
restriktive Kardiomyopathie	Blutungsneigung	Knochendefekte, Wirbelbruch
Schwindel, Synkopen	Hämoptyse, Hämaturie	Carpaltunnelsyndrom
Dysphagie	Stauungsleber	Ureter-/Urethrastranose
Diarrhoe und Obstipation	Hepatomegalie (25%)	Dyspnoe, Stridor
Steatorrhoe	Ikterus	heisere, rauhe Stimme
Ileus	Herzrhythmusstörungen	Tracheal-, Bronchialstenosen
hypertrophe Kardiomyopathie	Polyneuropathie	Lungenrundherde
Kardiomegalie	Sicca-, Sjögren-Syndrom	B-Zell-Neoplasien
Niedervoltage	Proteinurie	Splenomegalie (5%)
Herzklappeninsuffizienz	große Nieren, Schrumpfnieren	Thrombozytose (10%)

Tabelle I-13: Symptome bei AL-Amyloidose, modifiziert nach LINKE 1998 und KYLE und GERTZ 1995. Die häufigsten klinischen Befunde und Symptome sind fett gedruckt.

Alle genannten Befunde und Symptome können jeweils isoliert oder in allen denkbaren Kombinationen auftreten. Entsprechend mannigfaltig sind die klinischen Erscheinungsbilder einer AL/AH-Amyloidose.

2.2.3 Diagnostik

Die Säulen der Amyloiddiagnostik und -klassifikation wurden bereits beschrieben (I.1.3.3), nähere Erläuterungen zum praktischen Vorgehen finden sich im Methodenteil.

Wurde eine AL-Amyloidose nachgewiesen, muss sich eine umfassende Diagnostik zur Charakterisierung des zugrundeliegenden monoklonalen Plasmazellklons (lokalisiert - systemisch, MGUS oder MM) unmittelbar anschließen, um unverzüglich eine adäquate Therapie einleiten zu können.

Basisdiagnostik bei Verdacht auf monoklonale Gammopathie

- Labor: BSG, komplettes BB mit Differential-BB, Serumelektrophorese, Immunelektrophorese von Serum und Urin, Immunglobuline quantitativ i.S., β_2 M i.S., CRP, Kreatinin, Kalzium
- Bildgebung: Röntgenübersicht von Schädel, Wirbelsäule, Becken und proximale Extremitäten, MRT der gesamten Wirbelsäule
- Knochenmarksbiopsie und Aspiration mit Plasmazell-Labeling-Index

Tabelle I-14: Basisdiagnostik bei Verdacht auf monoklonale Gammopathie

Umgekehrt müssen auch bei diagnostizierter monoklonaler Gammopathie initial und in regelmäßigen Abständen Routineuntersuchungen durchgeführt werden, um eine Amyloidose und daraus resultierende Funktionseinschränkungen lebenswichtiger Organe nicht zu übersehen. Dazu gehören die Sonographie von Leber, Milz, Nieren (Größe, Kontur, Binnenstruktur), Herz-Echo (Größe, Struktur, Pumpfunktion), EKG, Lungenfunktion, neurologischer Status, sowie Blut- und Urinuntersuchungen, um nur die wichtigsten zu nennen (KYLE und GERTZ 1995). Bei begründetem Verdacht sollte umgehend eine Gewebebiopsie zur histopathologischen Untersuchung entnommen werden. Zeigt sich Amyloid, ist stets auch die immunchemische Klassifizierung zu fordern: Denn ein Multiples Myelom schließt das Vorliegen einer AA-Amyloidose oder einer β_2 M-Amyloidose nicht aus und erfordert dann ein völlig anderes therapeutisches Vorgehen. Gelegentlich liegt eine Doppel- oder Mehrfach-Amyloidose vor (ROCKEN et al. 1993, WESTERMARK et al. 1976).

2.2.4 Therapie

Die Therapie der systemischen AH/AL-Amyloidose entspricht im Wesentlichen der des Multiplen Myeloms und ist auf die Eliminierung des Plasmazellklons gerichtet. Zum Einsatz kommen dabei:

- Chemotherapie (Melphalan + Prednison oder Vincristin, Adriablastin, Dexamethason) (GERTZ et al. 1999)
- Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan (HDM) mit nachfolgender autologer oder allogener Stammzelltransplantation (SCT) (COMENZO et al. 1998, SANCHORAWALA et al. 2001)
- VAD (Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) + HDM + ASCT (autologe Stammzelltransplantation) (VAN GAMEREN II et al. 2002)
- additiv Substanzen, die Wachstumsfaktoren des Multiplen Myeloms (v.a. IL-6) in ihrer Aktivität hemmen sollen: Bisphosphonate, $IFN\alpha$, experimentell Anti-IL-6-Antikörper, Anti-IL-6-R-AK, rekombinante Proteine aus IL-6 und Bakterientoxinen (TUMORZENTRUM MÜNCHEN 1998)

- Supportiv wird die hämatopoetische Insuffizienz mit G-CSF und Erythropoetin behandelt, Osteolysen mit Bisphosphonaten, Radiatio sowie chirurgischer Therapie, eine Niereninsuffizienz mit Dialyse (TUMORZENTRUM MÜNCHEN 1998)
- Ferner ist die ausreichende Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenschema zentral (TUMORZENTRUM MÜNCHEN 1998).

Die durch Amyloidablagerungen kompromittierte Funktion betroffener Organe kann, da bislang keine kausale Therapie (zur Auflösung der Amyloidablagerungen) verfügbar ist, ebenfalls nur symptomatisch behandelt werden. Dazu kommen Medikamente (z.B. zur Therapie der Herzinsuffizienz) sowie die Organersatztherapie in Frage (z.B. Dialyse).

Die einzig quasi kausale Therapie in Bezug auf die Amyloiddeposits (nicht in Bezug auf ihr Vorläuferprotein) stellt die Organtransplantation dar, die allerdings nur bei gutem Allgemeinzustand des Patienten und guter Prognose des Grundleidens (z.B. MGUS, SM, MM Stadium I) erfolgversprechend ist (ALLONI et al. 2004) bzw. gegebenenfalls durch eine Stammzelltransplantation ergänzt werden muss (KUMAR et al. 2002).

Bei streng lokalisierten Amyloidablagerungen („Amyloidome“) ist die chirurgische Resektion Therapie der Wahl und führt, sofern das zugrundeliegende solitäre Plasmozytom vollständig entfernt werden kann, zur dauerhaften Heilung.

2.2.5 Prognose

Abgesehen von den lokalisierten Formen ist die Prognose der AL-Amyloidose schlecht, so dass ohne Therapie die Patienten mit schwerer Herzbeteiligung und Polyneuropathie durchschnittlich 7 Monate, mit Therapie 13-18 Monate (KYLE et al. 1999) überleben. Jedoch wurden bei benignem Verlauf auch Einzelfälle mit Überlebenszeiten von über 10 Jahren berichtet (KYLE et al. 1999), wobei insbesondere die fehlende Herzbeteiligung, daneben auch jüngeres Alter, Kreatinin < 2 mg/dl, Plasmazellanteil im Knochenmark < 20%, und fehlende Polyneuropathie die Prognose verbessern (GERTZ et al. 1999). Eine autologe Stammzelltransplantation kann in etwa 80% der Fälle die Überlebenszeit verlängern. Voraussetzung dafür ist das Erreichen einer Remission (COMENZO et al. 1998, COMENZO und GERTZ 2002, DISPENZIERI et al. 2004, GONO et al. 2004, PERZ et al. 2004).

3. Biochemische Grundlagen zur Entstehung von AL-Amyloidosen

JANEWAY und TRAVERS 1997, ROITT 1993

Bei den AL-Amyloidosen werden monoklonale Immunglobulin-Leichtketten und deren Fragmente in Amyloid-Konformation abgelagert. Die Aminosäuresequenz der thesaurierten Leichtkette ist dabei interindividuell höchst variabel. Um diese Besonderheit verstehen zu können, ist es notwendig, sich mit dem einzigartigen Aufbau, der komplizierten Synthese und Reifung der Antikörpermoleküle vertraut zu machen.

3.1 Immunabwehr

Traditionell unterscheidet man eine unspezifische (angeborene) von einer spezifischen (erworbenen) Immunabwehr, eine zelluläre von einer humoralen (Tabelle I-15).

	Zelluläre Immunabwehr	Humorale Immunabwehr
Unspezifische Immunabwehr	Phagozyten, natürliche Killerzellen	Lysozym, Defensine, Komplementsystem
Spezifische Immunabwehr	Lymphozyten	Immunglobuline

Tabelle I-15: Arten der Immunabwehr

Während die unspezifische Immunabwehr lebenslang unverändert zur Verfügung steht, zeichnet sich die spezifische Immunabwehr durch die Fähigkeit der „Erinnerung“ und „Adaptation“ an wiederholt präsentierte Antigene aus. Grundlage dafür ist die Antigen-induzierte, klonale Selektion von Lymphozyten, deren Rezeptoren Antigene besonders affin binden, sowie von Immunglobulin-produzierenden Zellen, deren Antikörper sich als besonders affin dem Antigen gegenüber erweisen. Das spezifische Immunsystem, das genetisch durch eine Art Lotterie (s.u.) angelegt ist, wird sozusagen durch den Kontakt mit Antigenen erst in Funktion gesetzt. Spezifische und unspezifische Abwehr greifen synergistisch ineinander, z.B. indem Antikörper-markierte Bakterien durch Komplementaktivierung lysiert oder von Phagozyten beseitigt werden. Die große Bedeutung der spezifischen Immunabwehr im Kampf gegen die schnell adaptierenden Mikroorganismen wird besonders an Personen mit Antikörpermangelsyndromen wie der X-chromosomal erblichen BRUTON` Agammaglobulinämie deutlich: Sie sind anfälliger für Infekte und ihre Lebenserwartung ist vermindert.

3.2 Die 5 Immunglobulinklassen

Der Mensch besitzt 5 Immunglobulinklassen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), die z.T. in mehrere Subgruppen unterteilt werden und sich strukturell und funktionell unterscheiden.

Gemeinsam ist allen Immunglobulinen, dass sie aus je zwei sogenannten leichten und zwei schweren Polypeptidketten bestehen, welche nach getrennter Transkription und Translation im rauen Endoplasmatischen Retikulum zusammengeführt werden. Die beiden leichten Ketten sind innerhalb eines Antikörpers jeweils identisch wie auch die schweren Ketten.

3.2.1 Schwere Kette

Alle schweren Ketten sind auf Chromosom 14 codiert und aus einer C-terminalen konstanten (C) und einer N-terminalen variablen (V) Region zusammengesetzt.

Für die konstante Region gibt es 5 Isotypen (γ , α , μ , δ , ϵ mit jeweils mehreren Subgruppen), wobei der Isotyp der konstanten Region der schweren Kette zugleich die Zugehörigkeit eines Antikörpers zu einer der 5 Immunglobulinklassen festlegt. Die konstante Region umfasst für die Isotypen γ , α und δ drei, für die Isotypen μ und ϵ vier konstante Domänen. Die Domänen haben ein Molekulargewicht von je ca. 12.5 kD und werden mit CH₁, CH₂, CH₃, (CH₄) bezeichnet.

Die variable Region besteht unabhängig vom Isotyp der konstanten Region immer nur aus einer Domäne (VH), ebenfalls mit einem Molekulargewicht von 12.5 kD, so dass sich für die gesamte schwere Kette je nach Isotyp ein Molekulargewicht von 50 - 70 kD ergibt.

3.2.2 Leichte Kette

Bei den leichten Ketten unterscheidet man 2 Isotypen (ebenfalls in Subgruppen unterteilt, dazu später), nämlich Lambda-Ketten (codiert auf Chromosom 22) und Kappa-Ketten (Chromosom 2). Beide bestehen aus 2 Domänen von je 12.5 kD, nämlich einer N-terminalen variablen Region VL _{κ} bzw. VL _{λ} , und einer C-terminalen konstanten Region CL _{κ} bzw. CL _{λ} .

3.2.3 Antikörper-Aufbau

In einem Antikörpermolekül sind je eine leichte (L) und eine schwere Kette (H) durch eine Disulfidbrücke (S-S) zwischen der CL- und CH₁-Domäne verbunden, die beiden schweren Ketten über mehrere Disulfidbrücken vor allem im Bereich Gelenk-Region („*hinge*“) zwischen CH₁ und CH₂. Zusätzlich gibt es noch innerhalb jeder einzelnen Domäne eine Disulfidbrücke (hier nicht dargestellt) und zahlreiche nicht kovalente Wechselwirkungen

zwischen den benachbarten Domänen VL-VH, CL-CH₁, CH₂-CH₂ und CH₃-CH₃. Die Abbildung I-3 zeigt schematisch den Aufbau eines Immunglobulins der Klasse IgG.

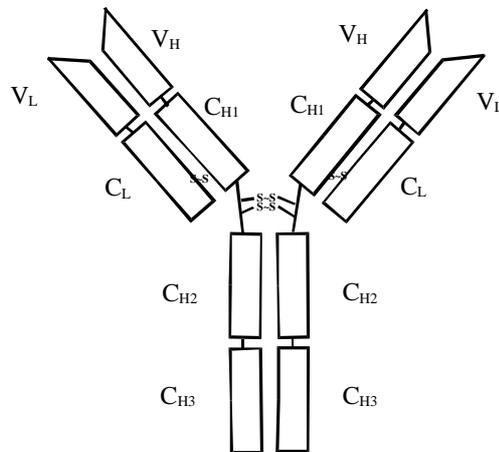


Abbildung I-3: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (IgG)

Der Antigen-bindende Abschnitt wird von den variablen Regionen (VH und VL) der leichten und schweren Kette gemeinsam gebildet, die Domänen CH₂ und CH₃ der konstanten Region sind für die Mobilisierung der Abwehr (Komplementaktivierung, Bindung an F_C-Rezeptoren von Abwehrzellen, Lektinbindung) zuständig.

Alle Immunglobuline werden von der B-Zell-Reihe, vor allem aber von Plasmazellen produziert, wobei alle von einer Plasmazelle zu einem Zeitpunkt hergestellten Immunglobuline eine identische Aminosäuresequenz haben. Allerdings können sie sich in Zuckerstrukturen, die sich hauptsächlich im Bereich der Domänen CH₂-CH₃ befinden, unterscheiden. Ausnahmsweise kann während der Plasmazellreifung manchmal eine vorübergehende Koexpression von IgD und IgM, aber auch von IgM und IgG, IgA oder IgE als Zwischenstadium beobachtet werden. Dies ist möglicherweise auf noch vorhandene IgM-RNA beim *switch* zu einer anderen Immunglobulinklasse zurückzuführen. Ähnliche Durchgangszustände können bei der monoklonalen Gammopathie auch „eingefroren“ werden (bzw. treten auf, wenn ein Teil des Klons den *switch* vollzieht, der andere nicht) und erscheinen dann beim Multiplen Myelom als biklonale Paraproteinämie.

Im zeitlichen Verlauf der Immunantwort kann ein Wechsel der Antikörperklasse (vom initialen μ oder δ zu γ , α oder ϵ) erfolgen, indem die konstante Region der schweren Kette ausgetauscht wird. Die variable Region der schweren Kette persistiert dabei wie auch die gesamte Leichtkette, so dass die Spezifität der von einer Plasmazelle produzierten Antikörper beim *class-switch* erhalten bleibt. Diese Antigen-Spezifität kann sich lediglich noch im

Rahmen der sogenannten „somatischen Hypermutation“, die durch Antigenkontakt zur „Affinitätsreifung“ führt, geringfügig verbessern, vgl. I.3.3.3.

Während IgG-Moleküle als Prototypen der Immunglobuline monomer vorliegen, bilden IgM-Moleküle neben monomeren beim Menschen vor allem pentamere Strukturen mit Dekavalenzen aus und IgA-Moleküle auch Dimere mit Tetravalenzen. IgE und IgM-Moleküle besitzen im Gegensatz zu allen anderen Immunglobulinen keine „hinge“-Region (die nichts anderes als eine kollabierte CH₂-Domäne darstellt).

Tabelle I-16 gibt einen Überblick über die 5 Antikörperklassen:

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Domänen/schwere Kette	4	4	5	4	5
MW	150 kD	160 />320 kD	160/900 kD	185 kD	200 kD
schwere Ketten	γ	α	μ	δ	ε
leichte Ketten	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ
Zahl der Valenzen = Ag-Bindungsstellen	2	2/4	2/10	2	2
Aufgabe	Sekundäre Immunantwort, Bekämpfung von Antigenen in Plasma und Gewebe, gut plazentagängig	Sekretorisch an Körperoberfläche und Schleimhäuten, aktiver transepithelialer Transport	Primäre Immunantwort, v.a. intravasal wirksam, Komplementaktivierung	Primäre Immunantwort, spezielle Funktion in der Lymphozytenentwicklung	Anaphylaxie, Parasitenbekämpfung im körperoberflächennahen Bindegewebe, v.a. zellständig auf Mastzellen
Serumspiegel	8 - 16 mg/ml	1,4 - 4 mg /ml	0,5 - 2 mg/ml	0 - 0,4 mg/ml	0,000017 – 0,000450 mg/ml
Halbwertszeit	ca. 3 Wochen	6 Tage	5 Tage	?	2 Tage

Tabelle I-16: Charakteristika und Funktionen der Antikörperklassen (aus ROITT 1993).

Die Antikörper sind als Mitglieder der großen „Immunglobulin-Superfamilie“ zu sehen, zu der u.a. auch T-Zell-Rezeptoren, HLA I-, HLA II-Moleküle, β₂M, LFA-3, FC-Rezeptoren, der Poly-Immunglobulinrezeptor, CD4, CD8, N-CAM, Myelin-assoziiertes Antigen und CEA gehören. Ihnen allen gemeinsam ist der Besitz von einer oder mehreren Immunglobulin-Domänen, die sich phylogenetisch auf ein gemeinsames Urgen zurückführen lassen.

3.3 Erzeugung der Antikörpervielfalt

Früher wurde von vielen Immunologen die Ansicht vertreten, jedes Immunglobulin wäre (wie die meisten anderen Proteine auch) durch ein eigenes Gen codiert (Keimbahn-Theorie). Aufgrund der Antikörpervielfalt (die Summe aller Antikörper besitzt für nahezu jedes Epitop - auch für in der Natur gar nicht vorgesehene Epitope - das passende Paratop), monoklonalen

Fehlbildungen beim multiplen Myelom und späteren Untersuchungen auf DNA-Ebene erkannte man jedoch, dass nur die Rekombination hintereinanderliegender Gensegmente sowie weitere Diversifikationschritte einen derartigen Reichtum an unterschiedlichen Immunglobulinen bei gleichzeitig platzsparender DNA-Ausnutzung hervorbringen können.

3.3.1 Rekombinatorische Vielfalt

Der Immunglobulin-codierende Bereich umfasst auf Genebene einen für die λ -Kette 1050 kb, für die κ -Kette 1820 kb und für die schwere Kette 1250 kb großen Bereich auf den Chromosomen 22q11.2, 2p12 und 14q32.3, in dem Gene für die einzelnen Segmente der variablen Region sowie für die Isotypen der konstanten Region in Clustern hintereinandergeschaltet sind:

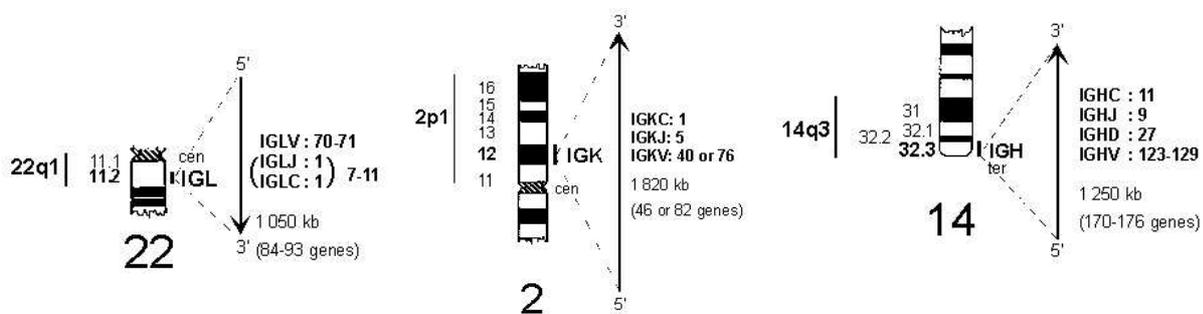


Abbildung I-4: Chromosomale Lokalisation der λ , κ und H-Gene. Angegeben ist daneben die Summe aus funktionellen und nicht funktionellen Gensegmenten (aus LEFRANC 2000).

Wie man sich die Anordnung der Gensegmente innerhalb der chromosomalen Loci vorzustellen hat, zeigt schematisch Abbildung I-5:

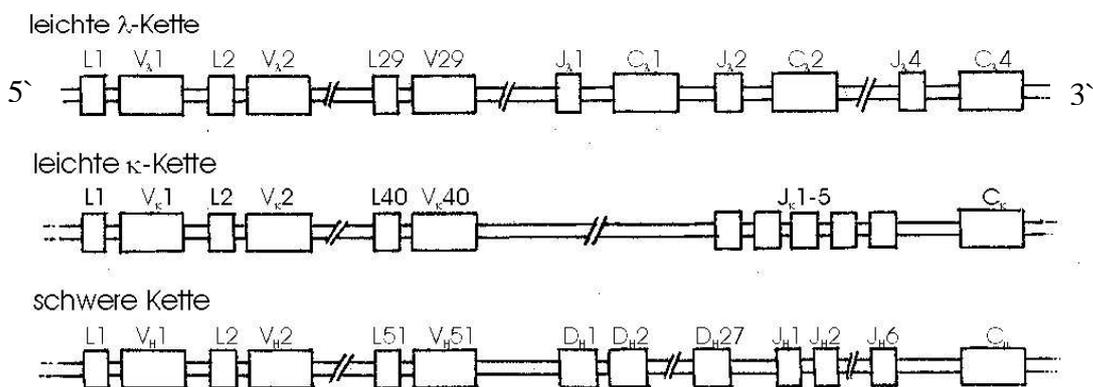


Abbildung I-5: Gensegmente der leichten (lambda und kappa) und schweren Immunglobulinketten: L= Leader-Sequenz, V = V(ariablen)-Segment der variablen Region, J = J(oining) Segment der variablen Region, D = D(iversity)-Segment der Variablen Region, C = konstante Region (nach JANEWAY 1997)

Die genaue Kartierung am Beispiel der Kappa-Kette sieht folgendermaßen aus:

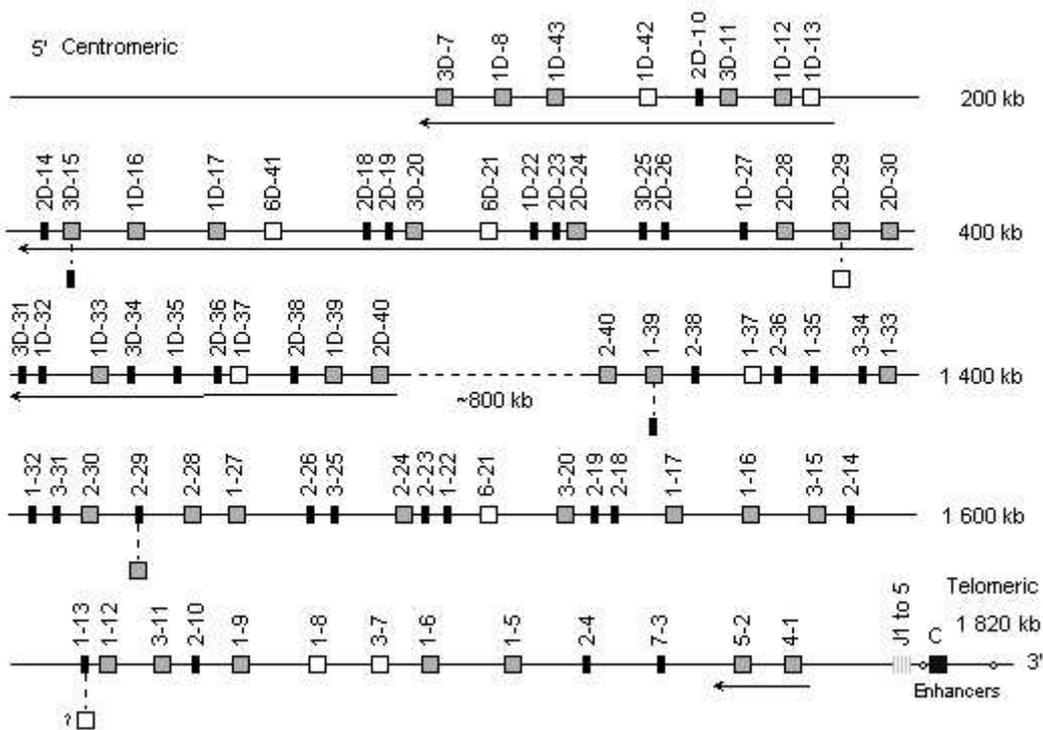


Abbildung I-6: Anordnung der etwa 40 V-Gensegmente der Kappa-Leichtkette auf Chromosom 2. Weiße Quadrate: V-Gensegmente mit offenem Leserahmen. Graue Quadrate: funktionelle V-Gensegmente. Schwarze Balken: Pseudogene. Längsgestreiftes Quadrat: J-Gensegmente 1-5. Schwarzes Quadrat: C-Region (aus LEFRANC 2000).

Während der Entwicklung einer undifferenzierten B-Zelle zur Plasmazelle (nicht bei anderen Körperzellen) werden die 2 (V-J bei den leichten Ketten) bzw. 3 (V-J-D bei den schweren Ketten) Gensegmente der variablen Region irreversibel miteinander rekombiniert zum eigentlichen Gen der variablen Region, das dann (durch Spleißen des primären RNA-Transkriptes) wiederum mit einem der Gene für die konstante Region verknüpft wird.

Für die Leichtkette verdeutlicht den Vorgang der Rekombination, Transkription und Translation bis zum fertigen Protein Abbildung I-7:

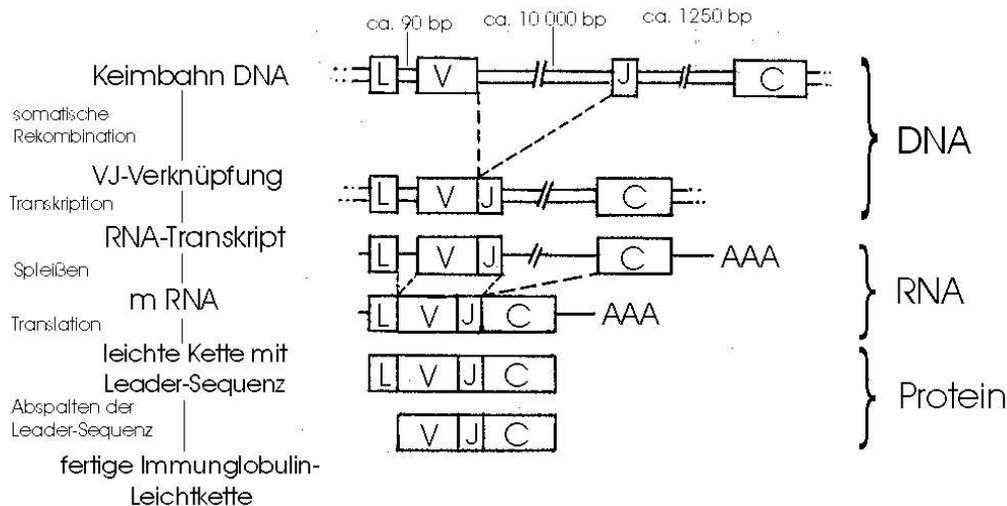


Abbildung I-7: Modifiziert nach JANEWAY 1997: Rekombination der leichten Kette. L = Leader-Sequenz (sorgt für die Einschleusung des translatierten Polypeptids in das exkretorische Zellkompartiment und wird dann abgespalten), V = Variable-Segment der variablen Region, J = Joining-Segment der variablen Region, C = konstante Region, AAA = Poly-A-Schwanz der transskribierten RNA, bp = Basenpaar(e)

Dabei können beim Menschen bei der Lambda-Leichtkette auf Genebene ca. 29 funktionsfähige V-Segmente (V1-V29) mit 4 J-Segmenten (J1-J4) und 4 C-Regionen (C1-C4) kombiniert werden (wobei jedoch J1 mit C1, J2 mit C2 usw. gekoppelt ist, so dass zwischen J und C keine unabhängige Rekombination möglich ist), bei der Kappa-Leichtkette können ca. 40 funktionsfähige V-Segmente mit 5 J-Segmenten und einer C-Region kombiniert werden. Für die schweren Ketten gibt es 51 funktionsfähige V-Segmente, zusätzlich 27 D („diversity“-) Segmente und 6 J-Segmente, die untereinander und mit den 5 konstanten Regionen variabel verbunden werden können. Tabelle I-17 zeigt die Rekombinationsmöglichkeiten für die variablen Regionen der leichten und schweren Kette.

	kappa	lambda	schwere Kette
V	40	29	51
D	---	---	27
J	5	4	6

Tabelle I-17: Funktionelle Gensegmente der variablen Regionen

Theoretisch gäbe es folglich $[(40 \times 5) + (29 \times 4)] \times (51 \times 27 \times 6) = 2.6 \times 10^6$ verschiedene Möglichkeiten, die Gensegmente der variablen Immunglobulinregionen miteinander zu kombinieren und so 2.6×10^6 verschiedene Antigen-bindende Regionen zu schaffen.

Auffallend hierbei ist, dass für die Lambda-Leichtkette jede der 4 J-Regionen direkt mit einer C-Region gekoppelt ist. Dagegen liegen bei der Kappa-Leichtkette und der schweren Kette die jeweiligen J-Regionen zusammen in einem Cluster. Dies gilt auch für die D-Regionen der schweren Kette. Sie können somit unabhängig von der konstanten Region rekombiniert werden. Für die Kappa-Leichtkette existiert nur eine einzige C-Region, während es bei der schweren Kette 5 Klassen gibt mit einer größeren Anzahl von Isotypen und zahlreichen allophen Markern, die jede eine andere schwere Kette darstellen und geordnet codiert sind.

3.3.2 Ungenaue Verknüpfung

Neben der rekombinatorischen Vielfalt kann die Antikörpervielfalt zusätzlich durch die (gewollt) ungenaue Verknüpfung der V, D und J-Segmente auf DNA-Ebene gesteigert werden. Dabei kann es zu Insertionen oder Deletionen bis hin zum Verlust einer Reihe von Basenpaaren an der Verknüpfungsstelle kommen.

3.3.3 Somatische Hypermutation

Während die FR („*framework*“-Regionen) eine gewisse Konstanz innerhalb der variablen Region aufweisen, sind die CDRs („*complementarity determining*“-Regionen) durch eine besonders hohe Rate von Aminosäureaustauschen gekennzeichnet (Abbildung I-10), was sich folgendermaßen erklären lässt: Die CDRs der leichten und schweren Kette bilden zusammen die Antigenbindungsstelle. Im Rahmen der Evolution hatten die Organismen einen Überlebensvorteil, deren Immunglobuline sich optimal an antigene Epitope von Eindringlingen anpassen konnten. Diese Anpassung wird ermöglicht, indem es im Bereich der variablen Regionen (jedoch nicht der konstanten Regionen!) beider Ketten zur „somatischen Hypermutation“ mit anschließender Selektion der am besten passenden Antikörper (die anderen werden eliminiert durch fehlende Stimulation) oder „Affinitätsreifung“ kommt, d.h. bei jeder Zellteilung einer aktivierten Plasmazelle passiert ein (einziger) Lesefehler pro 1000 bp (statt üblich pro 10^{10} bp). Diese über das 10-Millionen-fache erhöhte Mutationsrate ist (aus noch nicht geklärten Gründen) streng auf die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette beschränkt. Auf Proteinebene führt dies durchschnittlich zu einem Aminosäureaustausch in der variablen Region pro 2 Zellteilungen, wobei insbesondere Austausche in den CDRs die Spezifität des Antikörpers stärker verändern als in den FR (wodurch v.a. eine „Feinanpassung“ durch kleine Änderungen der Stellung der CDRs zueinander erfolgt). Nur ein Bruchteil dieser Austausche steigert auch die Affinität des Immunglobulins zum Antigen. Gerade Plasmazellklone mit optimalen Austauschen vor allem

in den CDRs aber werden im Verlauf der Antigen-induzierten Expansion des Immunglobulin-produzierenden Zellklons durch das Antigen selektiert und zur Proliferation angeregt, so dass in den CDRs eine im Vergleich zur restlichen variablen Region überdurchschnittlich hohe Variabilität gefunden wird.

3.3.4 Pathologische Zustände

Nicht immer produziert eine Plasmazelle funktionsfähige Immunglobuline. Fehlgefaltete leichte und schwere Ketten werden, wie alle anderen fehlgefalteten Proteine, normalerweise nach Ubiquitinierung im Proteasom degradiert. B-Zellen ohne funktionsfähige Immunglobuline unterliegen nicht der Antigen-gesteuerten Selektion und Expansion und gehen zugrunde, unter Umständen durch einen aktiven Vorgang (Apoptose).

Selten kommt es jedoch vor, dass eine B-Zelle entartet, ungebremst proliferiert und der Klon unabhängig von antigenen Stimuli zufällig funktionsfähige Immunglobuline herstellt, die dann z.B. gegen körpereigene Strukturen gerichtet sein können (vgl. Kälte-/Wärmeautoantikörper) oder aber dass eine Plasmazelle, die bereits eine normale Affinitätsreifung hinter sich gebracht hat, sekundär neoplastisch entartet. Häufig werden von autonom proliferierenden Plasmazellen nur Teile von Immunglobulinen (z.B. nur leichte oder schwere Ketten) synthetisiert. Auch die biklonale Produktion von 2 Immunglobulinklassen beim selben Patienten wurde beschrieben (z.B. wenn ein Teil des Klons den *class-switch* vollzogen hat, der andere jedoch noch nicht). Sehr selten wurde auch die monoklonale Produktion von verkürzten schweren Ketten (nur aus V und C_x bestehend) beobachtet.

Wenn unvollständige Immunglobuline hergestellt werden, sind diese oft instabil und neigen, forciert durch ihr massenhaftes Auftreten, zu Oligomerisierung, Aggregation und Deposition (LCDD, HCDD, AL-/AH-Amyloidosen), die üblichen Abbaumechanismen sind dann überfordert. Die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine in den Deposits kann, besonders wenn sich diese über Jahre entwickelt haben, leicht variieren, da, wie im Abschnitt Affinitätsreifung besprochen, auch bei der pathologisch unkontrollierten Expansion eines Plasmazellklons noch eine somatische Hypermutation auftreten kann (SAHOTA et al. 1996).

3.4 Struktur der Kappa-Leichtkette

Da in dieser Arbeit die pathologische Ablagerung einer Kappa-Leichtkette im Mittelpunkt steht, soll, um das Verständnis für die Pathogenese dieser Erkrankung zu erleichtern, an dieser Stelle die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der Kappa-Leichtkette unter physiologischen Konditionen kurz dargestellt werden.

Wie bereits erwähnt, entsteht eine Kappa-Leichtkette durch Transkription und Translation eines Kappa-Ketten-Gens (bestehend aus einem Gen für die variable Region, einem Intron und einem Gen für die konstante Region) auf Chromosom 2, wobei das Gen für die variable Region erst durch die produktive Rekombination eines (von 40) V-Gensegmenten mit einem (von 5) J-Gensegmenten erfolgreich gebildet worden sein muss. Voraussetzung dafür ist, dass zuvor ein funktionsfähiges Gen für die schwere Kette rekombiniert wurde. Ist dann auch die Kappa-Leichtkette konformationsbedingt funktionsfähig und kann sich mit der schweren Kette verbinden, wird in das Gen für die Lambda-Leichtkette auf Chromosom 22 nicht mehr aktiviert (=Isotypenexklusion), wie auch die Leichtkettengene auf dem jeweils allelischen Chromosom (=allelische Exklusion). Kann auf Antriebe keine funktionsfähige Kappa-Leichtkette erzeugt werden, wird das Rearrangement für die Lambda-Leichtkette durchgeführt. Ist diese auch nicht funktionsfähig wird ebenso mit Kappa- und Lambda-Leichtketten auf dem jeweils anderen Chromosom verfahren. Es ergibt sich beim Mensch auf diese Weise insgesamt ein Verhältnis von $\kappa:\lambda = 2:1$ auf allen Antikörpern. Bei anderen Spezies ist dieses Verhältnis durchaus anders: 20:1 bei der Maus, 1:2 beim Rind.

Abhängig von den verwendeten V- und J-Segmenten und der Ungenauigkeit/Variabilität ihrer Verknüpfung besteht die variable Region einer Kappa-Leichtkette aus etwa 107-114 Aminosäuren. Entsprechend der Verwandtschaft der Aminosäuresequenzen der variablen Regionen untereinander kann man die Kappa-Leichtketten (trotz der großen Zahl an V-Genen) in nur 4 Subklassen unterteilen (manche Autoren unterscheiden auch 7 Subklassen, vgl. die Nummerierung in Abbildung I-6). Abbildung I-8 zeigt typische Beispiele der Subklassen 1-4.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
K1	sp P01593 KV1A_V-I	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTITQASQ	DINHYLNWYQQGPKKAPKILYDASNLET	GVPSRFRFGSGFGTDF	FTISGLQPEDIATYYCQ	QVDTLPRTFGGQTKLEIKR				
	sp P01598 KV1F_V-I	-----T-----R-----		S-TW-A-----K-G-----L-M-K-S-S-----I-S-E-L-S-D-F-----NSDSKM-----V-V-G							
	sp P01610 KV1R_V-I	-----R-----		G-RND-T-----K-GT--R-----G-TS-QS-----S-E-L-NS-----F-----L-SSF-W-----V-V							
K2	sp P01615 KV2B_V-II	-VV---LF-FVTL-EPAS-Q-RS-	SLVYRGGBT-E	L-K-GQS-EL--LS-YRDS	-D--D--S-----L-K-TRV-A--VGV--M-ATZS-Y-----Z-						
	sp P01616 KV2C_V-II	--VL---L--FVTP-EPAS-S-RS--	NLLZSBGB-D	LZK-GZS-ZL--LG-RAS	-N-----S--B--LK--RVZAZBVGV--M-ALQTPL--G--NV--						
K3	sp P01622 KV3D_V-III	E-VL---GT--L-P-E-A-LS-R---	SVS-SF-A	-K-GQ--RL--V--SRA-I-D-----S-----L--R-E--F-V-----GSS-S-----V-L-							
	sp P01623 KV3E_V-III	E-VL---GT--L-P-E-A-LS-R---	SVSSG-G	-K-GQ--RL--G--SRA-I-D-----S-----L--R-E--F-V-----GS-G-----V-V-							
K4	sp P01625 KV4A_V-IV	--V---D--AV-L-E-A--N-KS--SVLYSSNSKN-A	-A	-K-GQP-L--W--TR-S-D-----S-----L--S--A--V-V-----YST-YS-----							
	sp P06313 KV4B_V-IV	--V---D--AV-L-E-A--N-KS--SVLYSSNNKN-A	-A	-K-GQP-L--W--TR-S-D-----S-----L--S--A--V-V-----I P-----G--V--							
		FR 1 (1-23)	CDR 1 (24-34)	FR 2 (35-49)	CDR 2 (50-56)	FR 3 (57-88)	CDR 3 (89-97)	FR4 (98-107)			

Abbildung I-8: Aminosäuresequenzen von Kappa-Leichtketten unterschiedlicher Subgruppen. Gestrichelte Linien bezeichnen Identität mit der obersten Aminosäuresequenz, Buchstaben bezeichnen Austausch. Leerstellen bedeuten, dass hier keine Aminosäure vorhanden ist, d.h. eine Deletion / Insertion vorliegt. Die Sequenz geht also nahtlos mit der AS hinter der Leerstelle weiter. Man sieht, dass bei Kappa 2-4 Insertionen von variabler Länge zwischen der 27. und 28. Aminosäure (in Bezug auf die Kappa 1 Kette) vorhanden sein können. 1 = Aminoterminus, 108 = Carboxyterminus, an den sich unmittelbar die konstante Region (C_L) anschließt. Alle Sequenzen stammen aus der Internet-Datenbank: <http://www.expasy.ch/cgbi-bin/sprot-search-de>.

Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt von N-terminal fortlaufend, wobei man sich auf die κ 1-Kette mit 108 AS als Standard bezieht. Insertionen nach der 27. Aminosäure werden mit 27a, 27b,..., 27f (z.B. bei κ 2, κ 4) bezeichnet (ALIM et al. 1999), Insertionen nach der 95. Aminosäure (κ 1 MEV) mit 95a (EULITZ und LINKE 1982). Bei Deletionen lässt man eine Leerstelle an der entsprechenden Aminosäureposition. Der V-J-Übergang liegt (bei der hier diskutierten κ 1-Leichtkette) zwischen der Aminosäure 95 und 96, also im Bereich der CDR 3. Die konstante Region, für die es nur ein Gen gibt, besitzt stets 106 Aminosäuren, die, N-terminal beginnend, mit 109-214 nummeriert werden. Sie ist prinzipiell (sofern keine sekundären Mutationsereignisse stattgefunden haben) in allen Kappa-Leichtketten eines Individuums identisch. Jedoch wurden inter-individuelle Allotypen beschrieben, die sich an Position 153 und 191 unterscheiden mit Inv A = Leucin (L) an Pos. 191, Inv B = Valin (V) an Pos. 191 (HILSCHMANN und CRAIG 1965), bzw. Km^1 (153V/191L), $Km^{1,2}$ (153A/191L), Km^3 (153A/191V) (STEINBERG et al. 1974):

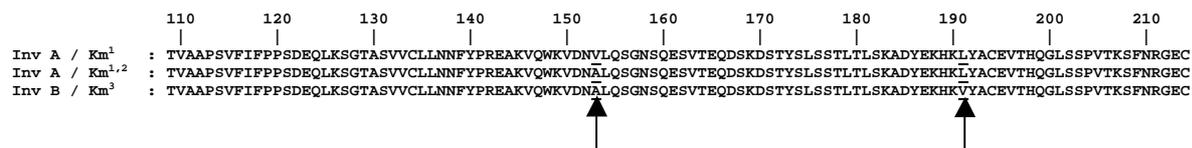


Abbildung I-9: Allotypen (Position 153 und Position 191) innerhalb der C-Region der κ -Kette

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von vielen verschiedenen menschlichen Kappa-Leichtketten bemerkte man (WU und KABAT 1970), dass es innerhalb der variablen Region Bereiche gibt, die eine besonders hohe Rate an Aminosäureaustauschen bezüglich der an dieser Stelle am häufigsten vorkommenden Aminosäure zeigen (HV = Hypervariable Bereiche). Der Grund dieser Hypervariabilität wurde bereits in I.3.3.3 („Somatische Hypermutation“) erklärt.

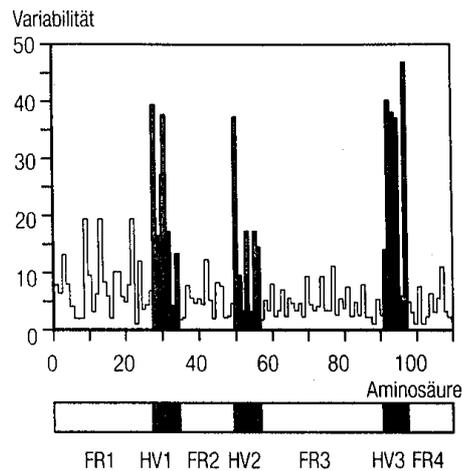


Abbildung I-10: Wu-Kabat-Plot: x-Achse: Aminosäureposition (1-108). y-Achse: Variabilität der Aminosäuren an einer Position: Zahl der Aminosäuren, die an dieser Position gefunden wurden / Häufigkeit der häufigsten AS an dieser Stelle. Beispiel: nur 1AS gefunden: $1/1=1$. Jede der 20 AS gleich häufig vertreten: $20/(1/20)= 400$. FR: Framework-Region. HV: Hypervariable Region (aus JANEWAY 1997)

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Antigen-Bindung werden sie auch als „Komplementaritätsbestimmende“ Regionen CDR1-3 bezeichnet, wohingegen die relativ invarianten Teile der V-Region mit „Gerüstregionen“ FR1-4 angesprochen werden (WU und KABAT 1970). Die Lage der CD-Regionen ist für jede beliebige leichte Kette wie folgt zu bestimmen (nach: [wysiwyg://bannerframe.81/http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs/](http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs/)):

- CDR1: Beginn: Ca. bei AS 24, davor ist immer ein Cys. Länge 10-17 AS. Dahinter ist immer ein Trp (typischerweise Trp-Tyr-Gln, aber auch Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu).
- CDR2: Beginn: Immer 16 AS nach dem Ende von CDR1, davor normalerweise Ile-Tyr, aber auch Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe. Länge immer 7 AS (außer bei einer Deletion z.B. bei NEW)
- CDR3: Beginn: Immer 33 AS nach dem Ende von CDR2 (außer bei einer Deletion z.B. bei NEW), davor immer ein Cys, danach immer Phe-Gly-XXX-Gly. Länge 7-11 AS.

Dies ergibt für die „normale“ κ_1 -Leichtkette in Übereinstimmung mit der Definition nach WU und KABAT (1970) folgende Positionen: CDR1: AS 24-34, CDR2: AS 50-56, CDR3: AS 89-97.

Zur Sekundärstruktur ist zu bemerken, dass die FR v.a. β -Faltblattstrukturen im Inneren der Region sowie die an die C-Region angrenzenden *Turns* ausbilden, die CDR dagegen *Turns* auf der der C-Region gegenüberliegenden Seite (Abbildung I-11).

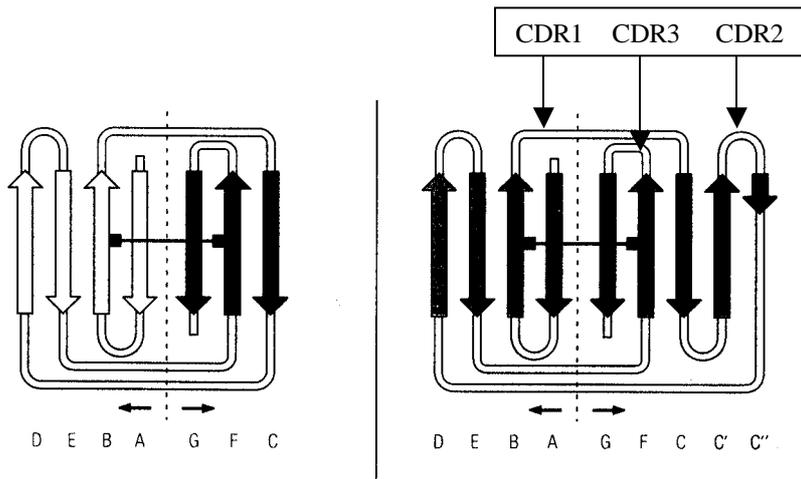


Abbildung I-11: 2-dimensionale schematische Struktur der Leichtkette: links die C-Region, rechts die V-Region. Die Pfeile sind von N- nach C-terminal gerichtet und symbolisieren β -Faltblattstrukturen, dazwischen liegen helikale Bereiche, die Turns verursachen. Die durch eine Linie verbundenen Quadrate symbolisieren eine Disulfidbrücke. Deutlich wird die gemeinsame Grundstruktur der V und der C-Region: lediglich C' und C'' ist bei der variablen Region zusätzlich vorhanden. Im Bild links sind zur Verdeutlichung die in der 3-dimensionalen Darstellung (vgl. Abbildung I-12) oben liegenden Stränge weiß dargestellt, die unten liegenden schwarz (modifiziert nach JANEWAY 1997).

Abbildung I-12 zeigt die 3D-Tertiärstruktur der leichten Kette, rechts die variable Region: Die CDR gelangen durch die dreidimensionale Faltung in räumliche Nachbarschaft und bilden gemeinsam sozusagen ein diskontinuierliches Paratop zur Antigenbindung aus (an dem im fertigen Antikörper auch die CDR der schweren Kette beteiligt sind). Die β -Stränge umfahren zusammen eine fassähnliche Struktur - auch β -barrel genannt, was hier gut im Bereich der C-Domäne (links) zu erkennen ist.

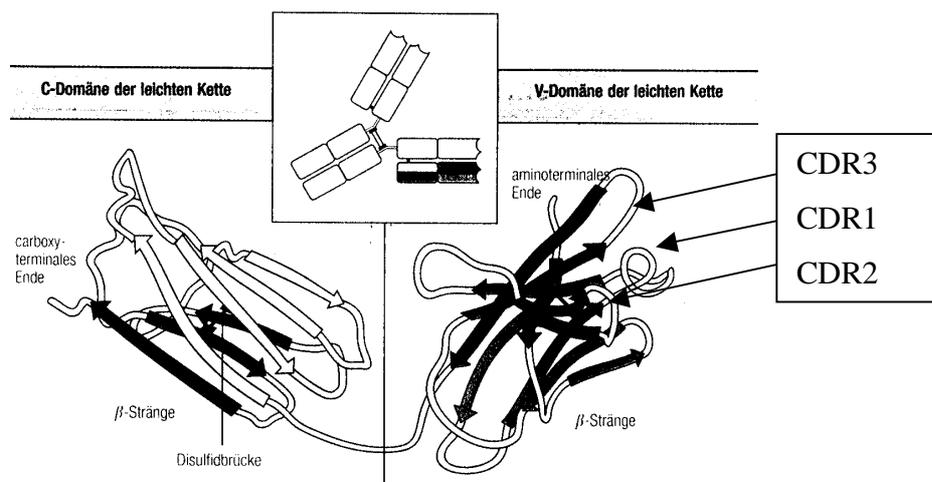


Abbildung I-12: Tertiärstruktur der leichten Kette (modifiziert nach JANEWAY 1997)

II. Zielsetzung

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, eine vom klinischen Erscheinungsbild her außergewöhnliche, auf das Subkutangewebe beschränkte (und damit organlimitierte) noduläre Amyloidose mit langem Überleben ohne wesentliche Progression oder Anhalt für systemische Organbeteiligung hinsichtlich des thesaurierten Proteins zu klassifizieren.

Die zunächst durch proteinchemische Methoden ermittelte Identität des thesaurierten Proteins sollte mit Hilfe eines neu zu schaffenden Antikörpers dann auch immunologisch bestätigt und weiter untersucht werden.

Das gegen das thesaurierte Protein erzeugte polyklonale Antiserum wurde anschließend hinsichtlich seiner Eignung als Standardreagenz zur Auffindung von AL κ -Amyloidosen im Routineeinsatz beurteilt.

Es ergab sich in Zusammenarbeit mit der Abteilung Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried die Möglichkeit, die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins AL κ (UNK), zu ermitteln. Diese wurde mit bereits bekannten Sequenzen amyloidogener und nicht amyloidogener Kappa-Leichtketten verglichen.

Die dabei gewonnen Ergebnisse gaben unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufes der betroffenen Patientin UNK, sowie in Zusammenschau mit bereits publizierten ähnlichen Fällen Anlass zur Diskussion über die Beziehung zwischen Protein-Primärstruktur, Amyloidogenität und Speichermuster (Organotropismus).

Schließlich werden mögliche Therapieansätze dieser ungewöhnlichen AL κ -Amyloidose angesprochen.

III. Fallbericht

Bei der 1941 geborenen Patientin (im Folgenden mit dem Akronym „UNK“ bezeichnet) waren seit 1994 langsam an Größe zunehmende, knotige Hauttumoren am ganzen Körper mit bevorzugter Lokalisation an den unteren Extremitäten aufgefallen. Die Knoten waren unter dem Hautniveau verschieblich, durchschnittlich 2 cm x 2 cm groß und nicht schmerzhaft. Ihr Auftreten erfolgte schubweise mit monatelangen freien Intervallen. Erwähnenswert ist eine 1/98 bei der Patientin diagnostizierte multiple Sklerose, die nach Angaben des betreuenden Neurologen retrospektiv für eine seit 1993 bestehende Symptomatik (Schwindel, Gangstörung) verantwortlich gemacht werden kann. Sonst war die Patientin völlig beschwerdefrei und empfand die Hautknoten als lediglich kosmetisch störend.

7/98 erfolgte erstmals eine Probeexzision aus einem der Hauttumore am rechten Oberschenkel. Mittels Kongorotfärbung und Ansequenzierung des isolierten kongophilen Materials konnte durch unser Labor die Diagnose einer AL κ -Amyloidose gestellt werden. Zur weiteren Abklärung des Hautbefundes sowie zur Abschätzung einer systemischen Beteiligung i.S. einer monoklonalen Plasmazellvermehrung oder Organamyloidose wurden weitere Untersuchungen angeschlossen:

Eine Weichteilsonographie der unteren Extremitäten (4/99) zeigt multiple rein subkutane Manifestationen mit fraglich septal-muskulärer Ausbreitung an einer Stelle des linken lateralen Oberschenkels.

Eine Rektumbiopsie (4/99) war, da keine Submukosa erfasst wurde, nicht konklusiv.

Ein MRT der unteren Extremitäten (8/99) bestätigt die subkutane Lokalisation der Hauttumoren und gibt ihre Größe mit durchschnittlich 2 cm x 2 cm, maximal 2 cm x 10 cm am rechten medialen Unterschenkel an.

Ein MRT des Kopfes (8/99) zeigt einen 20 x 12 x 10 mm³ großen Entmarkungsherd im Bereich der Corona radiata ohne Kontrastmittelanreicherung i.S. eines inaktiven Entmarkungsherdes bei MS. Ob Amyloid hier im Spiel ist, wurde nicht untersucht.

Ein MRT der Wirbelsäule (1/00) ergibt keinen Hinweis auf Plasmozytombefall.

Eine Knochenmarksbiopsie (7/00) zeigt einen altersentsprechenden Zellgehalt. 40% der Knochenmarkszellen sind positiv gegenüber dem Proliferationsmarker Ki-67, was einem Normalbefund entspricht (CATTORETTI et al. 1993). Der Plasmazellanteil (Marker VS38c) liegt bei 10%, gut 90% der Plasmazellen sind κ -positiv und knapp 10% λ -positiv (normales Verhältnis: $\kappa:\lambda = 0.5-5.0$). Das Knochenmark ist Kongorot-negativ.

Eine weitere Tumor-Exzision (7/00) aus dem linken Unterschenkel zeigt erneut massive Ablagerung von Amyloid. Perivaskulär fallen lymphoplasmazelluläre Aggregate auf, die z.T. follikelartig angeordnet sind.

Eine Abdomen-Sonographie, Lungenfunktionsprüfung und Echokardiographie (2/01) zeigen allesamt einen altersentsprechenden Normalbefund.

Die Labordiagnostik ergibt Normalwerte für Hb, Leukos, Thrombos, Retikulozyten, LDH, Haptoglobin, PTT, Elyte, Retentionswerte, Harnsäure, Leber- und Pankreasenzyme, plasmatische Gerinnung, β_2 M. Auffällig ist ein mit 8.5 g/dl grenzwertig erhöhtes Gesamtprotein im Serum, ein mit 24.1% erhöhtes γ -Globulin in der Serumelektrophorese sowie positive Cardiolipin-AK und β_2 -GlycoproteinI-AK. Das IgG im Serum ist mit 1550 mg/dl normal, IgM mit 649 mg/dl (normal 40-230 mg/dl) erhöht. Die Serumleichtketten (λ : 261,7 mg/dl, κ : 414,4 mg/dl) zeigen mit 1.6 (n: 0.26-1,65 bzw. 1.35-2.7 je nach Meßmethode) ein normales κ : λ -Verhältnis. Die Immunfixation von Serum und Urin ist ohne pathologischen Befund. Die Urindiagnostik ergibt < 60 mg/l Protein, <3 mg/l Albumin. Das manuelle Differentialblutbild ist unauffällig.

In Anbetracht der multiplen Hautamyloidome vom AL κ -Typ wird das Ergebnis der Knochenmarkspunktion (Plasmazellanteil mit 10% im oberen Normbereich, Anteil der κ -exprimierenden Plasmazellen mit > 90% stark erhöht) im Sinne des Vorliegens einer monoklonalen Gammopathie gewertet bei fehlendem Anhalt für ein Multiples Myelom oder ein anderes B-Zell-Lymphom.

Bezüglich des zerebralen Befundes werden zusätzliche neurophysiologische Untersuchungen und eine Liquorpunktion durchgeführt (Nachweis von oligoklonalen Banden, die nicht näher charakterisiert wurden) und vom neurologischen Konsiliarium als Multiple Sklerose gewertet. Differentialdiagnostisch muss an ein zerebrales Amyloidom gedacht werden (LINKE et al. 1992, SCHRÖDER et al. 1995).

Erwähnenswert ist in der Familienanamnese eine MS bei einem entfernten Verwandten sowie eine CLL der Mutter.

Die Patientin ist auch 06/04 nach Angaben der Hausärztin subjektiv weiterhin beschwerdefrei. Seit 2001 seien die Hautknoten in Zahl und Größe bis auf einen neu aufgetretenen Knoten am Arm unverändert geblieben. Klinisch besteht weiterhin kein Anhalt für das Vorliegen einer generalisierten Amyloidose. Die Laborwerte zeigen sich im Vergleich zu 2001 ebenfalls unverändert. Nach Angaben des behandelnden Neurologen sei die MS-Symptomatik MS-typisch, es bestehe eine Paraspastik der unteren Extremitäten, ein Kontroll-MRT wurde nicht durchgeführt.

IV. Material

1. Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe „pro analysi“ verwendet. Hersteller und genaue Bezeichnung sind im Methodenteil aufgeführt, sofern sie nicht von E. Merck, Darmstadt, bezogen wurden. Die benutzten Geräte werden bei ihrer Nennung im Text näher spezifiziert.

2. Seren

2.1 Normalserum des Menschen (NHS)

Das menschliche Serum stammt von gesunden Probanden. Vollblut wurde ohne Chemikalienzusatz venös entnommen und nach Gerinnung und Retraktion des Zell-Fibrinklumpens (2 h bei RT, danach bis 12 h bei 4 °C) abzentrifugiert (1800 rpm / 10 min). Der Serumüberstand wurde abgegossen und erneut bei 3000 rpm / 10 min zentrifugiert, um letzte verbliebene Zellreste zu sedimentieren. Das Serum wurde dann abpipettiert und bei - 20 °C aufbewahrt. Z.T. wurde es mit PBS (Herstellung s. V.1.1.2) auf 1/10 verdünnt (10% NHS).

2.2 Patientenserum

Von Patienten mit Amyloidose gewonnenes Blutserum, das uns von Kliniken zugeschickt wurde. Abtrennung des Gerinnsels wie bei NHS (s.o.) und Aufbewahrung des Serums bei - 20 °C.

2.3 Fötale Kälberserum (FCS)

FCS wurde von Seromed-Biochem, Berlin, Deutschland bezogen.

Fötale Kälberserum ist Bestandteil des Kulturmediums für die Propagierung von Hybridomzelllinien bei der Herstellung monoklonaler Antikörper. Darin enthaltene Rinder-Antikörper können für eine unspezifische Hintergrundreaktion beim Einsatz des monoklonalen Antikörpers in der Immunchemie verantwortlich sein. Der Brückenantikörper im monoklonalen Antikörper-System muss daher mit FCS absorbiert werden.

2.4 Normalserum vom Schaf (NSS)

NSS stammt von der institutseigenen Schafherde.

NSS wird zum Blocken in der Immunhistochemie verwendet, um die unspezifische Hintergrundreaktion zu minimieren.

3. Antikörper

Bei allen amplifizierenden Immundetektionsverfahren, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, handelt es sich um ein System aus 3 Antikörpern. Sie werden im Folgenden als Erstantikörper, Brückenantikörper und Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Komplex in der Reihenfolge der Bindung bezeichnet.

3.1 Polyklonales Antikörpersystem

Erstantikörper:

Polyklonales Antiserum aus mit dem entsprechenden Antigen (Tabelle IV-1) immunisierten Kaninchen. Alle verwendeten polyklonalen Erstantikörper wurden laboreigen hergestellt.

Antikörper	Code	Referenz
Anti-AL κ (KRA-UNK)	1157 + 1182 (1+1)	unveröffentlicht
Anti-AL κ (UNK)	1182	“
Anti-AL κ (UNK)	1183	“
Anti-AL κ (KRA)	1157	“
Anti- κ BJP (KLL)	1180	“
Anti- κ BJP (TEW)	556	“
Anti-AL κ (TEW)	558	“
Anti- λ BJP (HEN)	672	“
Anti-AL λ (LAT)	1049	“
Anti-AH γ (SOL)	1192	“
Anti-AA (WAL)	960	LINKE et al. 1983
Anti-AL κ (SIN)	880	SCHRÖDER et al. 2000
Anti-AL λ (HAR)	936	“
Anti-AL λ (ULI-LAT)	702 + 1049 (1+1)	“
Anti-ATTR (TIE)	831	“
Anti- β 2m (WOE)	975	“
Anti- κ BJP (mix: SMI ₁ / KOC ₄ /GIN ₃ /TEW ₂)	803 + 801 + 805 + 556 (1+1+1+1)	“
Anti-HCD γ ₁	849 + 850 (1+1)	unveröffentlicht
Anti-HCD γ ₃	851 + 852 (1+1)	unveröffentlicht
Anti-ATTR (TIE)	831	SCHRÖDER et al. 2000

Tabelle IV-1: Erstantikörper: Die Kürzel HAR, ULI usw. beziehen sich auf die Patienten, von denen die Antigene genommen wurden. Zahlen beziehen sich auf die Code-Nummer des immunisierten Kaninchens.

Brückenantikörper:

Polyklonales Anti-Kaninchen-IgG aus dem Schaf (Code 638), laboreigen hergestellt.

Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex:

Peroxidase-Anti-Peroxidase Soluble Complex, Antibody developed in Rabbit (polyklonal), kommerziell bezogen von Sigma, Missouri, USA

3.2 Monoklonales Antikörpersystem**Erstantikörper:**

Monoklonale Anti-AA-Antikörper aus einem Hybridomzellüberstand. Die Hybridomzellen entstanden durch Fusion von Plasmazellen aus Mäusen, die mit AA immunisiert waren und Zellen einer murinen Plasmazytomlinie (und nachfolgender Selektion eines Klons mit besonders hoher Affinität zu AA), laboreigen hergestellt (LINKE 1984). Das Zellkulturmedium enthält FCS.

Brückenantikörper:

Polyklonales Anti-Maus-IgG aus der Ziege (Code 951), absorbiert mit 20% NHS + 20% FCS, laboreigen hergestellt.

Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex:

Peroxidase-Anti-Peroxidase Soluble Complex, Immunoglobulin Fraction of Mouse Ascites Fluid Clone P6/38, bezogen von Sigma, Missouri, USA.

4. Kontrollantigene

In Western Blot und Ouchterlony wurden folgende Kontrollantigene (als lyophilisiertes Protein vorliegend und aus Urin oder Gewebe stammend, laboreigen extrahiert) verwendet:

κ_1 BJP (MEV)	κ BJP (KAE)	AL λ (ULI)	AH γ (SOL)
κ_2 BJP (NIM)*	κ BJP (MUE)		
κ_3 BJP (GIN)	κ BJP (KAE)	λ BJP (BER)	AA (KIR)
κ_4 BJP (KOC)		λ BJP (SMI)	AA (MOS)
κ_1 BJP (KUE)		λ BJP (LOH)	
κ_1 BJP (SCW)	AL κ (SIN)		A β_2 M (WOE)
κ_1 BJP (STE)	AL κ (ACK)	IgG κ (KAH)	ATTR (TIE)
κ_2 BJP (TEW)**	AL κ (KRA)	IgG λ (WEG)	

Tabelle IV-2: Kontrollantigene. Die Kürzel bezeichnen die Herkunft des jeweiligen Proteins. *: von Dr. Eulitz, LMU München. **: von Prof. Dr. Osserman, Columbia University, New York.

5. Gewebeproben

5.1 Nativgewebe

Drei Exzisate von amyloidhaltigen Unterhaut-Knoten der Patientin UNK erreichten das Labor tiefgefroren. Sie hatten ein Nassgewicht von 1,88 g, 11,55 g und 22 g. Bis zur Verarbeitung wurden sie bei – 20 °C gelagert.

5.2 Gewebeschnitte

Uns standen Paraffinschnitte mit einer Dicke von ca. 4-6 µm, aufgezogen auf Spezialobjektträger für Immunhistochemie (Superfrost Plus, Firma Menzel, Braunschweig), zur Verfügung. Die untersuchten Gewebe stammten von verschiedenen Organen von Patienten mit unterschiedlichen Amyloidosen sowie nicht-erkrankten Kontrollpersonen.

6. Tiere

Die Antikörperherstellung erfolgte in zwei Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ (Eigenzucht des Tierlabors am MPI). Die Tiere hatten bei der Erstimmunisierung ein Alter von ca. 6 Monaten und ein Gewicht von ca. 3-4 kg. Die Immunisierungen und Blutentnahmen wurden durch die Regierung von Oberbayern nach § 9 Abs. 1. Satz 4 TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S. 1105) genehmigt.

7. Patientenurin

Die Patientin UNK sammelte über 48 h ihren Urin (insgesamt 4 Liter). In die Sammelgefäße war zur Präzipitierung der Proteine je 561 g Ammoniumsulfat pro Liter Flüssigkeit vorgelegt worden. In dieser Form erreichte der so präservierte Urin das Labor.

V. Methoden

1. Protein-Extraktion

1.1 Amyloid-Fibrillen-Extraktion

Um natives Amyloid näher charakterisieren zu können, muss es zunächst aus dem Gewebe isoliert und konzentriert werden. In diesem Fall standen 3 Amyloidknoten zur Extraktion (nachfolgend als AM 122, AM 123, AM 125 bezeichnet) zur Verfügung, die der Patientin UNK im Rahmen diagnostischer und kosmetischer Exzisionen aus dem muskelnahen Subkutangewebe entnommen worden waren und das Labor tiefgefroren erreichten (vgl. IV.5.1). Die Amyloidextraktion erfolgte nach der Methode von PRAS et al. (1968), die um die Entfernung von Kollagen und anderer Strukturproteine erweitert wurde.

1.1.1 Prinzip

Ein wesentliches Kennzeichen von Amyloid ist seine schlechte Löslichkeit in physiologischen Flüssigkeiten (0,9% Kochsalzlösung, PBS), insbesondere auch im isotonen Milieu des Körpers. Für diese charakteristische Eigenschaft von Amyloid - gleich welchen Typs - werden Besonderheiten in der Primär- (hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren), Sekundär- (hoher Anteil an β -Faltblattkonformation) und Tertiär-/Quartärstruktur (dichte Zusammenlagerung zu Filamenten und Fibrillen) der amyloiden Proteine verantwortlich gemacht. Um also Amyloidfibrillen aus dem Gewebe isolieren zu können, müssen besondere mechanische und chemische Bedingungen geschaffen werden. PRAS entdeckte 1968, dass Amyloidfibrillen in salzfreiem Wasser aufquellen und (wenn man zuvor alle in physiologischer Kochsalzlösung löslichen Proteine entfernt hat) beinahe selektiv in den Überstand gehen. Dieses Aufquellen kann man sich so vorstellen, dass mit der Fibrille interagierende Wassermoleküle die relative Dichte des Fibrillen-Wasserkomplexes soweit herabsetzen können, dass die Fibrille in die Wasserphase aufzusteigen beginnt. Dies ist in salzfreiem Wasser der Fall, da hier die H_2O -Moleküle ohne Konkurrenz zu Salzionen mit der Fibrille interagieren. Unter Salz-Zusatz hingegen interagieren relativ weniger H_2O -Moleküle mit der Fibrille (Salz entzieht Proteinen das Wasser: da H_2O ein polares Molekül ist, bildet es mit (Salz-)Ionen stabile Komplexe), so dass das relative Gewicht der Fibrille steigt und sie sedimentiert. Bei der Methode nach PRAS werden durch mehrmaliges Homogenisieren des Gewebes in PBS und anschließendes Zentrifugieren (Strukturproteine und Amyloid sedimentieren) durch Dekantieren des Überstandes zunächst alle in physiologischer Salzlösung löslichen Proteine entfernt, ehe durch Homogenisieren in salzfreiem Wasser

singuläre Amyloidfibrillen beinahe selektiv in den Überstand gebracht werden, während Strukturproteine wie Kollagen sowie noch im Komplex mit Strukturproteinen vorliegendes Amyloid sich weiterhin im Sediment befinden. Letztere Komplexe lösen sich während der Extraktionsschritte nur langsam, weshalb aus dem Sediment fast beliebig oft nachextrahiert werden kann.

1.1.2 Durchführung

Abwiegen und makroskopische Beschreibung der Gewebeproben

Zerreiben des Gewebes und schonende Entfernung von Kollagenfasern und anderer Strukturproteine

Das Gewebe wurde mit einem Skalpell auf einer Glasplatte in ca. $< (0,3 \text{ cm})^3$ große Stücke zerkleinert und anschließend in Portionen von ca. 1-2 g im Potter (Braun, Melsungen) mit der ca. 10-fachen Menge (v/v) PBS pH 7.4 unter Eiskühlung (Minimierung der Aktivität gewebeszstörender Enzyme) zerrieben. Der Potter besteht aus einem rotierenden Stempel, der in einem Glaszylinder auf- und abbewegt werden kann.

- PBS: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	80,96 g
KH_2PO_4	20,32 g
NaCl	35,04 g
H_2O (a. bidest.) ad 8 Liter	

Die fleischfarbene Suspension wurde durch ein Teesieb (Passiergröße ca. 1 mm^2) gegossen, um unbeschädigte Kollagenfasern, Elastin, Sehnen und Faszien zu entfernen. Das beim ersten Abgießen im Teesieb hängen gebliebene Material wurde erneut mit dem Potter bearbeitet, um möglichst wenig amyloidhaltiges Material zu verlieren. Der dann noch im Sieb verbliebene faserige Rest wurde verworfen, die weitgehend kollagenfreie Gewebesuspension dagegen weiter verarbeitet.

Homogenisierung der Gewebesuspension und Auswaschen der löslichen Proteine

Die Suspension des kollagen-verarmten Gewebes in PBS ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde im Virtis-Mixer (Virtis „45“ Homogenizer, Virtis-Company, Gardiner, New York) bei 4000 rpm für ca. 10x15 sec mit dazwischenliegenden Pausen von jeweils 15 sec (um Erwärmung zu vermeiden) unter Eiskühlung homogenisiert. Der Virtis-Mixer funktioniert nach dem Prinzip eines Pürierstabes: 6 scharfe Klingen, die in verschiedene Ebenen gebogen sind, rotieren in einem Glasgefäß mit

vertikal gefurchten Wänden, wodurch eine turbulente Strömung erzeugt wird. Diese Anordnung erlaubt eine rasche und effiziente Homogenisierung von Gewebe.

Die erhaltene trübe, altrosafarbene Suspension wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4 °C in Sorvallröhrchen (Du Pont Instruments, Newtown E.I.) zentrifugiert (Beckman Centrifuge J2-21, Rotor SER E 18103; Ja-20). Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurde das Pellet wieder mit der ca. 10-fachen Menge an kaltem PBS homogenisiert und zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und dieser Vorgang insgesamt 8x wiederholt, bis die photometrische (Photometer Ultrospec III, Pharmacia) Absorption des Überstands gegen PBS als Leerwert bei 280 nm < 0.05 betrug, d.h. $> 95\%$ der in PBS löslichen Proteine aus dem Pellet entfernt waren. Um den Gehalt an Amyloidfibrillen beurteilen zu können, wurde nach dem 2. Zentrifugationsschritt mit einer feinen Nadel an drei repräsentativen Stellen des Pellets je eine 1 mm³ große Probe entnommen, in 10% NHS auf einen Objektträger aufgetrocknet und mit Kongorot gefärbt. Ausgewählte PBS-Überstände von AM 125 wurden gegen a. dest. dialysiert (MWCO 1000 D) und lyophilisiert, die anderen verworfen.

Wasser-Extraktions-Schritte

Nach dem 8. Zentrifugationsschritt und Dekantieren des Überstandes wurde die ca. 5-fache Menge (v/v) a. bidest. zum Pellet gegeben und dieses nur grob mittels Spatel in ca. 1-3 mm³ große Stücke zerkleinert. Nach einer Diffusionszeit von 60 min wurden die suspendierten Pelletstücke, diesmal ohne vorausgehende Homogenisierung, bei 18000 rpm für 30 min wieder herunterzentrifugiert. Dieser Zwischenschritt dient der schonenden Salzdifusion aus dem Pellet, ohne dabei größere Amyloidmengen in den Überstand zu verlieren. Der Überstand wurde dekantiert und als „1. H₂O-Ü“ lyophilisiert. Das nun salzarme Sediment wurde in den folgenden Schritten jeweils mit der 10-fachen Menge a. bidest. bei 4000 rpm für 10 x 15 sec unter Eiskühlung homogenisiert und zentrifugiert (30 min, 4° C), beginnend mit 18000 rpm (2.-5. H₂O-Ü), dann 13000 rpm (6. H₂O-Ü), 12000 rpm (7. H₂O-Ü), 8000 rpm (8. H₂O-Ü) und 3500 rpm (9. H₂O-Ü).

Das Restpellet wurde bei -20 °C eingefroren. Die amyloidhaltigen H₂O-Überstände wurden lyophilisiert, das erhaltene Proteinmaterial abgewogen, und repräsentative Proben zur Überprüfung der Qualität der selektiven Amyloidextraktion in 10% NHS auf OT ausgestrichen, mit Kongorot gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

1.2 Proteinfällung aus dem Urin

1.2.1 Prinzip

Ammoniumsulfat vermag die Löslichkeit von Proteinen durch Wasserentzug konzentrationsabhängig zu reduzieren, wobei mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration die verschiedenen Proteinfractionen mit steigender Hydrophilie nacheinander ausfallen. Zur Gewinnung des Gesamtproteins kann Ammoniumsulfat bis zur Sättigung zugegeben werden.

1.2.2 Durchführung

Die Urinprobe (4 Liter) wurde mit 561 g Ammoniumsulfat pro Liter Urin (entsprechend einer Sättigung von 80%) bei 4 °C im Kühlraum über zwei Tage gefällt. Der klare Überstand wurde bis auf einen Liter abgesaugt und verworfen, die restliche Flüssigkeit mit dem gefällten Protein bei 4000 rpm für 30 min abzentrifugiert (Heraeus Laborfuge GL). Der Überstand wurde dann bis auf 150 ml weiter abpipettiert und verworfen, das Sediment im verbliebenen Urinüberstand resuspendiert, gegen a. dest. dialysiert (MWCO 3500 D) und lyophilisiert.

2. Dialysieren und Lyophilisieren

2.1 Dialyse

Die Dialyse beruht auf der Fähigkeit semipermeabler Membranen, nur Moleküle unterhalb einer definierten Größe (cutt-off-Wert) ungehindert penetrieren zu lassen, während Molekülen oberhalb der Durchtritt verwehrt ist. So lassen sich z.B. Proteine oberhalb der Passiergröße (MWCO) schonend von Salzen oder anderen kleineren Molekülen trennen.

Verwendet wurden Dialyseschläuche mit einem MWCO von 1000, 3500 oder 10 000 Dalton von SpectraPor (molecularporous membrane tubing, Spectrum medical industries Inc. Houston Texas). Die Schläuche wurden zunächst in destilliertem Wasser gewaschen um darin herstellungsbedingt enthaltene Proteinspuren, Schwermetalle und das Präservativ Glycerin zu entfernen. Anschließend wurde ein Ende mit einer speziellen Klemme (Spectra Por, Spectrum Laboratories Inc, California, USA) verschlossen, der Schlauch mit dem Protein-Salzgemisch befüllt und ohne Lufteinschluss abgeklemmt. Dialysiert wurde gegen entmineralisiertes Wasser in einem 10 l - Plastikeimer unter Rühren über drei Tage bei 4 °C. Der Wechsel des Wassers erfolgte alle 4-12 h, insgesamt mindestens 5 mal. Das entspricht bei einem Schlauchinhalt von 100 ml einer Endverdünnung der unterhalb des MWCO liegenden Moleküle von $> 10^{-10}$.

2.2 Lyophilisierung

Die Lyophilisierung (= Gefriertrocknung) macht sich die Tatsache zunutze, dass in festem Aggregatzustand vorliegendes Wasser (Eis) bei subatmosphärischem Druck sublimiert, d.h. ohne aufzutauen direkt in den gasförmigen Zustand übergeht, wobei alle gelösten Feststoffe, wie z.B. Proteine, aber auch Salze, zurückbleiben.

Praktisch wurden 50 ml-Röhrchen zur Hälfte mit Dialysat bzw. H₂O-Überstand befüllt und schräg bei -20 °C eingefroren, um eine große Oberfläche zu erzielen (ist die Oberfläche im Vergleich zur Eisdicke zu gering, bzw. letztere größer als 1,5 cm, besteht die Gefahr, dass das Eis im unteren Teil auftaut und „zu kochen“ anfängt, und der gefrorene obere Anteil aus dem Röhrchen in die Vakuumkammer geschleudert wird). Die Röhrchen wurden mit Parafilm (American National Can, Menasha, WI) verschlossen, welcher mit einer dünnen Nadel (Sterican 27G, Braun, Melsungen) anschließend mehrfach perforiert wurde. Das erlaubt die ungehinderte Sublimation des Wassers, während eventuell mitgerissene korpuskuläre Teile (Proteinflocken) im Behältnis zurückgehalten werden. Die Röhrchen wurden für 48-72 h an den Lyophilisator angehängt (Finn – Aqua Lyovac GT2E), wobei ein Vakuum von 7×10^{-2} Torr erreicht wurde. Das lyophilisierte Protein wurde anschließend abgewogen und in den dicht verschlossenen 50 ml-Röhrchen bei RT trocken aufbewahrt.

3. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(LAEMMLI 1970)

3.1 Gelherstellung

In der Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Proteingemische der Größe nach aufgetrennt. Die untersuchten Proteine lassen sich so hinsichtlich ihrer Molekulargewichte und Reinheit beurteilen (analytisches Gel) und auch isolieren (präparatives Gel). Man unterscheidet SDS-PAGE mit kontinuierlichem pH-Gradienten von solchen mit diskontinuierlichem (=Disk-Gel). In dieser Arbeit kam ausschließlich das Disk-Gel zur Anwendung. Dabei durchlaufen die Proteine zunächst gemeinsam ein Sammelgel, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden.

Das Trenngel ist feinporiger (höhere Konzentration an Acrylamid), sein pH-Wert liegt um 2 Einheiten über dem des Sammelgels und es hat eine höhere Ionenleitfähigkeit (höhere Konzentration an Tris-HCl) als dieses.

Das Sammelgel enthält 5% Acrylamid, das Trenngel wird je nach Anforderung in 10%-, 12,5%-, 13,5%- oder 15%-iger Stärke gegossen (vergleiche Tabelle V-1).

Reagenzien:

- Acrylamidstammlösung:

Ultrapure Protogel 30% (w/v) Acrylamide, 0.8% (w/v) Bisacrylamide Stock Solution. Gas stabilized. (National diagnostics, Atlanta, Georgia)

- a. bidest. (institutseigen)

- Trenngelpuffer (1.875 M Tris-HCl, pH 8.8):

Tris (Sigma, Seelze)	56.78 g
H ₂ O (a. bidest.)	ad 250 ml
mit konz. HCl auf pH 8.8 (pH-Meter: CG 840, Schott)	

- Sammelgelpuffer (1.25 M Tris-HCl, pH 6.8):

Tris	37.85 g
H ₂ O (a. bidest.)	ad 250 ml
mit konz. HCl auf pH 6.8	

- Detergens (10% SDS w/v):

SDS (Roth, Karlsruhe)	10 g
H ₂ O (a. bidest.)	ad 100 ml

- Katalysator (TEMED, Bio-Rad Laboratories, California)

- Starter (10% APS w/v):

Ammoniumpersulfat (Bio-Rad)	100 mg
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1ml

SDS-PAG REZEPTE FÜR EIN 1.5 mm ODER ZWEI 0.75 mm STARKE GELE									
	Trenngel (15ml)							Sammelgel 5ml / 7.5ml	
% Acrylamid	6.0	7.5	12.5	10.0	12.0	15.0	13.5	5.0	5.0
A. Acrylamid Stammlösung (ml)	3.0	3.8	6.3	5.0	6.0	7.5	6.5	0.8	1.2
destilliertes Wasser (ml)	8.8	8.0	5.3	6.8	5.8	4.3	5.3	3.6	5.4
B. 1.875 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	----	----
C. 1.25 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	-----							0.5	0.75
Die Lösung entgasen (Wasserstrahlpumpe), dann hinzufügen									
D. 10% SDS (µl)	150	150	150	150	150	150	150	50.0	75.0
TEMED (µl)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	5.0	7.5
E. Ammonium-Persulfat (µl)	50	50	50	50	50	50	50	17.0	25.5
Vorsichtig mischen und das Gel sofort gießen									
BEACHTÉ: Trenn- und Sammelgel brauchen jeweils 60 min um zu polymerisieren									

Tabelle V-1: Anleitung zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Gelmatrix wird dabei von Acrylamid (Polymer) und Bisacrylamid (Kreuzvernetzung) gebildet. Durch APS wird diese Kreuzvernetzung gestartet, TEMED funktioniert als Katalysator. Die Puffer bestimmen die Ionenleitfähigkeit sowie den pH im jeweiligen Gelabschnitt.

Zum Gießen des Gels wie auch zum Lauf wurde eine kommerziell vertriebene Apparatur (Mini-Protean II: Dual slab cell, Biorad, Richmond, California) verwendet. Je zwei Glasplatten (Abmessungen 73 mm x 101,5 mm bzw. 89 mm x 101,5 mm) wurden mit Ethanol, Aceton und a. dest. gereinigt, dann Abstandshalter der Dicke 0,75, 1 oder 1,5 mm seitlich zwischen je eine große und kleine Glasplatte gelegt, und das Ganze in die nach unten durch ein Gummi abgedichtete Gießapparatur vertikal eingespannt. Das Trenngel wurde gemäß o.g. Anleitung hergestellt und mit einer Glaspipette zwischen die Glasplatten gefüllt, bis ca. 1,5 cm unter die vorher angezeichnete Eintauchtiefe der Kammzacken. Es wurde sofort mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Gelabschluss nach oben zu erzielen und Austrocknung zu vermeiden. Nach ca. 1 h Polymerisationszeit wurde das Butanol abgegossen bzw. mit a. dest. abgespült, das Sammelgel hergestellt, in den verbliebenen Raum über dem Trenngel gefüllt und der Kamm eingesetzt. Dabei wurde ein Kamm mit 10 Taschen a 5 mm Breite für 0,75 und 1 mm starke (analytische) Gele bzw. 4 Taschen a 14 mm Breite + 2 Taschen a 5 mm Breite für 1,5 mm starke (präparative) Gele verwendet.

3.2 Prinzip der Proteinwanderung

Das im Probenpuffer und im Gel enthaltene Detergens SDS komplexiert mit seinem hydrophoben Schwanz Proteine und denaturiert sie, indem es die Proteintertiärstruktur auffaltet. Gleichzeitig verleiht es den Proteinen eine zum Molekulargewicht proportionale negative Ladung (Sulfatgruppe). Fügt man zum Probenpuffer zusätzlich das reduzierende β -Mercaptoethanol hinzu, werden auch Disulfidbrücken gespalten, was z.B. im Falle von Immunglobulinen zur Zerlegung in leichte und schwere Ketten führt.

Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld von der Kathode (oben) zur Anode (unten) des vertikal ausgerichteten Gels. Dabei ist zu bemerken, dass die im Gel enthaltenen Chloridionen (aus Tris-HCl) aufgrund ihrer geringen Größe schneller wandern als die Protein-SDS-Komplexe. Die unmittelbar dahinter entstehende Ladungslücke wird im Sammelgel durch SDS überbrückt. Deshalb wandern alle Proteine im Sammelgel in einer gemeinsamen Front. Das im Laufpuffer enthaltene Glycin spielt hier als Ladungsträger kaum eine Rolle, da es bei dem pH von 6,8 größtenteils ungeladen vorliegt. Dagegen trägt

Glycin im Trenngel bei pH 8.8 eine negative Ladung und wandert schneller als SDS, so dass es dort die Ladungslücke hinter den Cl⁻-Ionen effektiv überbrückt und die langsamer wandernden SDS-Proteinkomplexe jetzt abhängig von der Molekülgröße zu Banden aufgetrennt werden. Die Porigkeit des Polyacrylamidgitters legt das Trennungsoptimum fest. Diese Form der SDS-Page wurde 1970 von LAEMMLI entwickelt.

Reagenzien:

- Laemmli-Laufpuffer:

Tris	3,03 g
SDS	1,00 g
Glycin	14.50 g
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1 l

- Probenpuffer:

10% SDS (m/v)	0.5 ml
1 M Tris-HCl pH 6.8	0,61 ml
Harnstoff	4,80 g
Bromphenolblau	0,1 ml
falls gewünscht β-Mercaptoethanol	0.10 ml
H ₂ O (a. bidest.)	ad 10 ml

Der Probenpuffer ist hyperbar gegenüber dem Laufpuffer, damit die Proteinproben in die Geltaschen (*slots*) absinken.

3.3 Praktische Durchführung der Gelelektrophorese

In der Regel wurde das Trenngel schon >12 h vor dem Lauf gegossen, um eine gute Durchpolymerisation und damit gute Proteinauftrennung zu gewährleisten. Nach Einsetzen der gegossenen Gele in die Laufapparatur und Befüllen der Anoden- und der Kathodenkammer mit Laufpuffer wurden die Kämme entfernt und die in Probenpuffer gelösten Proteine (s.u.) mit einer Mikropipette (Gilson, 20 µl) in die Geltaschen eingebracht. Sollte das Protein anschließend sequenziert werden, erfolgte vor Proteinauftrag ein ca. 10-minütiger Vorlauf mit reduzierendem β-Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffer (10 µl / Slot), um aus der Polyacrylamidquervernetzung zurückgebliebene, oxidierende Radikale zu eliminieren.

Proteinvorbereitung

Ein Flöckchen des lyophilisierten Proteins wurde abgewogen bzw. die Größe nach Erfahrungswerten gewählt, in 25-200 µl Probenpuffer gelöst (Endkonzentration ca. 0,5-2 µg/µl, Auftrag ca. 5-20 µg / Geltasche) und für ca. 15 sec auf 100 °C erhitzt (Metallblock – Thermostat, Bacher, Reutlingen). Anschließend wurde die Proteinlösung für 15 min bei 13000 rpm (Haereus biofuge 13, Rotor HFA 17.1, Winkelrotor. Sepatech, Osterode) zentrifugiert. Beim Gelauftrag wurde darauf geachtet, nur den klaren Mittelstand zu erfassen, um das Gel nicht mit Lipiden oder unlöslichen Proteinaggregaten zu kontaminieren.

Gellaufbedingungen

An das Gel wurde eine Spannung von ca. 60 V angelegt, um eine Stromstärke von 35 mA zu erzielen. Während der Elektrophorese musste die Spannung auf Werte bis zu 180 V nachgeregelt werden, um die Stromstärke halten zu können. Ein Gellauf dauerte durchschnittlich 60 min.

Danach wurden die Gele entnommen und, je nach Weiterverwendung, entweder mit herkömmlichem Coomassie blue (zur Größen- und Reinheitsanalyse, siehe dort) oder kolloidalem Coomassie blue (zur Aminosäuresequenzierung) gefärbt (V.4.) bzw. auf Nitrozellulose oder PVDF-Membran übertragen (V.6.).

Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung interessierender Proteinbanden erfolgte durch Messung ihrer Laufstrecken im Trenngel und Ablesen des korrespondierenden Molekulargewichts auf einer Eichgeraden, in der die Laufstrecken mitgeführter Markerproteine (x-Achse) gegen den Logarithmus ihres jeweiligen Molekulargewichtes (y-Achse) aufgetragen worden waren. Die Molekulargewichtsmarker „Rainbow low“ und „Rainbow high“ von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, wurden dabei in einer Menge von je 0.5-1 µg jedes Markerproteins pro Geltasche in 5-10 µl Probenpuffer eingesetzt.

	Rainbow high	Rainbow low
Myosin	MW 220 000	
Phosphorylase b	MW 97 400	
Bovine serum albumin	MW 66 000	
Ovalbumin	MW 46 000	MW 46 000
Carbonic anyhydrase	MW 30 000	MW 30 000
Trypsin inhibitor		MW 21 500
Lysozyme		MW 14 300
Aprotinin		MW 6 500
Insulin (b) chain		MW 3 400
Insulin (a) chain		MW 2 350

Tabelle V-2: Molekulargewichtsmarker

4. Coomassieblau-Färbung

4.1 Coomassie brilliant blue

Reagenzien:

- Coomassielösung (unter Rühren lösen, dann filtrieren):

Coomassie brilliant blue R250 (Serva, Heidelberg)	1,25 g
Ethanol absolut	450 ml
100% Essigsäure	56 ml
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1000 ml

- Entfärbelösung (10% Ethanol, 7% Essigsäure):

Ethanol absolut	100 ml
100% Essigsäure	70 ml
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1000 ml

- Aufbewahrungslösung (7% Essigsäure):

100% Essigsäure	70 ml
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1000 ml

Durchführung

Die Gele wurden unmittelbar nach dem Lauf in ca. 100 ml / Gel Coomassielösung eingelegt und für ca. 30 min unter leichter Bewegung (Schüttler MTS4:IKA Labortechnik, Staufen) gefärbt. Anschließend folgte die Entfärbelösung für 6-12 h mit 2- bis 3-fachem Wechsel, dann die Aufbewahrungslösung.

4.2 Kolloidales Coomassie blue

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie erfolgte nach einer Anleitung der Firma Carl Roth, Karlsruhe. Zur Herstellung der Färbelösung für ein Gel wurden 60 ml a. dest. mit 20 ml Methanol gemischt und 20 ml Roti-Blue (CBBG-250, 5x konz.) eingerührt. Das

Polyacrylamidgel wurde darin über Nacht gefärbt und anschließend für ca. 4 h in a. dest. differenziert. Laut Hersteller ist die Sensitivität von kolloidalem Coomassie gegenüber der üblichen Coomassiefärbung wesentlich höher und mit Silberfärbungen vergleichbar (Detektionsgrenze <30 ng Protein).

5. Geltrocknung

Die Coomassie-gefärbten Gele wurden getrocknet und aufbewahrt. Die Geltrocknung erfolgte gemäß einer Anleitung der Firma Carl Roth, Karlsruhe. Dazu wurde das Gel aus der Aufbewahrungslösung entnommen und für mindestens 30 min in 100 ml pro Gel der Geltrocknungslösung (20% Ethanol, 10% Glycerin in a. dest.) äquilibriert.

Anschließend wurde das Gel ohne Lufteinschluss in einem speziellen Geltrocknungsrahmen (24 cm x 24 cm) zwischen zwei zuvor in a. dest. eingeweichte Cellophanfolien eingespannt. Nach ca. 5 Tagen waren die Gele bei RT soweit getrocknet, dass sie aus dem Rahmen entnommen und archiviert werden konnten.

6. Elektrotransfer

6.1 Elektrotransfer auf Nitrozellulose

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine zur immunchemischen Identifizierung (Western Blot) auf eine Nitrozellulosemembran (Protean Nitrocellulose BA 850), 45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) überführt. Dazu wurde wiederum die Tatsache ausgenutzt, dass negativ geladene Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern. Als Transferapparat diente ein Werkstattmodell. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung V-1 schematisch skizziert. Auf die basale Anodenplatte wurden 5 mit entgastem Transferpuffer getränkte Whatman-I-Filterpapiere (8 cm x 9 cm, Whatman International, Maidstone, England) gelegt.

- Transferpuffer:

Tris	3.02 g
Glycin	14.41 g
Methanol abs.	200 ml
H ₂ O (a. bidest.)	ad 1000 ml

Der Puffer muss unmittelbar vor Verwendung entgast werden, da sonst evtl. wärmebedingt entstehende Luftblasen durch lokale Erhöhung des elektrischen Widerstandes den Transfer stören können. Auf die Filterpapiere wurde eine ca. 8.5 cm x 7.5 cm große

Nitrozellulosemembran (zuvor ca. 5 min in Transferpuffer äquibriert) gelegt. Darauf wurde das ebenfalls für ca. 5 min in Transferpuffer äquibrierte Trenngel platziert, wobei mit Bleistift Gelumriss und -orientierung auf die Nitrozellulosemembran markiert wurden. Es folgten wiederum 5 feuchte Filterpapiere. Zuletzt wurde die Kathodendeckplatte aufgesetzt und die Apparatur eingerastet, so dass eine leichte Kompression ausgeübt wurde.

An die Blottingkammer wurde eine Spannung von 23 Volt (ca. 350 mA Stromfluss) für 2-3 h oder 6 Volt für 12 h angelegt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran direkt in die Blocklösung (0.1%-ige Gelatine, V.10.3.2) überführt. Das Trenngel wurde wie beschrieben (V.4.) mit Coomassie blue gefärbt, um den Transfererfolg abschätzen zu können.

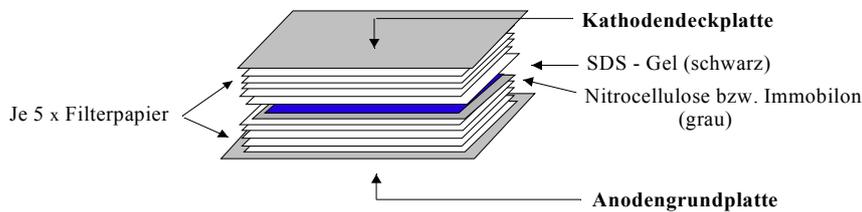


Abbildung V-1: Elektroblotting-Anordnung

6.2 Elektrotransfer auf Immobilon

Zur aminoterminalen Sequenzierung wurden die Proteine auf eine Nylonmembran (Immobilon, pore size 45 μm , Polyvinylidendifluorid (PVDF), Millipore, Bedford, MA) übertragen. Das Transfer-Prinzip und die Versuchsanordnung entsprechen dem Blot auf Nitrozellulose (s.o.). Um die hydrophobe Oberfläche der PVDF-Membran aufnahmefähig für den wässrigen Transferpuffer zu machen ist es jedoch nötig, diese in 100% Methanol (1-2 sec) und dann in a. bidest. (5 min) einzulegen, bevor sie im Transferpuffer (5 min) äquibriert wird. Ferner wird dem Transferpuffer im Unterschied zum Blot auf Nitrozellulose noch 0,02% β -Mercaptoethanol zugefügt. Nach dem Elektrotransfer der Proteinbanden auf die PVDF-Membran wurde diese mit Ponceau gefärbt.

7. Ponceau-Färbung

Die PVDF-Membran wurde direkt nach dem Elektrotransfer für 5 min in entgastes Ponceau-Färbereagenz (0.1% Ponceau S (Sigma München) (w/v) in 1% Essigsäure (v/v)) eingelegt, dann in entgastem, N_2 -gesättigtem a. bidest. für ca. 30 min differenziert, bis nur noch die rosarot gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurde die PVDF-Membran in einer dicht schließenden, N_2 -gefüllten Kammer getrocknet. Die interessierenden Banden

wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und bis zur Sequenzierung in ein mit Stickstoff gefülltes, luftdicht schließendes Röhrchen gegeben, das zusätzlich mit Parafilm (American National Can, Greenwich, Connecticut) versiegelt wurde. Der Ausschluss von Sauerstoff verringert die mögliche Oxidation des Aminoterminus von ca. 98% an der Luft auf ca. 70%, was die Sequenzausbeute verbessert (LINKE, persönliche Mitteilung).

8. Reduzieren und Alkylieren von Proteinen

8.1 Prinzip

Disulfidbrücken werden durch Reduzieren gespalten. Die Reaktionsprodukte werden durch Alkylierung stabilisiert. Als Reduktionsmittel wird β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) verwendet und Iodacetat oder Iodacetamid zum Alkylieren. Alkyliert man mit Iodacetat, führt man eine negative Ladung ein, was über Gewinn der negativen Ladung sowohl die Löslichkeit als auch die Immunogenität fördert. Bei Alkylierung mit Iodacetamid bleibt die Ladung unverändert. Um die Reoxidierung zu auszuschließen, ist es unerlässlich, die Reaktion unter Ausschluss von Sauerstoff ablaufen zu lassen. Bei Einsatz von Iodacetamid erhöht sich die Masse des Proteins durch Carboxyamidomethylierung für jedes Cystein (C) um + 57, bei Iodacetat durch Carboxymethylierung um + 58 (vgl. VI.11.).

8.2 Durchführung

Aus dem Gewebe extrahierte, lyophilisierte Amyloidfibrillen wurden abgewogen (30 mg von AM 123 (Säule C 702) bzw. 60 mg von AM 125 (C 708) bzw. 150 mg + 145 mg (C 713/714) von AM 125) und für > 12 h unter Rühren in 2 ml bzw. 3 ml 6 M Guanidin-HCl, welches mit 20 mM Tris-HCl auf pH 8 eingestellt worden war, gelöst. Eine Stunde vor Beginn der Reaktion wurde die Proteinlösung bereits mit Stickstoff (Linde, Höllriegelskreuth) begast, um den Luftsauerstoff zu verdrängen.

Anschließend wurde zum Reduzieren DTT (Cleland Reagent, Biorad Laboratories, Richmond) in einer Endkonzentration von 0.2 bzw. 0.1 M zugegeben und unter N₂-Atmosphäre für eine weitere Stunde gerührt. Zum Alkylieren wurde dann Iodacetat in der doppelten Molarität (0.4 bzw. 0.2 M) eingesetzt, noch 15 min mit N₂ weiterbegast und dann noch für 45 min ohne weitere Stickstoffzufuhr gerührt.

Das reduzierte und alkylierte lösliche Protein kann nun nach Abzentrifugation ungelöster Anteile bei 13000 rpm / 5 min direkt auf die Gelchromatographiesäule aufgetragen werden.

Wenn überschüssiges Iodacetat und DTT vor dem Säulenauftrag nicht entfernt werden, erhält man bei der Chromatographie einen riesigen Gipfel von Iodacetat und DTT im Salzbereich

(vgl. Auftrag von AM 123 (C 702), Ergebnisteil). Entfernt man das überschüssige Salz durch Dialysieren und Lyophilisieren (vgl. Auftrag AM 125, (C 708) Ergebnisteil), entstehen höhere Proteinverluste und es ist zu beachten, dass das lyophilisierte Protein vor dem Auftrag auf die Säule erneut für mindestens 12 h unter Rühren in 2 ml Laufpuffer gelöst werden sollte, um optimal aufgetrennt zu werden.

9. Gelfiltration / Säulenchromatographie

(MARTIN und SYNGE 1953; nach einer Anleitung der Firma Pharmacia)

9.1 Prinzip

Mit Hilfe der Gelfiltration lassen sich gelöste Moleküle, beispielsweise Proteine, ihrer Größe nach auftrennen. Dabei macht man sich folgendes Prinzip zunutze: Eine Gelsäule ist gefüllt mit übereinander geschichteten porösen Gelkügelchen definierter Größe und definierter Porosität, so dass nur die kleinen Moleküle eindringen können, die größeren aber ausgeschlossen werden und daher schneller die Säule passieren. Das Flüssigkeitsvolumen im Inneren der Gelkügelchen nennt man *stationäre Phase*, das außerhalb *mobile Phase*.

Auf die Säule aufgetragene gelöste Moleküle werden sich während ihres Laufs durch die Säule gemäß der BROWN'schen Molekularbewegung per diffusionem gleichmäßig in dem ihnen zugänglichen Raum verteilen. Kleine Moleküle können leichter in die Gelkügelchen eindringen und haben daher einen größeren Querschnitt zu durchmessen als große Moleküle. Nach der Formel $\text{Geschwindigkeit} = \text{Fluss} / \text{Querschnitt}$ werden sie länger in der Säule retardiert als größere Moleküle. Folglich erscheinen am Auslass der Säule zuerst die großen Moleküle, die ausschließlich mit der mobilen Phase wandern, dann die Auftrennung der (mittelgroßen) Moleküle, die mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit in die Gelkügelchen einzudringen vermochten; zuletzt schließlich die kleinen Moleküle (z.B. Salze), die die gesamte Säulenweite (mobile und stationäre Phase) einnehmen konnten.

9.2 Material

Folgende kommerziell erhältliche Gelarten stehen zur Verfügung (amersham pharmacia biotech, Uppsala Sweden):

- Sephadex: mit Epichlorhydrin kreuzvernetztes Dextran
- Sephacryl: mit N,N'-Methylen-Bisarcylamid vernetztes Allyldextran
- Superdex: kreuzvernetzte poröse Agarose mit kovalent gebundenem Dextran
- Superose: kreuzvernetzte poröse Agarose.

Diese Materialien unterscheiden sich u.a. in Quellungsvermögen, Komprimierbarkeit bzw. Druckresistenz, Wechselwirkungen mit Proteinen, Empfindlichkeit gegen hohe Temperaturen und extreme pH-Werte, Kompatibilität mit unterschiedlichen Laufmitteln, Trenngeschwindigkeit und Trennschärfe für Moleküle unterschiedlicher Größe.

Als gängige Lösungsmittel werden z.B. wässrige Lösungen (Puffer, etwa PBS und Guanidin-HCl), Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Aceton u.a. verwendet.

9.3 Durchführung

Die verwendeten Gelmatrices (Sepadex G-100: bead size 15-20 μm , Trennoptimum laut Hersteller 4000 - 150 000 Dalton, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden; und Sephacryl S-200, bead size 25-75 μm , Trennoptimum 5000 - 250 000 Dalton, ebenfalls von Pharmacia) wurden nach Angaben des Herstellers aufbereitet, in entgastem 6 M Guanidin-HCl äquilibriert und in eine Glassäule (2 cm x 50 cm bzw. 2 cm x 70 cm) gepackt. Dem Auslass (Innendurchmesser ca. 1 mm) am unteren Säulenende ist ein Glassieb („Fritte“) zum Zurückhalten der Gelkügelchen vorgeschaltet. Den oberen Abschluss bildet ein kleiner aufsetzbarer Zylinder von 2 cm Innendurchmesser und ca. 7 cm Höhe, der einen Zugang nach oben und einen zweiten zur Seite besitzt. Beide Säulenteile sind an ihrer Verbindungsstelle so geschliffen, dass sie, von einer Metallklemme zusammengehalten, lösungsmitteldicht aufeinandergesetzt werden können, ohne den Innendruck der Säule zu erhöhen.

An den seitlichen Säulenauslass wird über einen dünnen Plastikschlauch die laufmittelgefüllte Mariottflasche angeschlossen. Sie sorgt für einen konstanten und damit gleichmäßigen Fluss durch die Säule. Der obere Einlass ist luftdicht abgeklemmt und wird nur zum Beschicken der Säule mit der Probe geöffnet. An den unteren Auslass ist ein Plastikschlauch mit einem Innendurchmesser von ca. 0.3 mm angeschlossen, der die eluierte Flüssigkeit durch ein Photometer (2138 UVICORD S, LKB, Bromma, Schweden) führt. Es misst kontinuierlich die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 276 nm, wo vor allem die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan maximal absorbieren. Die Absorptionswerte werden von einem Fallbügelschreiber (2210 Bromma Recorder, Bromma, Schweden) kontinuierlich aufgezeichnet (Schreiber 50/50, Papiervorschub: 0,2 mm/min). Schließlich wird das Eluat in einem automatischen Fraktionssammler (700 Ultrorac Fraction Collector, LKB Bromma, Schweden) in 10 ml-Glasröhrchen (Elka, Assistent, Sondheim, Germany) aufgefangen (Röhrchenwechsel alle 5 - 20 min entsprechend ca. 3-5 ml/Röhrchen). Nach dem Prinzip der isokratischen Trennung wurde als Solvent = Eluent gefiltertes (Faltenfilter 595 $\frac{1}{2}$, Schleicher & Schuell, Dassel) und entgastes 6 M Guanidin-HCl

(Ultrapure, United States Biochemical, Cleveland, OH) verwendet, da sich in Amyloidkonformation befindliche Proteine erfahrungsgemäß sehr gut in diesem Medium lösen lassen. Die gesamte Versuchsanordnung zeigt Abbildung V-2.

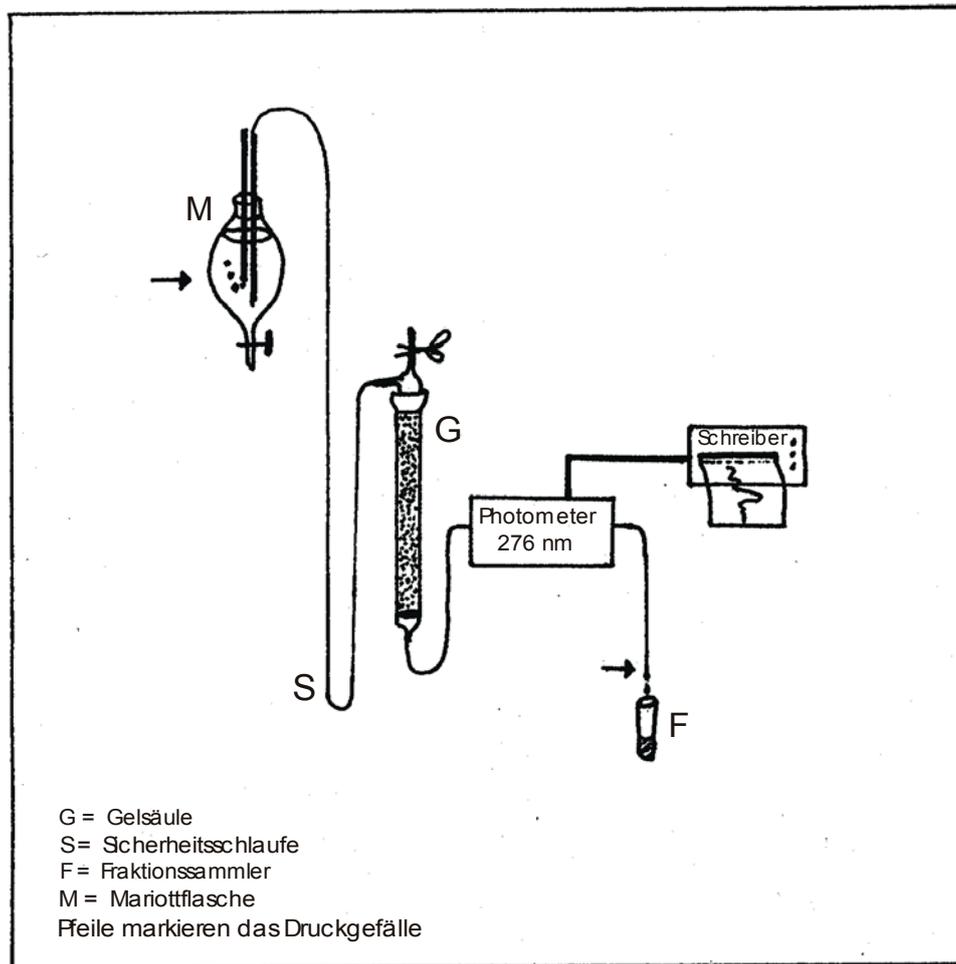


Abbildung V-2: Säulenchromatographie

Der Proteinauftrag erfolgte, nach Äquilibration der Säule, mit einem an eine Plastikspritze angeschlossen dünnen Schlauch direkt auf die Geloberfläche, mit dem Ziel, eine scharfe Auftragsbande zu erhalten. Zur optimalen Auftrennung sollte dabei das Auftragsvolumen der Probe 2% des Säulenvolumens nicht überschreiten. Ferner ist darauf zu achten, dass die Proben vor Auftrag zentrifugiert werden (13000 rpm, 10 min), um die Säule weder mit Lipiden (Film an der Oberfläche) noch durch unlösliche Proteinaggregate (Sediment) zu verunreinigen. Eine Mariottflasche garantiert konstanten Druck. Sie wurde in einer Höhe von ca. 90 cm (Sephadex G-100) bzw. 1,60 m (Sephacryl S-200) über dem Auslass des Fraktionssammlers angebracht, wodurch der Fluss von 1 ml/min bis 1 ml/h reguliert werden kann.

Vor dem Probenauftrag wurde jeweils ein Probelauf mit Markerproteinen bekannter Größe durchgeführt (Tabelle V-3).

Marker	Molekulargewicht (kD)
DNP- ϵ -Lysin (Serva, Heidelberg)	0.1642
Eglin C (Sigma, München)	8.14
Cytochrom C (E.Merck, Darmstadt)	12.3
Myoglobin vom Pferd (Serva)	17.8
Dextranblau (Pharmacia)	1000-2000

Tabelle V-3: Molekulargewichtsmarker

Um den Probenauftrag zu erleichtern, wurde die gelöste Probe (2 ml) durch Zusatz von einer Spatelspitze Guanidin-HCl oder Saccharose hyperbar gemacht. DNP- ϵ -Lysin diente als Salzmarker (V_{\max}), Dextranblau als Marker für die mobile Phase (V_0 , Totvolumen). Das gewonnene Eluat wurde entsprechend der aufgezeichneten Absorptionswerte zu Fraktionen zusammengefasst und diese einzeln dialysiert (MWCO 3500 D) und lyophilisiert.

10. Immunchemie

Die Immunchemie ist eine elegante Methode, um mit Hilfe von spezifischen Antikörpern chemisch definierte Substanzen (Proteine, Kohlenhydrate, Glykolipide) nachzuweisen und so die aufwendige chemische Analyse zu umgehen. Sie umfasst eine große Anzahl unterschiedlicher Methoden, welche die Agglutination, die Präzipitation und die Bindungstests zur Analyse einsetzt (LINKE 1998).

10.1 Zweidimensionale Immundiffusion

(OUCHTERLONY 1958, OUCHTERLONY et al. 1978, LINKE 1975)

10.1.1 Prinzip

Bei der zweidimensionalen Immundiffusion nach OUCHTERLONY handelt es sich um eine immunchemische Methode mit zwei löslichen Partnern: multivalenten Antigenen und polyklonalen Antikörpern. Die Methode ist qualitativ, zugleich einfach und schnell durchführbar und dennoch sehr präzise. Sie beruht auf der Kreuzvernetzung von Antigenen durch die entsprechenden Antikörper. Voraussetzung sind multivalente Antigene, die auf wenigstens bivalente spezifische Antikörper treffen, so dass sie am Äquivalenzpunkt (Äquivalenz von Epitopen und Paratopen) als sichtbare Präzipitate im Diffusionsmedium (Agarosegel) ausgefällt werden (vgl. Abbildung V-3).

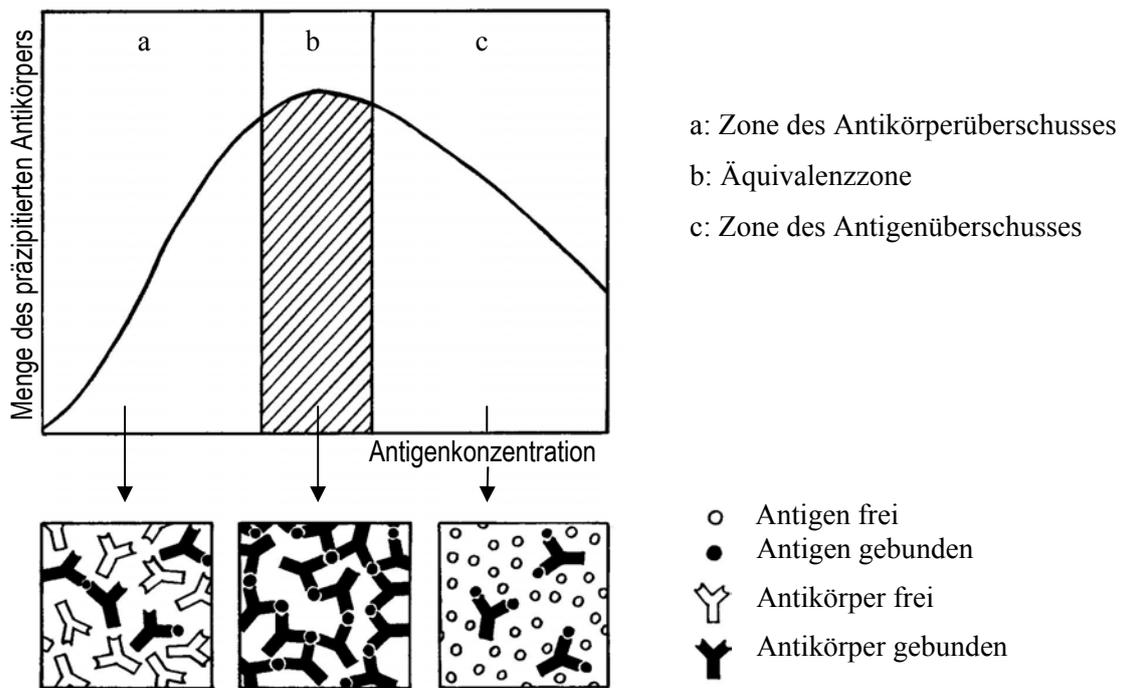


Abbildung V-3: Heidelberger Kurve: Nur im Bereich der Äquivalenzzone von Antikörper und Antigen kommt es zur Kreuzvernetzung und damit zur sichtbaren Präzipitation von Antigen und Antikörper. Modifiziert nach LINKE 1998 in: Bioanalytik, S. 77.

Das Trägermedium ist eine Agaroseplatte (ca. 1% Agarose in Barbitalpuffer, s.u., eingegossen in eine Petrischale, Schichtdicke ca. 3 mm), in die Auftragslöcher von variablem Abstand und variabler Größe eingestanzt und mit Antigen bzw. Antikörper beschickt werden.

Abhängig von Zeit, Temperatur, Molekülgröße, Löslichkeit und Konzentration diffundieren Antigen und Antikörper aus den Stanzlöchern in die Agaroseplatte und wandern aufeinander zu. Am Ort der Epi- und Paratopäquivalenz erfolgt eine Präzipitation mit scharfer Linie. Die Analyse der Präzipitationsmuster (Abbildung V-4) erlaubt eine präzise Charakterisierung und den unmittelbaren Vergleich verschiedener Antigene bzw. Antikörper hinsichtlich a, der Reinheit des Antigens, b, der chemischen Verwandtschaft von Antigenen untereinander und c, der Potenz des verwendeten Antikörpers. Deren Ausprägung, Lage und Form ist wie folgt zu beurteilen (vgl. LINKE 1998 in: Bioanalytik):

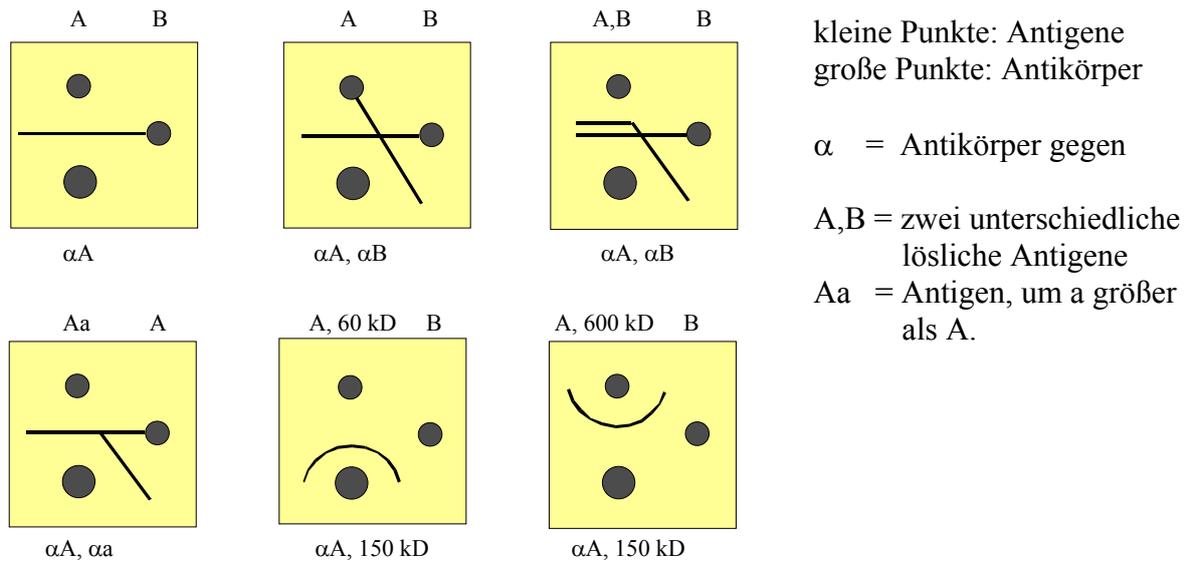


Abbildung V-4: Präzipitationsmuster: Links unten „spornt“ Aa über A, da der Antikörper auf Aa mehr Epitope erkennt als auf A. Rechts oben zeigt B eine Linie auf Identität mit AB, da es die gleichen Epitope enthält. Da A und B verschiedene Moleküle sind, gibt es hier (im Gegensatz zu Aa = ein Molekül) zwei unabhängige Präzipitationslinien für A und B. Rechts unten: die Präzipitationslinie ist konkav zum größeren Molekül. Modifiziert nach LINKE 1998 in Bioanalytik, Seite 82.

10.1.2 Vorgehen

Herstellung der Agaroseplatten

Agarose (Sea Kem 63489)	1% (m/v)
PEG 4000 (Merck 807490)	3% (m/v)
Barbitalpuffer 0.025 M, pH 8.6	95% (v/v)
2% (w/v) Na-Azid (NaN_3) in a. dest.	1% (v/v)

- Barbitalpuffer - Stammlösung: (0.075 M, pH 8.6):

5,5 Diethylbarbital-Na-Salz ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$, Sigma)	513.14 g
5,5 Diethylbarbitursäure ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$, Sigma)	52,07 g
H_2O (a. dest.)	ad 1000 ml

PEG wird im Barbitalpuffer unter Rühren und Erhitzen gelöst, die Agarose eingestreut und die Lösung kurz aufgeköcht. Dann ist sie völlig klar. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird Na-Azid zugegeben und durchmischt. Von dieser Agaroselösung werden je 5 ml mit einer vorgeheizter Pipette in je ein absolut waagrecht positioniertes Petrischälchen (Plastik, Durchmesser 4 cm, Greiner, Nürtingen) gegeben. Nach dem Abkühlen und Antrocknen bei RT (ca. 15 min) werden die Agaroseplatten abgedeckt und im Kühlschrank bei 4 °C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Z.T. wurde die Agarose auch auf Glasplatten (9 cm x 12 cm / 20 ml) gegossen.

Ausstanzen der Löcher

Die Stanzlöcher werden in ausreichender Entfernung zum Gelrand mit Saugstanzen von 0.5 - 3 mm Durchmesser gesetzt (Löcher für Antikörper: 1,5 bzw. 2 mm; für Antigen: 1,0 bzw. 1,5 mm), die speziell für diesen Zweck angefertigt wurden. Um einen definierten Abstand der Löcher (Mittelpunkt-Mittelpunkt) von 2,5, 5 oder 10 mm zu gewährleisten, wurde eine Schablone mit dem Muster der Stanzlöcher unter die durchsichtige Petrischale gelegt.

Lösung des Antigens

Sofern es sich bei dem Antigen um ein primär lyophilisiertes Protein handelte wurde dieses wie folgt gelöst:

1. Denaturieren in 100 µl 1 N NaOH
2. Zugabe von 100 µl 3-fach konzentriertem Barbitalpuffer 0.075 M pH 8.6
3. Neutralisieren mit 100 µl 1 M HCl

Die Antigenendkonzentration lag dabei, wenn nicht anders angegeben, bei 0,2 mg/ml.

Probenauftrag

Der Antikörperauftrag erfolgte in Form des polyklonalen Vollserums, das z.T. mit NHS oder κ -Ketten definierter Subgruppe absorbiert war. Die Stanzlöcher der Antikörper wurden nach 10 min nochmals mit definiertem Volumen nachgefüllt, so dass insgesamt ca. 20 µl/Loch Antiserum aufgetragen wurden. Nach einem Antikörpervorlauf von ca. 30 min wurden auch die für die Antigene vorgesehenen Löcher beschickt (ca. 7-8 µl/Loch). Dieser zeitliche Unterschied ist insbesondere erforderlich, wenn die Antigene wesentlich kleiner sind als die Antikörper und entsprechend schneller im Gel diffundieren (vgl. Abbildung V-4). In dieser Arbeit sind die Antigene nur ca. 10-25 kD groß bei bekannter Antikörpergröße von 150 kD, so dass den Antikörpern ein 30-minütiger Vorsprung gegeben wurde, um klare Präzipitationslinien zu erzielen. Der Auftrag erfolgte mit einer 20 µl-Pipette (Gilson), wobei die Löcher beim Antigen- bzw. beim ersten Antikörperauftrag eben so voll gemacht wurden, dass sich der Flüssigkeitsspiegel genau auf Höhe der Geloberfläche befand. Je nach Abstand der Löcher und der Umgebungstemperatur konnten die Präzipitationslinien nach 1h (1 mm Abstand bei RT) bis 48 h (5 mm Abstand bei 4 °C) ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden zeichnerisch und photographisch festgehalten.

Dokumentation der Ergebnisse (Gel-Bond):

Um die Agarosegele mit den Präzipitationslinien dauerhaft haltbar machen zu können, werden sie auf Gel-Bond (Film Agarose gel support medium: FMC Bio Products, Rockland, ME, USA) fixiert. Dazu wird das Agarosegel 2-3 d mit PBS und 1 h mit a. dest. gewässert, dann auf die Gel-Bond-Membran gelegt und mit feuchtem Filterpapier bedeckt. Obenauf wird eine beschwerte Glasplatte gelegt (Abbildung V-5). Die Filterpapiere entziehen dem Agarosegel im Laufe von ca. 24 h die Feuchtigkeit. Es bleibt ein trockener Film von Agarose mit eingeschlossenen, präzipitierten Proteinen an die Gel-Bond-Membran fixiert zurück.

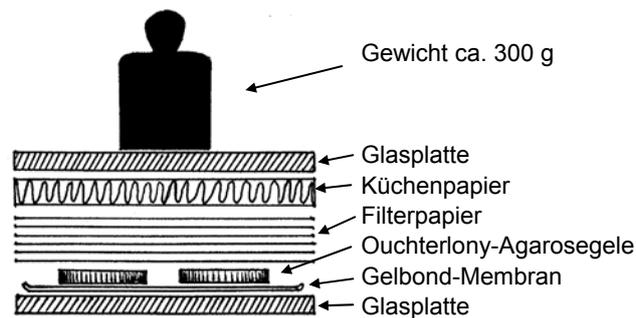


Abbildung V-5: Gelbond

10.2 Immunhistochemie

(NOLL et al. 2000)

10.2.1 Antikörper, Amplifikatoren, spezifisches Fenster und Kontrollen

Die Darstellung antigener Strukturen in Gewebeschnitten mit Hilfe von Antikörpern gehört zu den Bindungstests. Als löslicher Partner kommen monoklonale oder polyklonale Antikörper zum Einsatz, der unlösliche Partner ist das im Gewebeverband liegende Antigen.

Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden über Hybridomzelllinien in der Gewebekultur gewonnen (KÖHLER und MILSTEIN 1975). Dazu werden Immunglobulin-produzierende Milzzellen einer immunisierten Maus mit einer (unsterblichen) murinen Tumor-B-Zell-Linie, die keine Antikörper produziert, fusioniert. Anschließend werden die Zellen in einem selektiven Medium kultiviert, und nur diejenigen Klone propagiert, die den entsprechenden Antikörper liefern. Diese Klone werden in Nährmedien (z.B. FCS) vermehrt, um den antikörperhaltigen Überstand zu gewinnen.

Jeder Antikörper aus dem Überstand eines Hybridomzellklons entspricht einer einzigen Antikörperspezies, die, je nach Art, eine geringe, mäßige, hohe oder sehr hohe Spezifität und

Affinität besitzt. Entsprechend sind monoklonale Antikörper mit hoher und geeigneter Spezifität die besten Reagenzien. Aufgrund hoher Passgenauigkeit und Einheitlichkeit der Paratope sind sie für bestimmte Anwendungen zuverlässiger als polyklonale Antikörper, weil sie immer gleich wie ein einziges chemisches Reagenz reagieren. Ihr Vorteil liegt in der identischen Reproduzierbarkeit, wodurch zufällige Variationen der Antikörperzusammensetzung, wie sie im immunisierten Tier die Regel sind, ausgeschlossen werden.

Polyklonale Antikörper

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern ist einfacher als die von monoklonalen (s.o.), da das Serum eines immunisierten Tieres direkt verwendet wird. Polyklonale Antikörper sind dann sensitiver, wenn mehr Epitope mit hoher Affinität auf dem Antigen erkannt werden. Jedoch erscheint bei der Fülle unterschiedlicher Antikörper im Antiserum die unspezifische Gewebereaktion stärker, da Antikörper auch andere Gewebsbestandteile binden können. Eine Absorption (z.B. mit 1/5 NHS) hat daher in manchen Fällen einen günstigen Einfluss auf die Spezifität.

Antikörpersysteme für Bindungstests

Die spezifisch gebundenen Antikörper können wegen ihrer geringen Größe und Farblosigkeit auf dem Gewebe nicht erkannt werden. Deshalb muss man ihr Signal durch ein amplifizierendes System sichtbar machen. Dazu gibt es mehrere Methoden (s. Abbildung V-6). So kann das amplifizierende System direkt an den ersten Antikörper chemisch gekoppelt sein (**direktes System**, a).

Weniger aufwendig, als jeden Erstantikörper mit einem Amplifikator zu koppeln ist es jedoch, einen zweiten, markierten Antikörper an den ersten binden zu lassen (**indirektes System**, b). Dieser ist in der Regel polyklonal, immer in einer anderen Tierspezies als der Erstantikörper erzeugt und gegen zahlreiche Epitope des Erstantikörpers gerichtet. Da an jeden Erstantikörper mehrere zweite Antikörper binden, findet hier eine zusätzliche Signalverstärkung (Amplifikation) statt.

Beim **unmarkierten System** (c) ist ein dritter Antikörper erforderlich, der aus der gleichen Tierspezies wie der Erstantikörper stammen muss. Dieser besitzt Spezifität für den Amplifikator und kann z.B. durch Immunisierung eines Tieres mit dem Amplifikator erzeugt werden. Da bei geeignetem Konzentrationsverhältnis eine Kreuzvernetzung von Drittantikörpern und Amplifikatormolekülen stattfindet, ist die Amplifikation des Signals im unmarkierten System noch ausgeprägter als beim direkten und indirekten System.

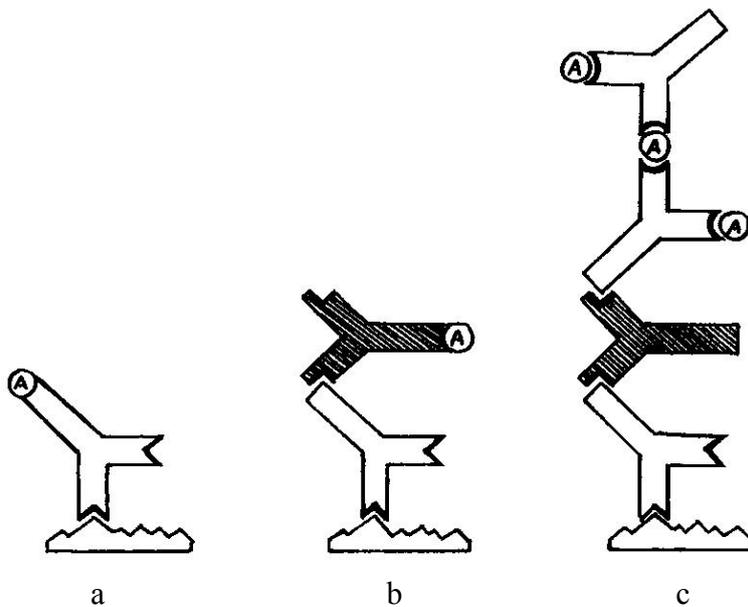


Abbildung V-6: Direktes (a), indirektes (b) und unmarkiertes (c) Antikörpersystem. A = Amplifikator. Gleiche Farbe der Antikörper = gleiche Tierspezies, in der sie erzeugt wurden.

Amplifikator

Als Amplifikator können verschiedene Systeme eingesetzt werden, wie Fluoreszenz, Lumineszenz, Radioaktivität, kolloidale Metalle wie z.B. Gold (Licht- und Elektronenmikroskopie) und Enzyme in Verbindung mit stabilen Chromogenen. Enzymsysteme haben folgende Vorteile:

- sie sind harmlos (ungiftig, keine aktinische Schädigung), lange haltbar (kein radioaktiver Zerfall), lagerfähig und leicht handhabbar
- das Reaktionsprodukt ist lange haltbar (kein Verblässen bei lichtgeschützter Aufbewahrung im Gegensatz zu Lumineszenz, Fluoreszenz)
- leichte Auswertbarkeit unter dem Lichtmikroskop (ohne weitere Zusatzapparate)
- Übertragbarkeit auf die Elektronenmikroskopie (kolloidale Metalle)

PAP-Komplex

(STERNBERGER 1979)

Zum Zweck der histochemischen Amyloidklassifizierung wurde hier ein unmarkiertes, dreifaches Antikörpersystem mit Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (= PAP-Komplex) als Amplifikator gewählt.

Dabei handelt es sich um das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches spezifisch an Anti-Peroxidase-Antikörper (aus dem Kaninchen für das polyklonale bzw. aus der Maus für das monoklonale System) gebunden ist. Es setzt Peroxide (hier H_2O_2) zu Oxiden (hier Wasser)

unter Freisetzung von Sauerstoffradikalen (O^* in Abbildung V-7) um, welche wiederum viele lösliche, farblose Chromogenmoleküle (hier O-Dianisidin/Na-Nitroprussid oder AEC) zu einem unlöslichen, sichtbaren Farbstoff (im Mikroskop rot erscheinend) oxidieren (Abbildung V-7). Durch die Ablagerung des unlöslichen Farbstoffs wird der Sitz der gesuchten Epitope im Gewebeschnitt markiert.

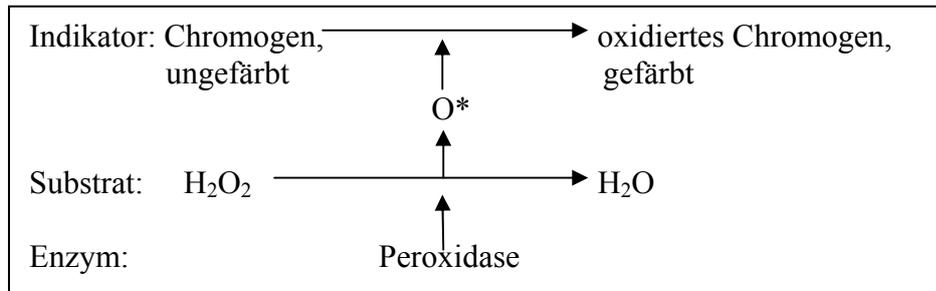


Abbildung V-7: Prinzip der Amplifikation mit Hilfe der Peroxidase-Farbreaktion.

Neben dem PAP-Komplex findet in der Immunhistochemie auch das Enzymsystem des Avidin-Biotin-Complex (ABC) Verwendung, wobei an den biotinylierten Antikörper der Avidin-Peroxidase-Komplex mit hoher Affinität bindet.

Auffinden des „Spezifischen Fensters“ durch geeignete Antikörperverdünnung

Proteine, zu denen auch Antikörper gehören, haften leicht an allen möglichen Oberflächen. So ergibt sich bei hoher Antikörperkonzentration fast zwangsläufig eine unspezifische Färbung jeder Art von (spezifischen und unspezifischen) Antigenen. Es ist also unerlässlich, durch entsprechende Vorversuche geeignete Bedingungen im amplifizierenden System zu finden, unter denen eine spezifische Messung möglich ist. Eine schematische Darstellung der Optimierung immunchemischer Reaktionen zeigt Abbildung V-8: Etwa bei einer Antikörperverdünnung von 1/100 geht die unspezifische Hintergrundaktivität stark zurück und spezifische Antigen-Antikörperinteraktionen treten aus dem „Hintergrund“ hervor. Das „Spezifische Fenster“ beginnt bei einer Antikörperverdünnung von ca. 1/100 und liegt bei Systemen mit mehreren Antikörpern bei noch höheren Verdünnungen um 1/1000 bis 1/10000. Gängige Erstantikörperverdünnungen bei verschiedenen Verfahren der Immunchemie sind in Tabelle V-4 aufgelistet.

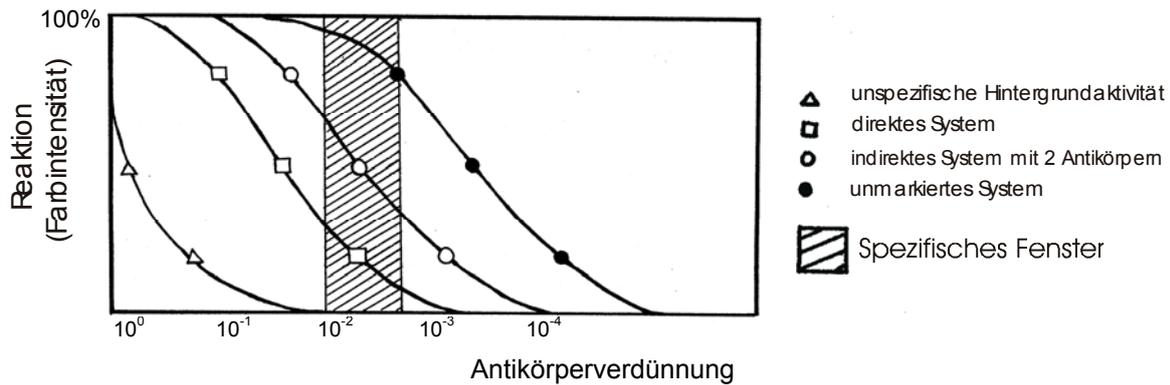


Abbildung V-8: Auffinden des „Spezifischen Fensters“ (nach LINKE 1998)

System	mc	pc
ELISA	1:40	1:4000-16000
Western Blot	1:20	1:2000-8000
Immunhistochemie	1:10	1:500-3000

Tabelle V-4: Gängige Erstantikörperverdünnungen in der Immunchemie

Kontrollen in der Immunchemie

Da immunchemische Methoden immer indirekt sind, muss in geeigneten Vorversuchen zunächst die Spezifität der gewählten Methode für die jeweilige Anwendung ermittelt werden: dazu dienen negative und positive Antigen- wie auch Antikörperkontrollen. Insbesondere bei der Entwicklung von Bindungstests sind solche Kontrollen unerlässlich.

Im Falle eines aus dem Tier gewonnenen polyklonalen Antiserums ist zum einen die möglichst genaue Charakterisierung bezüglich der erkannten Epitope, zum anderen die Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe zu fordern, um bei dessen (Routine-)Einsatz in der Immunchemie falsch positive und falsch negative Resultate zu minimieren

Austestung und Absorption eines Antiserums, Positiv- und Negativkontrollen

Es gibt jeweils positive und negative Antigenkontrollen und Antikörperkontrollen. Als positive Antigenkontrollen nimmt man Antigene gleichen Typs, jedoch verschiedenen Ursprungs - am Beispiel der Immunhistochemie also Gewebeschnitte von verschiedenen Patienten mit demselben Antigen - und fragt, ob auch diese Antigene gebunden werden. Als negative Antigenkontrollen nimmt man Gewebeschnitte, in denen das gesuchte Antigen nicht

vorkommt. Diese müssen in der Immunchemie negativ sein, um einen Antikörper als spezifisch bezeichnen zu können.

Als positive Antikörperkontrollen nimmt man Antikörper gegen das gesuchte Antigen, als negative Antikörperkontrollen nimmt man (Tabelle V-5)

- mit dem homologen Antigen absorbierte Antikörper oder
- gegen andere Antigene gerichtete Antikörper oder
- das Serum eines nicht immunisierten Tieres (z.B. Präimmunsrum) gleicher Spezies

	Antigen 1	kein Antigen	Antigen 2
Antikörper gegen 1	+	0	0
Antikörper 1 absorbiert mit Antigen 1	0	0	0
Kein Antikörper	0	0	0
Antikörper gegen 2	0	0	+
Antikörper 2 absorbiert mit Antigen 2	0	0	0

Tabelle V-5: Nachweis der Spezifität von Antikörpern in qualitativen Bindungstests wie der Immunhistochemie

Sollten bei einem Nachweis Unspezifitäten auftreten, kann durch gezielte Absorption der unspezifisch bindenden Antikörper die Spezifität des Antiserums gesteigert werden. Durch genaue Austestung des Antikserums im Hinblick auf verschiedene bekannte und definierte Epitope kann der Nachweis der Spezifität erbracht werden.

Alle verwendeten Antikörper wurden vor ihrem diagnostischen Einsatz entsprechend der Austestungsergebnisse absorbiert und verdünnt.

10.2.2 Praktische Anwendung der Immunhistochemie

Reagenzien

- Aqua destillata oder demineralisata
- Xylol reinst ($C_6H_4(CH_3)_2$)
- Ethanol (E. absolut, Riedel - de Haen, Seelze, D): 100%, 90%, 80%, 60%; in a. dest.
- Methanol (M. absolut, Riedel - de Haen, Seelze)
- Natriumhydrogenphosphatdihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$)
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
- Kochsalz (NaCl)
- PBS:

$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	80,96 g
KH_2PO_4	20,32 g
NaCl	35,04 g
H_2O (a. bidest.)	ad 8 l

- Brij 35 = Polyoxyethylenlaurylether
- Brij 5 ml Stammlösung (1g Brij = $\text{CH}_2 \text{H}_4\text{O}_n\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$ ad 100 ml PBS) ad 1000 ml PBS.
- 5% NSS (normales Schafsserum, institutseigene Schafherde) in PBS
- FCS (fötale Kälberserum, Seromed)
- NHS (normales Humanserum, Eigenabnahme)
- Häkalaun: Mayers Häkalaunlösung
- Glyceringelatine: Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie
- DAKO Pen for Immunohistochemistry (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}$: (>99.5%, Carl Roth, Karlsruhe)
- AEC: 3-Amino 9-ethylcarbazol (Sigma, USA)
- 30% H_2O_2 : Perhydrol
- Färbelösung:

DMSO	12 ml
AEC	20 mg
PBS	88 ml
H_2O (a. bidest.)	100 ml
30% H_2O_2	10 μl

Antikörper

a. Erstantikörper:

Antikörper	Ursprung	Absorption	Verdünnung	Code
Anti-AA (Kulturüberstand)	mc, Maus	---	1:30	mc1
Anti-AL λ (HAR)	pc, Kaninchen	1/5 NHS	1:1000	936
Anti-AL λ (ULI-LAT)	pc, Kaninchen	1/5 NHS	1:500	702 + 1049 (1+1)
Anti-AL κ (SIN)	pc, Kaninchen	1/5 NHS	1:1000	880
Anti-AL κ (KRA-UNK)	pc, Kaninchen	1/5 NHS	1:2000	1157 + 1182 (1+1)
Anti-ATTR (TIE)	pc, Kaninchen	---	1:800	831
Anti- $\beta_2\text{M}$ (WOE)	pc, Kaninchen	---	1:800	975
Anti- κBJP (mix = SMI ₁ -KOC ₄ -GIN ₃ -TEW ₂)	pc, Kaninchen	---	1:10000	803 + 801 + 805 + 556 (1 + 1 + 1 + 1)

Tabelle V-6: In der Immunhistochemie verwendete Erstantikörper. Pro OT wurden ca. 300 μl der AK-Verdünnung aufgetragen. Zur AK-Verdünnung wurde PBS verwendet.

Sämtliche Amyloid-Antikörper sowie die Brückenantikörper sind laboreigen in Kaninchen (pc) durch Immunisierung mit gereinigtem Protein (Buchstabenkombination entspricht Patientencode) erzeugt oder aus Maushybridomzelllinien (mc) gewonnen.

b. Brückenantikörper

- pc 951 (polyklonales Anti-Maus - IgG aus der Ziege); AK : NHS : FCS = 6:2:2; Verdünnung 1:20
- pc 638 (polyklonales Anti-Kaninchen - IgG aus der Ziege); AK : NHS = 8:2; Verdünnung 1:20

c. Peroxidase - Antikörper - Komplex

- Löslicher Peroxidase - Antiperoxidase - Komplex, Mäuseaszites, Clone P6/38, Sigma, Missouri, 1: 2000
- Löslicher Peroxidase - Antiperoxidase - Komplex, hergestellt im Kaninchen, Sigma, Missouri, 1: 2000

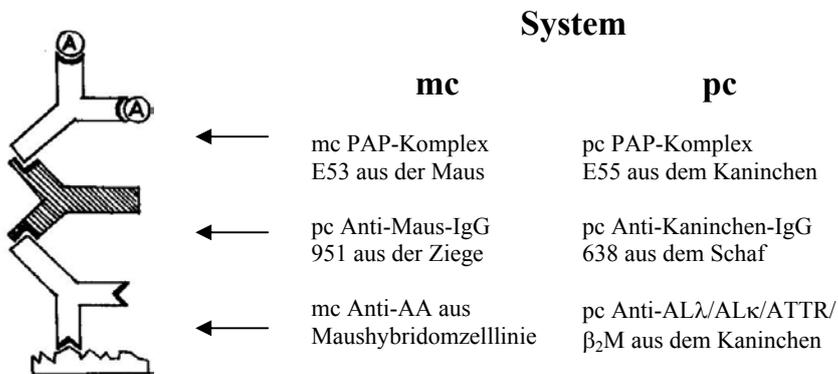


Abbildung V-9 In der Immunhistochemie verwendetes Antikörpersystem mit Erstantikörper, Brückenantikörper und PAP-Komplex

Vorgehen

- Die auf für die Immunperoxidasefärbung geeigneten Objektträger aufgezogenen Paraffinleerschnitte von formalinfixierten Geweben mit einer Dicke von 4-6 µm wurden von einem Institut für Pathologie angefertigt.
- Nach Inkubation der Objektträger für eine Stunde bei 50-55 °C im Trockenschrank werden die Schnitte für 2x5 min in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (je 2 min 100%, 90%, 80%, 60% Ethanol) geführt, um sie für wässrige Lösungen aufnahmefähig zu machen.
- Die Objektträger werden anschließend für 2 min in deionisiertem Wasser und für 5 min in PBS gespült. Dann wird durch Einlegen für 5 min in eine 7,5%-ige H₂O₂-Lösung (40 ml 30% H₂O₂ in 60 ml a. dest. + 30 ml 100% Methanol) die intrinsische Peroxidaseaktivität des Gewebes blockiert, um eine falsch positive Farbentwicklung nach Zugabe des Chromogens zu verhindern.

- d) Nach erneutem Spülen (5 min mit PBS) werden die restliche Spülflüssigkeit abgeklopft, die Objektträger vorsichtig um das Gewebe herum getrocknet und das Gewebe mit einem Fettstift umkreist. Diese Maßnahme verhindert ein Abfließen der nachfolgend aufgetragenen Antikörperverdünnungen und sorgt so für eine gleichmäßige Färbung und Einsparung von Antikörper.
- e) Das Blocken der Objektträger erfolgt mit 5% NSS für 30 min, um nachfolgend unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers durch zufällig im Gewebe vorhandene, mit dem ersten Antikörper bindende Epitope, oder andere Bindungsarten (z.B. hydrophobe Wechselwirkungen) weitgehend auszuschließen.
- f) Die Blocklösung wird ohne Spülen lediglich abgeklopft und der erste Antikörper sofort in geeigneter (in Vorversuchen bestimmter) optimaler Verdünnung in PBS einzeln auf jeden Dünnschnitt aufgebracht und so für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.
- g) Nach Waschen in Brij für ca. 10-15 min wird der Brückenantikörper aufgetragen. Dieser wurde zuvor mit 1/5 NHS, im Fall des monoklonalen Antikörpers mit 1/5 FCS + 1/5 NHS absorbiert, um eine unspezifische Bindung an menschliches Gewebe bzw. an das im monoklonalen Erstantikörper vorhandene FCS zu verhindern. Inkubation für 20-30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
- h) Nach erneutem Waschen in Brij für ca. 10-15 min wird der 3. Antikörper aufgebracht. Dieser stammt aus derselben Tierart wie der erste Antikörper und wird wie dieser vom 2. Antikörper gebunden. Es ist ein Antikörper gegen das Enzym Peroxidase (PAP-Komplex).
- i) Nach Waschen in Brij für ca. 10-15 min werden die OT für ca. 20-25 min in die chromogenhaltige (hier: AEC) Färbelösung (vgl. Abbildung V-7) gebracht.
- j) Nach Waschen für 2 min in destilliertem Wasser werden die Objektträger mit Hämalaun für 15 sec gegengefärbt und in Leitungswasser für ca. 10-15 min gebläut.
- k) Nach Eindecken in Glyceringelatine können die Präparate unter dem Mikroskop beurteilt werden.
- l) Anmerkung: Werden bereits immunhistochemisch gefärbte Schnitte zu Kontrollzwecken nochmals verwendet, werden die Objektträger über Nacht in PBS gestellt, dann die Deckgläser bei 60 °C im Wasserbad vorsichtig abgelöst und die Schnitte noch mal in PBS gewässert. Entfärbt wird für 1 + 4 min in 80% Essigsäure, dann Reäquilibrierung in PBS; Fortfahren mit Schritt e.; Blocken mit NSS. Bei diesem Schritt werden nur die Antikörper entfernt, Kongorot und Hämalaun bleiben erhalten

und werden lediglich etwas geschwächt. Daher erübrigt sich eine Gegenfärbung mit Hämalaun.

m) Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop gegen mitgefärbte Positivkontrollen.

10.3 Western Blot

(TOWBIN et al. 1979)

10.3.1 Prinzip

Das Western Blotting gehört wie die Immunhistochemie zu den Bindungstests und unterliegt denselben Gesetzen (LINKE 1998, Bioanalytik). Es erhielt seine Bezeichnung abgeleitet vom „Southern Blotting“, einem spezifischen DNA-Nachweis durch Hybridisierung, entwickelt vom E.M. SOUTHERN. Beim Western Blotting (TOWBIN et al. 1979) handelt es sich um den spezifischen immunchemischen Proteinnachweis von geelektrophoretisch aufgetrennten und auf eine Membran fixierten Proteinen (vgl. V.6.1).

Das Prinzip ist ähnlich wie bei der Immunhistochemie, nur dass die Antigene statt im Gewebe an eine Nitrozellulosemembran fixiert vorliegen. Auch hier wurde das unmarkierte Antikörpersystem mit PAP-Komplex als Amplifikator verwendet.

10.3.2 Durchführung

Beim Western Blot wurde ausschließlich mit polyklonalen Erstantikörpern gearbeitet.

Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde die Membran für > 1 h bei RT in 0,1% (w/v) Gelatine (Type B, from bovine skin, Sigma, St Louis, USA) in PBS geblockt, um die Teile der Nitrozellulosemembran zu besetzen, auf die keine Proteinbanden elektrotransferiert wurden. Ohne Waschvorgang wurde die Nitrozellulosemembran in den 1. Antikörper überführt (Tabelle V-7) und für ca. 1 h unter leichter Bewegung bei RT inkubiert.

Anti-AL κ (UNK)	1: 6666	Anti-AH γ (SOL)	1: 6666
Anti-AL κ (KRA-UNK)	1: 4000	Anti- λ BJP (HEN)	1: 8000
Anti-AL κ (SIN)	1: 2000	Anti-AL λ (LAT)	1: 3333
Anti- κ BJP (KLL)	1: 6666		

Tabelle V-7: Verwendete Antikörperverdünnungen im Western Blot

Anschließend erfolgte ein Waschvorgang mit 0.05% TWEEN (Sigma, München) in PBS für 2 x 5 min, dann die Inkubation mit dem NHS-absorbierten Brückenantikörper (vgl. V.10.1.) in der Verdünnung 1:50 für 20 min unter leichter Bewegung. Nach erneutem Waschen mit

0.05% Tween in PBS für 2 x 5 min wurde die Nitrozellulosemembran für 30 min dem 1:2000 verdünnten Peroxidase-gekoppelten 3. Antikörper ausgesetzt.

(Beim monoklonalen System müssen folgende Verdünnungen eingesetzt werden: 1. AK: 1/10, 2. AK 1/20 + 1/5 NHS + 1/5 FCS, 3. AK 1/30 PAP.)

Es folgte wieder ein Waschvorgang mit 0.05% Tween in PBS für 2 x 5 Minuten, dann die Färbung mit dem unmittelbar vorher angesetzten

- Chromogen:

O-Dianisidin-di-Hydrochlorid (Sigma)	0.04 g
Na-Nitroprussid (Sigma)	0.1 g
H ₂ O (a. dest.)	ad 100 ml
30% H ₂ O ₂	33 µl (Zugabe kurz vor dem Färben)

Nach ca. 2-5 min wurden die angefärbten Banden deutlich sichtbar, woraufhin die Reaktion durch Spülen mit a. dest. gestoppt, und die Membran bei RT getrocknet wurde.

11. Amidoschwarzfärbung

Im Ouchterlony-Test erzeugte Präzipitationslinien können haltbar gemacht werden indem man das auf Gel-Bond fixierte und getrocknete Agarosegel mit dem Wollfarbstoff Amidoschwarz anfärbt, wodurch die kreuzvernetzten Antigen-Antikörperkomplexe eine schwarz-blaue Farbe erhalten. Dazu wird das auf Gel-Bond fixierte Agarosegel für ca. 15 min in die Färbelösung (0.1% (m/v) Amidoschwarz 10 (Serva, Heidelberg), 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in a. dest.) eingelegt. Die Differenzierung erfolgt für ca. 15 min in 19% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure in a. dest. Es folgen Lufttrocknung und Archivierung.

12. Kongorotfärbung

(PUCHTLER et al. 1962)

Die Kongorotfärbung ist der Goldstandard zum Nachweis von Amyloid. Kongorot lagert sich an die Amyloidfibrillen an (Abbildung I.1) und verleiht ihnen eine charakteristische grüne Doppelbrechung im linear polarisierten Licht. Der Anteil an kongophilem Material kann dann mikroskopisch semiquantitativ abgeschätzt werden.

Benötigte Stammlösungen:

- Puchtler I: 80% Ethanol in gesättigter NaCl-Lösung
- Puchtler II: 80% Ethanol in gesättigter NaCl-Lösung und gesättigter Kongorotlösung

Auf Objektträger aufgezogene Paraffinschnitte wurden zunächst für 1 h bei 60 °C im Wärmeschrank inkubiert, dann mit Xylol für 2 x 5 min bei RT entparaffiniert, über eine

absteigende Alkoholreihe (90% Ethanol für 2 min und 80% Ethanol für 2 min) geführt, 1-2 min bei 60 °C getrocknet und anschließend gefärbt. Nicht in Paraffin eingebettetes Material (aus dem Gewebe isoliertes Protein sowie Quetschpräparate) wurde für 2 x 5 min bei RT in Aceton fixiert und entfettet, getrocknet und dann gefärbt.

Für die Kongorotfärbung wurden die Objektträger für 20 min in gefiltertes Puchtler I + 1% 0.1 N NaOH (bzw + 1⁰/₀₀ 0.1 N NaOH für isolierte Proteine) gelegt, dann für 20 Minuten in gefiltertes Puchtler II + 1% 0.1 N NaOH. Zur Differenzierung (Ethanol wäscht Kongorot aus Kollagen und Elastin eher aus als aus Amyloid) wurden die OT in 100% Ethanol für 10-15 sec kurz gewaschen, dann mit a. dest. 3 x für je 5-10 sec gespült. Gewebeschnitte wurden mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Die Objektträger wurden in Kaisers Glycerin-gelatine eingedeckt und dann im Durchlicht, polarisiertem und fluoreszentem Licht (LINKE 2000) ausgewertet.

13. Herstellung von Antikörpern im Kaninchen

Um ein gegen ALK₁ (UNK) gerichtetes Antiserum zu erhalten, wurden die aus dem Gewebe isolierten Amyloidfibrillen Kaninchen injiziert.

Da Amyloid ein fibrilläres, nahezu inertes Polymer aus aneinandergereihten β -konfigurierten Einzelproteinen identischer Konformation darstellt (vgl. Abb. I-1), ist es nach lediglichem Suspendieren in Wasser kein Immunogen: Die fibrilläre Struktur muss denaturiert werden, damit das Immunsystem reagiert. Dazu kommen im Wesentlichen drei Möglichkeiten in Frage: Denaturierung in 6 M Guanidin-HCl mit anschließendem Dialysieren und Lyophilisieren, Reduzieren und Alkylieren, oder Denaturieren durch Lösen in 0.1 N Natronlauge. Letzteres Verfahren wurde hier angewendet.

Um die Immunantwort des immunisierten Tieres zu verstärken, kann man das denaturierte Protein zusammen mit einem Adjuvans injizieren, indem man es beispielsweise in Mineralöl mit einer aus Bakterienzellwänden stammenden Lipidhülle emulgiert.

Außerdem sollte das Antigen möglichst generalisiert mit geeigneten Injektionsschemata in die verschiedenen Lymphareale und nahe an den Sitz immunkompetenter Zellen (Langerhanszellen der Haut, Lymphknotenstationen mesenterial, zervikal, axillär, inguinal, paraaortal) gebracht werden.

Aufbereitung des Antigens

Verwendet wurden die aus dem Gewebe extrahierten Amyloidfibrillen mit einer Reinheit von > 95% in der Kongorotfärbung.

2000 µg Protein wurden abgewogen und mit 200 µl 1 N NaOH denaturiert. Anschließend wurden 600 µl PBS zugegeben und mit 200 µl 1 N HCl neutralisiert. Diese Stammlösung (Konzentration: 2 mg/ml) ist bei -20 °C im Kühlschrank Monate haltbar.

Am Tag der Immunisierung wurde komplettes Freund's Adjuvans (Adjuvant Complete Freund, 0638-59 Bacto, Difco laboratories Detroit Michigan USA) im Verhältnis 1+1 zur Stammlösung zupipettiert (Endkonzentration: 1 mg/ml).

Das Gemisch wurde mit einer 2 ml-Spritze mit aufgesetzter 12 G-Nadel so lange emulgiert, bis die Emulsion undurchsichtig weiß und sahnartig steif war. In diesem Zustand läuft ein auf eine Wasseroberfläche aufgetragener Tropfen nicht mehr auseinander, sondern gibt nur langsam Material aus seinen Randschichten ab. Diese Tatsache kann als Test auf ausreichende Emulgierung herangezogen werden.

Für die folgenden Booster-Immunisierungen wurden die Amyloidfibrillen analog aufbereitet, statt mit CFA jedoch mit IFA (Adjuvant Incomplete Freund, Difco laboratories, Detroit Michigan USA) emulgiert.

13.1 Immunisierung

Zur Erstimmunisierung der Kaninchen wurde das Antigen streng intrakutan an ca. 20 Stellen beiderseits am Rücken, etwa zwischen hinterer Axillar- und Medioscapularlinie, sowie zervikal und inguinal mittels feiner 27 G-Nadel in Portionen zu 5-10 µl appliziert (ca. 100 µl entsprechend 100 µg pro Tier). Dabei muß von Verlusten bis ca. 30% ausgegangen werden, da ein Teil der Emulsion in Behältnis bzw. Kanüle zurückbleibt sowie über den Stichkanal wieder nach außen abfließt.

Nach ca. 1-4 Wochen zeigten sich bei einigen Kaninchen Hautknoten von etwa 0.5 cm, selten bis zu 1 cm Durchmesser an etwa der Hälfte der Injektionsstellen, was als Zeichen der Immunantwort gilt. In keinem Fall wurde ein Aufbrechen oder eine Infektion dieser Knoten beobachtet. Die Boosterimmunisationen erfolgten subkutan an ca. 8 Stellen am Rücken, zusätzlich intramuskulär und an etwa 2 Stellen in die paravertebrale Muskulatur. Die Boosterung wurde etwa alle 8 Wochen mit 100-400 µg Protein (Trockengewicht) wiederholt.

13.2 Blutabnahmetechnik

Das Kaninchen wird auf eine feste Unterlage gesetzt und durch behutsames, aber festes Streicheln über den Rücken beruhigt und in eine Bauchlage gebracht (vgl. Totstellreflex).

Sobald das Kaninchen die gewünschte Position einnimmt, entfernt man die Hände. Sollte das Kaninchen seine Position verändern oder sich aufzusetzen versuchen, wird es sofort wieder

ruhig und bestimmt in die Bauchlage gedrückt. Erfahrungsgemäß merkt sich das Kaninchen schnell, dass es durch ruhiges Verhalten dem Zugriff des Untersuchers entgehen kann. Sehr förderlich ist dabei eine reizarme Umgebung: Stille im Raum, ruhige Bewegungen des Untersuchers und Monotonie beim Beklopfen des Ohres während der Blutabnahme.

Die Blutabnahme erfolgt aus der median über die Dorsalseite des Ohres verlaufenden Arterie. Entlang dieser wird eine ca. 2 x 2 cm große Fläche mit dem Skalpell rasiert. Durch rhythmisches Beklopfen der Arterie, z.B. mit einem Stift, wird das Ohr hyperämisiert, was sich in einer deutlichen Zunahme des Arterienmessers zeigt. Nach Hautdesinfektion wird möglichst peripher mit dem Skalpell ein kleiner Schnitt quer durch das obere Drittel des Arterienmessers gelegt. In diesem Moment darf das Kaninchen kurz reagieren, lässt sich nach der kurzen Schrecksekunde aber wieder problemlos in die Ruheposition bringen, so dass mit der Blutabnahme begonnen werden kann.

Unmittelbar nach der Inzision zeigt die Arterie für kurze Zeit eine reflektorische Vasokonstriktion, die sich durch rhythmisches Beklopfen des Ohres proximal der Inzision nach 1-10 min löst. Das aus der Arterie tropfende, bald im Strahl schießende Blut wird in einem distal der Inzision an das Ohr gehaltenen 50 ml Röhrchen aufgefangen. Abhängig vom Vegetativum des Kaninchens (Vasodilatation) und guter „Führung“ durch den Untersucher dauert ein Aderlass von 30 ml ca. 10-25 min. Anschließend wird die Arterie proximal des Schnitts so lange manuell komprimiert, bis die Blutung sicher steht. Die Arterie ist im Übrigen nach ca. 1-2 Wochen wieder rekanalisiert, so dass insgesamt eine größere Anzahl von Blutentnahme pro Kaninchen möglich ist, wenn diese einmal pro Monat durchgeführt werden.

Diese Technik stellt eine sichere und für die Tiere äußerst schonende Methode der Blutabnahme dar: Das Kaninchen läuft nicht Gefahr, sich Wirbelsäulenverletzungen oder Knochenbrüche zuzuziehen, wie es manchmal passiert, wenn die Tiere in enge Käfige gesperrt werden und sich darin panikartig aufbäumen. Da das Kaninchen jederzeit die Möglichkeit hat zu reagieren, z.B. beim Anschnitt der Arterie, ist auch die psychische Belastung geringer. Dies macht sich insbesondere durch den beim entspannten Kaninchen (im Gegensatz zur Käfigeinsperrung) deutlich verminderten Sympathikotonus dadurch positiv bemerkbar, dass die Ohrarterie leicht weitgestellt werden kann und der Blutfluss entsprechend gut ist. Wie groß der Einfluss der Steigerung der sensorischen Afferenz auf das Vegetativum ist, erkennt man am Arterienmesser, wenn beim plötzlich erschreckten Kaninchen (Besucher betritt den Raum) der Blutfluss sistiert um nach Rückkehr des Kaninchens in seine Ruhelage innerhalb von Sekunden wieder rasch zuzunehmen. Sowohl auf vermehrten Sympathikotonus als auch auf lokale Transmitterfreisetzung ist wohl der initiale reflektori-

sche starke Vasospasmus unmittelbar nach Inzision der Arterienwand zurückzuführen, der sich nicht spontan sondern erst durch Beklopfen des Ohres innerhalb weniger Minuten vollständig löst.

13.3 Serumgewinnung

Das Vollblut lässt man bei RT für ca. 2 h gerinnen, löst mit dem Spatel manchmal wandadhärente Fibrinfäden und stellt das Blutröhrchen über Nacht bei 4 °C in den Kühlschrank, so dass sich der Blutkuchen weiter retrahieren und vom Serum absetzen kann. Der Blutkuchen stellt charakteristischerweise einen in Höhe und Durchmesser geschrumpften Abguss des Röhrchens dar, wobei die obersten 2 mm als Ausdruck der im Fortgang der Gerinnung bereits einsetzenden Blutsenkung aus Fibrin bestehen können und gelblich-glasig-weiß erscheinen (bei kranken Tieren mit entsprechend erhöhten Blutsenkung zeigt sich entsprechend eine an Höhe vermehrte „Crusta phlogistica“). Nach Zentrifugation bei 1800 rpm für 10 min wird das Serum in 15 ml-Röhrchen pipettiert und diese bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, um eventuell überpipettierte Zellreste und verbliebene Blutplättchen zu sedimentieren. Die Potenz des gewonnenen Antiserums wurde in der zweidimensionalen Immundiffusion bzw. in mehreren Verdünnungsstufen in der Immunhistochemie abgeschätzt. Unspezifitäten wurden, falls für den jeweiligen Verwendungszweck erforderlich, mit NHS absorbiert. Die Lagerung des Serums erfolgt in 50 ml-Kulturflaschen bei -20 °C. Die Haltbarkeit beträgt > 20 Jahre.

14. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel

Die Spaltung im Gel erfolgte im Wesentlichen nach ECKERSKORN und LOTTSPEICH (1990). Zur Gewinnung von überlappenden Proteinbruchstücken mit dem Ziel der nachfolgenden Aminosäuresequenzierung wurden die Endopeptidasen Trypsin und Asp-N eingesetzt. Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin. Asp-N hydrolysiert Peptidbindungen N-terminal von Asparaginsäure.

Benötigte Reagenzien und Lösungen

doppeltkonz. Spaltpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.5
einfacher Spaltpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8.5
DTT-Lösung	10 mM DTT gelöst in doppeltkonz. Spaltpuffer
Iodacetamid-Lösung	50 mM Iodacetamid gelöst in doppeltkonz. Spaltpuffer
Trypsin-Lösung	0,2 µg Trypsin (Roche) in 150 µl einfachem Spaltpuffer
AspN-Lösung	0,2 µg AspN (Roche) in 150 µl einfachem Spaltpuffer

10%-ige Ameisensäure

10% (v/v) Ameisensäure in H₂O**Durchführung**

Die zu analysierenden Proteinbanden wurden aus präparativen, mit kolloidalem Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit dem Skalpell ausgeschnitten, zu 1 mm³ - Würfeln zerkleinert und dann (nach Banden C 713/714 IV 1-6 getrennt im Falle der Trypsinspaltung bzw. alle Banden zusammen im Falle der Asp-N-Spaltung) den unten angegebenen Schritten unterzogen. Die dabei gesammelten Überstände wurden zusammenpipettiert und in der Speed-Vac (Vacuum concentrator, Bachofer, Reutlingen) bei RT eingengt.

	Zeitprotokoll	Inkubationslösung	Überstand
	kurz / RT	mit Acetonitril waschen	verwerfen
	kurz / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	5 min / RT	in doppeltkonz. Spaltpuffer inkubieren	verwerfen
	1 min / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	5 min / RT	in doppeltkonz. Spaltpuffer inkubieren	verwerfen
	1 min / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	kurz	mit Acetonitril waschen	verwerfen
	30 min / 60 °C / Thermoschüttler	in DTT-Lösung inkubieren	verwerfen
2x	1 min / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	15 min / RT	in Iodacetamid-Lösung inkubieren	verwerfen
	kurz / RT	mit Acetonitril waschen	verwerfen
	5 min / RT	in doppelt konzentriertem Spaltpuffer inkubieren	verwerfen
	1 min / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	5 min / RT	in doppeltem Spaltpuffer inkubieren	verwerfen
2x	1 min / RT	in Acetonitril inkubieren	verwerfen
	10 min / 37 °C	ohne Lösung inkubieren	
	14 h / 37 °C / Thermoschüttler	mit Enzymlösung spalten: in einfachem Spaltpuffer mit Enzym im Verhältnis 1:10 inkubieren	
2x	5 min / RT	in Acetonitril inkubieren	sammeln
	10 min / RT	in 10%-iger Ameisensäure inkubieren	sammeln
	5 min / RT	in Acetonitril inkubieren	sammeln
	10 min / RT	in 10%-iger Ameisensäure inkubieren	sammeln
	5 min / RT	in Acetonitril inkubieren	sammeln

Tabelle V-8: Arbeitsschritte bei der enzymatischen Spaltung von Proteinen im Gel. Anmerkung: Das Volumen (hier ca. 50 µl) für die Inkubationsschritte wählt man nach der Menge der Gelstückchen und behält es für die ganze Prozedur bei. Lediglich für die enzymatische Spaltung wurden, da diese über mehrere Stunden erfolgte, 150 µl eingesetzt, um ein Austrocknen der Probe zu verhindern. Als Anhaltspunkt für die einzusetzende Enzymmenge kann ein Verhältnis von 1:10 – 1:20 (m/m) zur eingesetzten Proteinmenge gelten. Der Überstand wird nach jedem Vorgang mit der Pipette abgenommen. Bei den letzten 6 Schritten muss jeweils gut gemischt (z.B. mit Vortex-Gerät) werden.

Die jeweils erhaltenen Peptidgemische wurde für einen ersten *Massen-fingerprint* direkt zur Massenspektrometrie weitergeleitet („Spalt-Mix“) und mittels HPLC aufgetrennt.

Durch Alkylieren mit Iodacetamid werden Cysteinreste carboxyamidomethyliert, was massenspektrometrisch zu einer Massenzunahme von +57 Dalton für jedes Cystein (C) führt.

Die Spaltung im Gel wurde von Herrn Reinhard Mentele und Frau Dr. Mathes (Abteilung Kellermann / Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

15. Direkte enzymatische Spaltung des isolierten Proteins

Diese Methode lässt sich sinnvoll nur anwenden, wenn das Ausgangsmaterial in seiner Zusammensetzung relativ homogen ist, d.h. nur ein Protein bzw. Fragmente eines einzigen Vorläuferproteins enthält.

Hier wurde ein Aliquot von lyophilisiertem, säulenchromatographisch aufgereinigtem Protein (reduziert mit DTT, alkyliert mit Iodacetat) eingesetzt. Ca. 5 mg des Proteins (C 713/714 IV) wurden in 200 µl a. bidest. gelöst. 20 µl davon wurden abgenommen und folgende Reagenzien hinzupipettiert:

- 100 mM Tris 10 mM CaCl₂, pH 7.8 (einfacher Spaltpuffer) 100 µl
- 25 µg Chymotrypsin aus dem Rinderpankreas (Roche), gelöst in 2 µl
100 µl 1 mM HCl (gegen Autolyse des Enzyms saures Milieu)
(entspricht einer Konzentration von 0.25 µg/µl Chymotrypsin)

Der Verdau erfolgte bei 37 °C auf dem Thermo-Schüttler und wurde nach 4,5 h durch Zugabe von 15 µl 50% TFA abgestoppt.

16. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Auftrennung der Peptidgemische aus den enzymatischen Spaltungen mit Trypsin, Asp-N und Chymotrypsin sowie zur Auftrennung der Säulenfraktion C 713/714 IV in „natürliche Fragmente“ ohne vorherige enzymatische Spaltung wurde eine Mirko-HPLC (Sycam, Fürstfeldbruck) eingesetzt. Die eluierenden Peptide wurden manuell gesammelt.

Trennsäule: Luna 3 u C18(2) 150 mm x 1 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Mobile Phase: Solvent A: 0.1 % v/v TFA in Millipore-Wasser

Solvent B: 0.08 % v/v TFA in Acetonitril

Gradient: linear

Zeit [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
0	100	0
120	40	60

Flussrate: 60 µl / min

Detektion: 210 nm an Monitor und Schreiber (KIPP & ZONEN BD 40)

Injektion: - für die Peptide aus der Spaltung im Gel:

150 µl (Probe wurde in 5 % v/v Ameisensäure gelöst)

- für die Peptide aus der direkten Spaltung der lyophilisierten Proteine:

100 µl (20 µl Spaltgemisch versetzt mit 80 µl 10%-iger Ameisensäure)

Die HPLC-Trennkurven der separat tryptisch gespaltenen Banden 1-6 aus Säulenfraktion C 713/714 IV wurden miteinander verglichen. Ausgewählte HPLC-Peaks der tryptischen Spaltung von Bande 3 aus C 713/714 IV, sowie aus der Asp-N- und der chymotryptischen Spaltung der gesamten Säulenfraktion C 713/714 IV wurden sequenziert (V.17) und den sequenzierten Peaks zugehörige Massen massenspektroskopisch ermittelt (V.18). Ebenso wurden über die HPLC aufgetrennte in C 713/714 IV natürlich vorhandene Fragmente aminoterminal sequenziert.

Die HPLC wurde von Herrn Reinhard Mentele bedient.

17. Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden auf Immobilon geblottete Proteinbanden (aminoterminal Ansequenzierung zur Bestimmung der Proteinklasse) bzw. die aus der enzymatischen Fragmentierung resultierenden und durch HPLC aufgetrennten Peptide (Ermittlung der vollständigen Aminosäuresequenz) bzw. durch HPLC aufgetrennte, in C 713/714 IV natürlich vorhandene Fragmente (aminoterminal Ansequenzierung der Fragmente) eingesetzt. Die HPLC-Fractionen wurden vor der Sequenzierung auf eine TFA-behandelte Glasfasermembran aufgetropft und mit Argon getrocknet.

Die Aminosäuresequenzanalyse nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (s. LOTTSPREICH 1998) wurde an einem PROCISE™ 492A-Gasphasensequenzersystem (PE Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die dafür benötigten Reagenzien und Lösungen wurden von der Firma bezogen. Die nach Durchlaufen des Reaktions- und Konvertierungskompartment des Sequenzers entstandenen Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäuren wurden online an einem

angeschlossenen HPLC-System (ebenfalls PE Biosystems) bei 269 nm detektiert. Die Sequenzierungen wurden von Herrn Reinhard Mentele durchgeführt.

18. Massenspektrometrie

Die MALDI-MS-Spektren (Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie) wurden mit dem 4700 Proteomics Analyzer („MALDI-TOFTOF“) von Applied Biosystems, α -Matrix (α -Cyano-4-Hydroxy-Cinnamic-Acid), Positivmode, Reflectormode mit einer Reflektorspannung von 14 kV und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, 355 nm Feststoff-Nd-YAG-Laser aufgenommen.

Massenspektrometrisch untersucht und verglichen wurde die Spaltnixe der Banden 1-6 von C 713/714 IV. Außerdem wurden für alle sequenzierten HPLC-Peaks nach enzymatischer Spaltung die zugehörige Massen ermittelt.

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Frau Monica Zobawa (Abteilung Kellermann / Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die Auswertung der massenspektrometrisch errechneten Daten und Vergleiche mit den aus der Aminosäuresequenz tatsächlich erwarteten Massen erfolgte computerunterstützt (ProMac).

19. Mikroskopie

Die histologischen Präparate wurden an einem Durchlichtmikroskop der Firma Carl Zeiss, Jena beurteilt. Zur Beurteilung der grünen Doppelbrechung wurden die integrierten Polfilter eingesetzt. Für die Fluoreszenzanregung wurde das Filtersystem BP 450-490 nm (Absorptionsmaximum), FT 510 nm (dichroischer Spiegel) und LP 520 nm (Emission) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem halbautomatischen angeschlossenen Fotosystem (Kamera C35M, Carl Zeiss, Jena). Film: Kodak EPJ 326 T 36 ASA 320 bei Vergrößerungen von: Objektiv: 6.3x/16x, Okular 8x, Kamerafaktor des Fotoaufsatzes 1.25x. Die erhaltenen Dias wurden eingescannt (Dimage Scan Multi II Minolta) und die erhaltenen digitalen Bilder im Falle der Abweichung des resultierenden Farbtons vom Eindruck bei mikroskopischer Betrachtung entsprechend mit Adobe Photoshop 7.0 nachbearbeitet, um ein realistisches Bild wiederzugeben.

20. Dokumentation

Die SDS-Gele wurden mittels Polaroid-Durchlicht-Fotografie (Film: Polaroid black & white Type 667 3 ¼ x 4 ¼ Inch, Sigma) festgehalten. Zum Teil wurden die Gele direkt eingescannt. Alle Gele wurden getrocknet und aufbewahrt.

Western Blots wurden eingescannt und archiviert.

Alle Ouchterlony-Ergebnisse wurden zeichnerisch festgehalten, z.T. wurden die Ouchterlony-Agarosegele auf Gel-Bond getrocknet, mit Amidoschwarz gefärbt und archiviert, bzw. mit einer Minolta-Kamera (Film: Kodak EPT 160 T) fotografiert und die Dias eingescannt.

VI. Ergebnisse

1. Amyloidnachweis und erste immunhistochemische Untersuchungen am Paraffinschnitt

Gewebeschnitte aus einem Unterhauttumor der Patientin UNK waren an unser Labor geschickt worden mit der Fragestellung, ob es sich dabei um einen Amyloid-haltigen Tumor handelt bzw. wenn ja, welche Art von Amyloid hier thesauriert wird.

Um Amyloid nachzuweisen, wurden die auf OT aufgezogenen Paraffinschnitte einer Kongrot-Färbung unterzogen und das Ergebnis mikroskopisch ausgewertet. Es zeigten sich grobschollige Amyloidablagerungen, erkennbar an der typischen grünen Doppelbrechung unter polarisiertem Licht, umgeben von relativ zellarmem Subkutangewebe (Abbildung VI-6). Danach handelt es sich bei dem Tumor um ein Amyloidom.

Zur Klärung der Identität des thesaurierten Proteins wurden die bis dahin erfolgreich zur immunhistochemischen Amyloidklassifikation im Labor verwendeten Routine-Antiseren eingesetzt, sowie zusätzlich Anti-HCD. Tabelle VI-1 zeigt das Ergebnis der initialen immunhistochemischen Färbung von A (UNK):

IP-Nr.	Antikörper	Code	Verdünnung	Referenz	Reaktion
584-16	Anti-AA (mc)	mc	1:30	LINKE 1984	0
584-17	Anti-AL λ (HAR)	936	1:1000	LINKE et al. 1986	0
584-18	Anti-AL λ (ULI-LAT)	702 + 1049	1:2000	LINKE et al. 1986	0
584-19	Anti-AL κ (SIN)	880	1:4000	LINKE 1982	0 - (+)
584-20	Anti- κ BJP (MIX: SMI ₁ /KOC ₄ /GIN ₃ /TEW ₂)	803 + 801 + 805 + 556	1:10000	SCHRÖDER et al. 2000	0
584-21	Anti-ATTR (TIE)	831	1:800	LINKE 1982	0
584-22	Anti-A β ₂ M (WOE)	975	1:800	LINKE et al. 1989	0
598-23	Anti-HCD γ ₁	849 + 850	1:1000	unveröffentlicht	0 - +++ (wenige Stellen)
598-24	Anti-HCD γ ₃	851 + 852	1:1000	unveröffentlicht	0 - +++ (mehrere Stellen)

Tabelle VI-1: Immunhistochemische Färbung des Amyloids (UNK) mit den routinemäßig im Labor zur Amyloidklassifikation eingesetzten Antikörpern sowie erweitertem Antikörperspektrum (Anti-HCD).

Keiner der verwendeten Antikörper zeigte eine spezifische Reaktion mit den Kongrot-positiven Amyloiddeposits. Da auch das klinische Bild der Patientin UNK keinen sicheren Hinweis auf die Natur des Vorläuferproteins bot, wurde zunächst die Diagnose „subkutane noduläre Amyloidose unbekanntem Typs“ gestellt.

Um dennoch die für die weitere Therapie ganz entscheidende Frage nach dem Vorläuferprotein der Amyloidablagerungen klären zu können, wurde der Weg der chemischen Amyloid-Klassifizierung beschrrieben. Dazu musste das amyloidogene Protein aus dem Gewebe extrahiert (VI.2.), isoliert (VI.3.) und sequenziert (VI.4.) werden.

2. Amyloidextraktion aus dem Gewebe

Die Amyloidextraktion erfolgte nach der von PRAS et al. beschriebenen Methode (vgl. Methodenteil). Im Verlauf dieser Arbeit war es nötig, Extraktionen aus insgesamt drei Unterhauttumoren (Amyloidomen) durchzuführen (Tabelle VI-2), um genügend Ausgangsmaterial für nachfolgende Untersuchungen zu erhalten:

Extraktions-Nr. / Datum	Masse des Tumors	davon eingesetzt
AM 122 (3/99)	1,88 g	1.88 g
AM 123 (10/99)	11.5 g	8.87 g
AM 125 (10/00)	22 g	19.67 g

Tabelle VI-2: Durchgeführte Amyloidextraktionen

Das nicht verwendete Material wurde bei - 20 °C eingefroren.

A. Makroskopische Beschreibung der Amyloidome

Alle drei Exzisate zeigten einen jeweils > 50 % des Gewebestückes einnehmenden, zentralen Bezirk von homogen-speckiger Konsistenz und beiger Farbe (Amyloidablagerungen), der in blutig tingiertes, retikulär erscheinendes Gewebe (subkutanem Binde- und Fettgewebe entsprechend) eingebettet war.

B. Makroskopische Befunde im Verlauf der Amyloidextraktion

Da prinzipiell alle Extraktionen in gleicher Weise verliefen, werden im Folgenden nur die Befunde von Extraktion AM 125 beispielhaft dargestellt.

PBS-Extraktion: Das Waschen des homogenisierten Gewebes mit PBS dient dazu, PBS-lösliche Gewebe- und Serumproteine von den in PBS weitgehend unlöslichen Amyloidfibrillen abzutrennen. Dies ließ sich makroskopisch gut anhand der dekantierten PBS-Überstände nachvollziehen:

	Farbe, Trübung, Lipidanteil
1. PBS-Ü	altrosa, undurchsichtig trüb, ca. 1 mm dicker Lipidfilm bedeckt den Überstand
2. PBS-Ü	fleischfarben, trüb, größere Lipidflocken auf dem Überstand
3. PBS-Ü	fleischfarben, eben durchsichtig, kleine Lipidflöckchen
4. PBS-Ü	leicht fleischfarben, durchsichtig, kein Lipid
5. PBS-Ü	fast farblos, durchsichtig, kein Lipid
6. PBS-Ü	farblos, makroskopisch klar
7. PBS-Ü	farblos, makroskopisch klar
8. PBS-Ü	farblos, makroskopisch klar (photometrische Absorption bei 280 nm < 0.05)

Tabelle VI-3: Makroskopischer Aspekt der PBS-Überstände

Die photometrische Absorption des 8. PBS-Überstandes von < 0.05 gegenüber dem Leerwert (PBS) bei 280 nm zeigte die erfolgreiche, weitgehende Elimination aller PBS-löslichen Proteine.

Wasser-Extraktion: Die sich anschließende Wasser-Extraktion dient dazu, die in entmineralisiertem Wasser erfahrungsgemäß aufquellenden Amyloidfibrillen nun selektiv (über die abnehmende Dichte) in den Überstand aufsteigen zu lassen, während Strukturproteine wie etwa Kollagen und Elastin weiterhin im Sediment verbleiben. Die Konzentration der Amyloidfibrillen (vgl. Tabelle VI-7) in den H₂O-Überständen korreliert dabei gut mit einer schon makroskopisch erkennbaren, opaquen bis milchigen Trübung:

	Farbe, Trübung
1. H ₂ O-Ü	eben erkennbare milchige Trübung (bei geringem Restsalzgehalt)
2. H ₂ O-Ü	kräftige milchige Trübung, fast undurchsichtig
3. H ₂ O-Ü	kräftige milchige Trübung, fast undurchsichtig
4. H ₂ O-Ü	kräftige milchige Trübung, durchsichtig, Schlieren
5. H ₂ O-Ü	turbide, durchsichtig, Schlieren
6. H ₂ O-Ü	leicht turbide, Schlieren
7. H ₂ O-Ü	leicht turbide
8. H ₂ O-Ü	fast klar

Tabelle VI-4: Makroskopischer Aspekt der H₂O-Überstände

Pellet: Auch die Beschaffenheit des Pellets veränderte sich im Laufe der Amyloidextraktion und wurde dokumentiert. Auffällig war eine bereits nach Dekantieren des 2. PBS-Überstandes mit bloßem Auge erkennbare Dreischichtung:

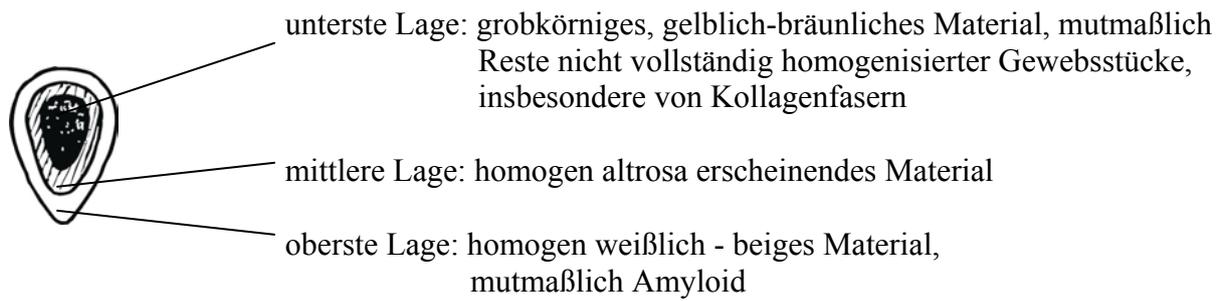


Abbildung VI-1: Makroskopischer Aspekt des Pellets nach Dekantieren des 2. PBS-Ü

Mit fortschreitender PBS-Extraktion wurde diese Schichtung zunehmend deutlicher. Zwischen der unteren und der mittleren Lage zeigte sich ferner ein sehr feiner schwarzer Saum. Dieser entspricht am ehesten durch die Hochgeschwindigkeits-Homogenisation verkohlten Proteinen.

Während der H₂O-Extraktion nahm die oberste Schicht des Pellets mit jedem Extraktionsschritt im Verhältnis zum Restpellet überproportional an Menge ab, was für die hauptsächliche Lokalisation des Amyloids im oberen Pelletanteil spricht.

C. Amyloidgehalt innerhalb der Pelletanteile und im Lipidüberstand

Um den Amyloidgehalt in den drei Pelletschichten sowie im Lipidüberstand abzuschätzen, wurden nach Dekantieren und Einfrieren des 2. PBS-Überstandes je ca. 1 mm³ große, repräsentative Proben mit dem Skalpell entnommen, in 10 % NHS auf OT aufgetrocknet, mit Kongorot gefärbt und mikroskopisch unter polarisiertem Licht beurteilt (Tabelle VI-5).

Fraktion	grüne Doppelbrechung	geschätzter Gehalt an Amyloid	sonstiges Material
Ablagerungen auf dem Überstand	+	70%	Lipidtröpfchen
obere Pelletschicht	+	100 %	
mittlere Pelletschicht	+	70%	Zelldetritus
unterste Pelletschicht	+	20%	Kollagenfasern, Zelldetritus

Tabelle VI-5: Amyloidanteil nach Kongorotfärbung der sedimentierten Strukturproteine nach dem zweiten Waschen mit PBS.

Amyloid findet sich in hochreiner Form in der obersten Pelletschicht, durchsetzt aber auch die angrenzenden tieferen Anteile des Pellets und findet sich selbst in der auf dem Überstand

schwimmenden Lipidschicht. Dies lässt auf einen insgesamt sehr hohen Amyloidanteil im verarbeiteten Gewebe schließen.

D. Proteinausbeute und Amyloidgehalt

Ausgewählte (vorher gegen Wasser dialysierte) PBS-Überstände sowie alle H₂O-Überstände wurden lyophilisiert und dann abgewogen. Ein repräsentatives Proteinflockchen aus jedem H₂O-Überstand wurde in 10% NHS auf OT fixiert, mit Kongorot gefärbt und unter polarisiertem Licht betrachtet, um den Amyloidgehalt der einzelnen H₂O-Überstände miteinander vergleichen zu können.

PBS-Extraktions-Nr.	1. PBS	2. PBS	3. PBS	8. PBS
Proteinmenge	496 mg	46 mg	15 mg	18 mg

Tabelle VI-6: Proteinausbeute einzelner PBS-Überstände der Extraktion AM 125

H ₂ O-Extr.-Nr.	1. H ₂ O	2. H ₂ O	3. H ₂ O	4. H ₂ O	5. H ₂ O	6. H ₂ O	7. H ₂ O	8. H ₂ O
Proteinmenge	122 mg	71 mg	354 mg	155 mg	61 mg	59 mg	44 mg	32 mg
Amyloidgehalt	50 %	90 %	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %
sonst. Material	Kollagen	Kollagen						

Tabelle VI-7: Proteinausbeute und Amyloidgehalt der H₂O-Überstände der Extraktion AM 125

Das Restsediment wurde bei - 20 °C eingefroren um es später bei Bedarf nachextrahieren zu können (9. - 12. H₂O-Ü).

Deutlich erkennbar ist die hohe Effizienz der Methode nach PRAS et al. bezüglich der selektiven Anreicherung von Amyloidfibrillen die bei mikroskopischer Betrachtung ab dem 3. H₂O-Überstand in > 99%-iger Reinheit vorliegen (Abbildung VI-6). Dagegen ist die Ausbeute von nur etwa 1 g (gereinigtem) Amyloid bei insgesamt eingesetzten 19.67 g Gewebe mit einem geschätzten Amyloidanteil von 50% als eher gering zu werten. Dies liegt u.a. daran, dass nur die vereinzelt Amyloidfibrillen in den Überstand aufsteigen und die noch am Kollagen gebundenen im Pellet verbleiben.

3. Auftrennung in der SDS-PAGE und Molekulargewichtsabschätzung

Um einen groben Überblick über die sich im Fortgang der Proteinextraktion nach PRAS et al. verändernde Proteinzusammensetzung der PBS- und H₂O-Überstände zu erhalten und die Effektivität des Verfahrens abzuschätzen zu können, wurden ausgewählte PBS- und H₂O-Überstände gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung VI-2).

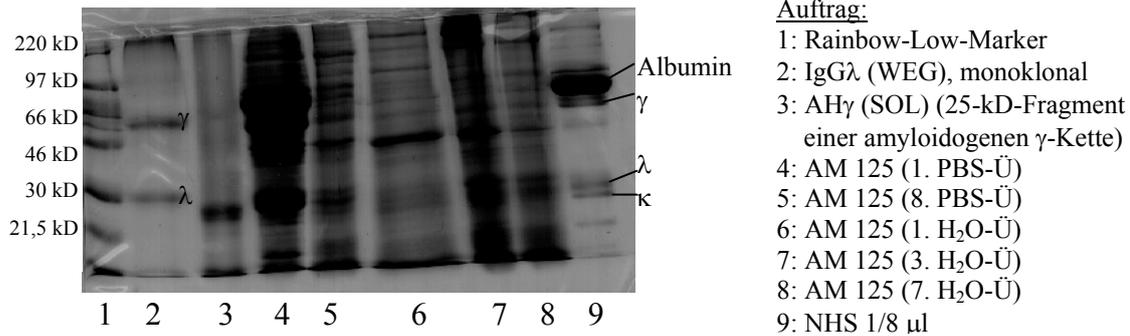


Abbildung VI-2: Darstellung der sich verändernden Proteinzusammensetzung im Verlauf der Amyloidextraktion am Beispiel der Präparation von AM 125 (SDS-PAGE, 10%-iges Gel).

Im Verlauf der Waschvorgänge mit PBS (Auftrag 4 und 5) nimmt der relative Anteil der Proteine mit einem Molekulargewicht von 40-100 kD im PBS-Überstand stark ab, während z.B. die Bandenstärken im Molekulargewichtsbereich > 100 kD weitgehend unverändert bleiben. Dieser Befund ist vereinbar mit der beabsichtigten Auswaschung großer Mengen an gut in PBS löslichen Serumproteinen, insbesondere Albumin, und cytoplasmatischen Proteinen (vgl. dazu Auftrag 4 (1. PBS-Ü) mit Auftrag 9 (NHS)). Beim Übergang von PBS zu den H₂O-Überständen (Auftrag 5 bis 6) verändert sich die relative Stärke der einzelnen Banden wiederum deutlich, abhängig von der PBS- bzw. Wasser-Löslichkeit und -Suspendierbarkeit der einzelnen Proteinfractionen (besonders auffallend ist die Verstärkung der Banden bei ca. 40, 100 und 200 kD im 1. H₂O-Ü: Sie enthalten offenbar ein Protein, das bei geringer Salzkonzentration, wie sie im 1. H₂O-Ü (Salzauswaschung) vorliegt, wesentlich besser löslich ist als in PBS). Aufgrund des Restsalzgehaltes (PBS) ist der Auftrag 6 auch etwas breiter gelaufen. Im weiteren Verlauf der Proteinextraktion (Auftrag 7 bis 8) nehmen die Banden im Bereich von 30 kD und darunter an Stärke zu, während die in Auftrag 6 so prominenten Banden bei 40, 100 und 200 kD nun wieder relativ schwächer werden. Vergleicht man die Molekulargewichtsverteilung der Lyophilisate am Ende der H₂O-Extraktion (Auftrag 7 und 8) mit dem zu Beginn der PBS-Extraktion (4), so ist es mit der Extraktionsmethode nach PRAS et al. gelungen, einen großen Teil der gut PBS-löslichen Proteine v.a. im Molekulargewichtsbereich von 40-100 kD weitgehend zu eliminieren und niedermolekulare, schlecht PBS-lösliche Proteine (mutmaßlich Amyloid) in Molekulargewichtsbereichen v.a. unterhalb von 30 kD im H₂O-Ü selektiv anzureichern.

Mit Hilfe des mitgeführten Molekulargewichtsmarkers (RL) wurde über eine Eichkurve die ungefähre Größe der interessierenden niedermolekularen Proteinbanden bestimmt. Außerdem wurden korrespondierende H₂O-Überstände aller 3 Extraktionen AM 122, AM 123 und AM 125 hinsichtlich der Molekulargewichtszusammensetzung miteinander verglichen:

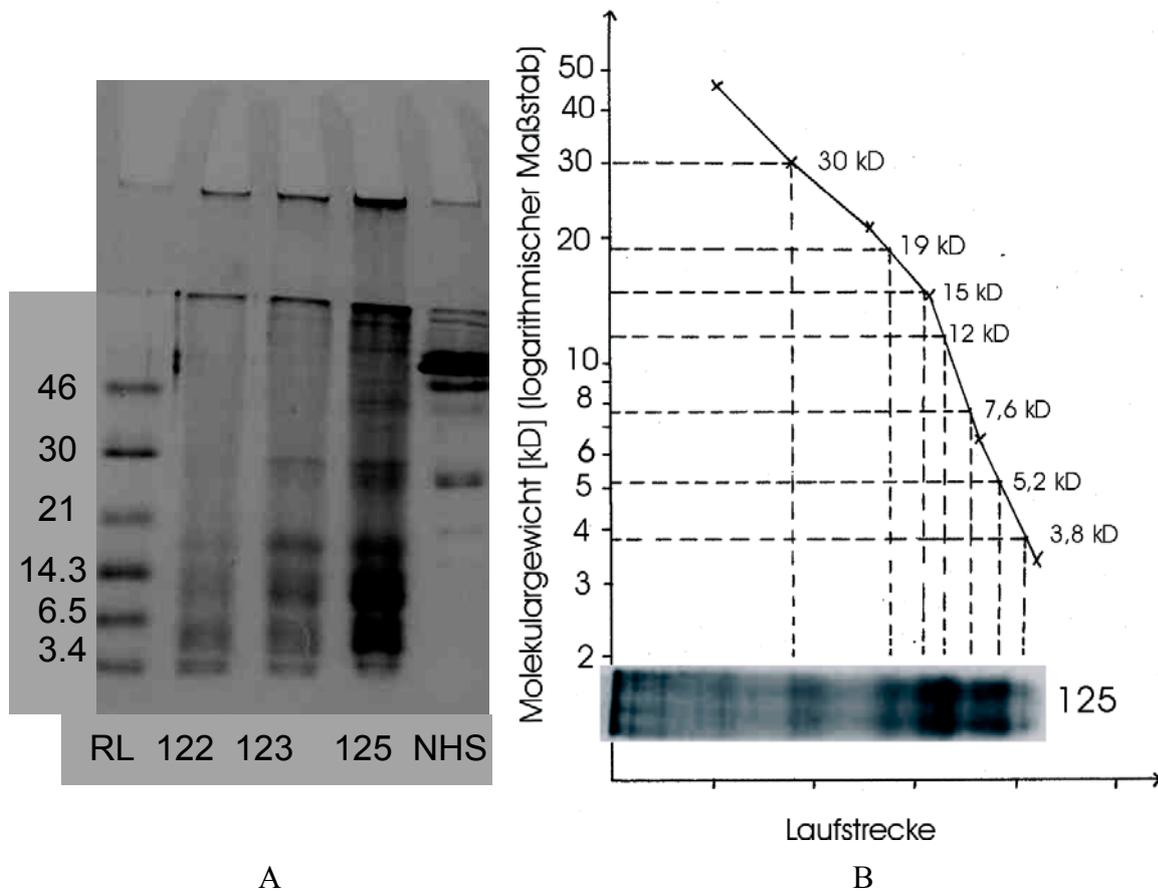


Abbildung VI-3: Vergleich der Extraktionen AM 122, 123 und 125 und MW-Abschätzung der amyloidhaltigen Banden. A: SDS-PAGE (13.5%-iges Gel), von links nach rechts: MW-Marker (RL, Banden entsprechen den angegebenen Molekulargewichten (Ordinate) in kD), Extraktionen AM 122 (7.-11. H₂O-Ü), AM 123 (7. H₂O-Ü), AM 125 (7. H₂O-Ü), normales menschliches Serum (1/8 µl): die Doppelbande bei ca. 25 kD in NHS entspricht den Immunglobulin-Leichtketten κ und λ, die Bande knapp unterhalb von Albumin der schweren Kette γ (ca. 50 kD), wie im Western Blot (s.u.) bestätigt werden konnte. Die Proteinkonzentration von AM 125 ist etwa vierfach so hoch wie die von AM 122 und AM 123. B: Molekulargewichtsabschätzung anhand einer aus den Wanderungseigenschaften bekannter Markerproteine (Rainbow-low-marker) bestimmten Eichkurve (durchgezogene Linie). X-Achse: Laufstrecke der Markerproteine bzw. der untersuchten Banden, Y-Achse: Molekulargewicht [kD]. Es ergeben sich (am Beispiel vom AM 125) die angegebenen Molekulargewichte der interessierenden Banden.

Die H₂O-Überstände aller drei Extraktionen (A) zeigen im Molekulargewichts-Bereich von 3,8-19 kD (B) identische kräftige Bandenmuster, die in der Auftrennung von NHS nicht und auch in den vorausgehenden PBS-Überständen (vgl. Abbildung VI-2) nicht in dieser Intensität vorhanden sind. Da es sich bei der Methode nach PRAS et al. um eine selektive Anreicherung von Amyloid handelt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um die gesuchten Amyloid-Proteine handelt, die gewöhnlich fragmentiert vorliegen (GLENNER et al.1970).

Die höhere Proteinkonzentration (und damit erhöhte Empfindlichkeit im Molekulargewichtsbereich >30 kD) von AM 125 gegenüber AM 122 und AM 123 lässt im Auftrag von AM 125 zusätzlich Banden oberhalb von 30 kD erkennen. Sie entsprechen am ehesten während des

PBS-Auswasches nur unzureichend abgetrennten, ubiquitär vorkommenden Gewebe- / Serumproteinen. Aber auch die Polymerisierung der unterhalb von 19 kD angereicherten Amyloidproteine kann zu Banden im höheren Molekulargewichtsbereich führen.

4. Aminoterminale Sequenzierung

Um auf schnellstem Wege die chemische Natur der extrahierten Fibrillen zu bestimmen, wurde der 5.-8. H₂O-Überstand von AM 122 gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran gebロットet und in N₂-Atmosphäre unter Sauerstoffausschluss mit Ponceau gefärbt. Eine Bande (MW etwa 5.2 kD) wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten und von aminoterminal her ansequenziert. Dieses Vorgehen wurde für AM 123, 11. H₂O-Ü wiederholt und zwei Banden bei 5.2 und 3.8 kD (Abbildung VI-4) ansequenziert (Abt. Kellermann / Lottspeich).

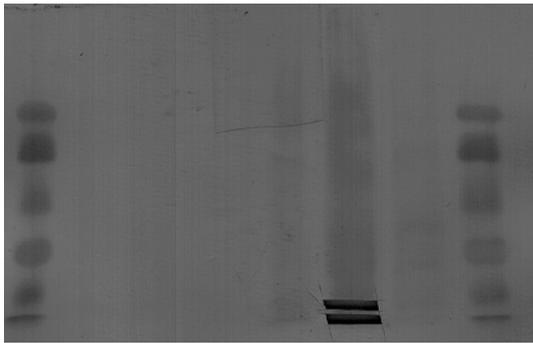


Abbildung VI-4: Isolierung prominenter Proteinbanden aus AM 123, 11. H₂O-Ü mit den Molekulargewichten 5,2 kD und 3,8 kD (Blot auf PVDF-Membran, sequenzierte Banden ausgeschnitten).

Es ergab sich sowohl für die Bande aus AM 122 als auch für beide sequenzierten Banden aus AM 125 die aminoterminale Sequenz **AIQLTQSPSSL**. Eine Recherche in den öffentlich zugänglichen Internet-Datenbanken BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und SWISSPROT / TREMBLE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de>) konnte diese Sequenz als N-Terminus der variablen Region einer menschlichen Immunglobulin-Kappa-Leichtkette identifizieren. Wegen der Kürze des Aminosäuresequenz war ein Rückschluss auf die Kappa-Subklasse nicht möglich. Die Tatsache, dass beide Banden von AM 123 denselben Aminoterminus besitzen, erlaubt die Annahme, dass es sich in beiden Fällen um unterschiedlich lange, aminoterminale Fragmente des gleichen (monoklonalen) Proteins handelt. Außerdem liegt nahe, dass in beiden Unterhauttumoren (AM 122 und AM 123) dasselbe monoklonale Protein thesauriert wurde.

Somit konnte für die Patientin UNK das Vorliegen einer Amyloidose vom AL κ -Typ gesichert werden.

5. Ein polyklonales Antiserum gegen das Amyloidprotein AL κ (UNK)

5.1 Impfschema und Antiserumgewinnung

Da das Amyloid AL κ (UNK) von den übrigen bisher im Labor charakterisierten und zur Antikörperherstellung im Kaninchen verwendeten AL κ -Amyloiden offensichtlich so verschieden war, dass die routinemäßig zur Amyloidklassifikation eingesetzten Antikörper es nicht voll zu erkennen vermochten, wurde ein speziell gegen AL κ (UNK) gerichtetes, polyklonales Antiserum hergestellt (siehe Methodenteil). Folgende Tabelle zeigt das Impfschema mit Zeitpunkt der Blutabnahmen und Reaktivität der gewonnenen Antiseren:

Tag	Vorgang	Kaninchen	1182	Kaninchen	1183
		Menge μg (-30%)	Reaktion im Ouchterlony	Menge μg (-30%)	Reaktion im Ouchterlony
0	Erstimmunisierung	70		70	
22	1. Booster	140		140	
31	1. Blutabnahme		0		0
47	2. Booster	100		50	
53	2. Blutabnahme		++-+++		++
65	3. Blutabnahme				
81	4. Blutabnahme		++-+++		+--+
174	3. Booster	300		300	
181	5. Blutabnahme		++-+++		+--+

Tabelle VI-8: Produktion von anti-AL κ (UNK): Impf- und Blutentnahme-Schema sowie Immunreaktion des gewonnenen Antiserums gegen AL κ (UNK) in der Immundiffusion nach Ouchterlony. Die Stärke der Immunreaktion ist semiquantitativ angegeben (vgl. Abbildung VI-5). Mengenangaben für die Immunisierungen beziehen sich auf die injizierte Menge an Protein (Trockengewicht). Verwandt wurden für die Erstimmunisierung und die Boosterimpfungen AM 122, 1.-6. H₂O-Überstand.

Auf diese Weise konnten erfolgreich ein gegen AL κ (UNK) gerichtetes Antiserum erzeugt werden.

5.2 Austestung der Reaktivität der gewonnenen Antiseren

Die Austestung der Reaktivität der gewonnenen Antiseren erfolgte primär im Ouchterlony. Dazu wurde Anti-AL κ (UNK) gegen AL κ (UNK) aufgetragen und die Reaktion wie folgt beurteilt (Abbildung VI-5).

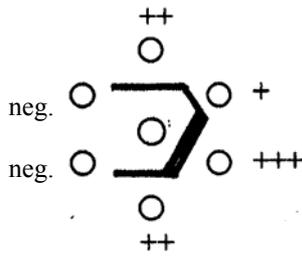


Abbildung VI-5: Semiquantifizierung der Immunreaktion (0/neg. - +++) von Anti-AL κ (UNK) im Ouchterlony-Test. Mitte: Antiserum (Anti-AL κ (UNK), 20 μ l); Außen: Antigen (AL κ (UNK), ca. 7-8 μ l (0.2 mg/ml)). Eine fehlende Präzipitationslinie wurde als 0/neg. gewertet, eine eben erkennbare als +, eine deutlich Präzipitationslinie als ++, eine kräftige Präzipitationslinie als +++.

Die Reaktivität des von Kaninchen 1182 produzierten Antiserums variiert zwischen ++ und +++, während das Antiserum aus Kaninchen 1183 die Reaktionsstärke von + - ++ im Ouchterlony zeigt (Tabelle VI-8). Insgesamt kann das Ergebnis der Immunisierung als sehr gut bezeichnet werden.

5.3 Austestung der Sensitivität und Spezifität von Anti-AL κ (UNK)

Um einen Antikörper wie Anti-AL κ (UNK) sinnvoll in der Immunchemie einsetzen zu können genügt es jedoch nicht, lediglich im Ouchterlony seine Reaktivität gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen nachzuweisen. Vielmehr müssen seine *Sensitivität* (erkennt es auch AL κ -Amyloid-Proteine aus anderen Patienten zuverlässig?) wie auch seine *Spezifität* (markiert es Amyloide anderer Klassen?) gezielt untersucht werden.

Stellvertretend für das gewonnene Kaninchenantiserum Anti-AL κ (UNK) wurden dazu im Ouchterlony die Blutabnahmen 1182/4 und 1183/4 gegen multiple Kappa-Ketten in Form von AL κ (UNK), κ -Amyloide anderer Patienten, sowie gegen κ BJP (unterschiedlicher κ -Subgruppen) getestet, wobei sich, abgesehen von der ersten Blutung, mit allen κ -Ketten eine positive Reaktion unterschiedlicher Stärke (+ - +++ im Ouchterlony-Test) ergab. Gleichzeitig wurde das Antiserum gegen definierte Kontroll-Proteine, nämlich insbesondere Amyloidfibrillen anderer Amyloidklassen einschließlich AL λ , AH γ , AA, A β ₂M und ATTR, ausgetestet (Tabelle VI-9).

Antigen	Reaktion	Antigen	Reaktion	Antigen	Reaktion
AL κ (UNK), AM 125, 7. H ₂ O-Ü	+++	κ ₁ BJP (MEV)	++	1/10 NHS	+
AL κ (UNK), AM 125, 1. PBS-Ü	++	κ ₁ BJP (KUE)	++		
AL κ (UNK), AM 125, 2. PBS-Ü	++	κ ₁ BJP (SCW)	++	AH γ (SOL)	+
		κ ₁ BJP (STE)	++	λ BJP (BER)	0
AL κ (KRA)	++	κ ₂ BJP (TEW)	+++	λ BJP (SMI)	0
AL κ (SIN)	++	κ ₂ BJP (NIM)	++	λ BJP (LOH)	0
AL κ (ACK)	+	κ ₃ BJP (GIN)	+++		
		κ ₄ BJP (KOC)	++	AA (MOS)	0
IgG κ (KAH)	++	κ BJP (MUE)	++	AA (KIR)	0
IgG λ (WEG)	0	κ BJP (KAE)	+++	A β ₂ M (WOE)	0
		κ BJP (KLL)	++	ATTR (TIE)	0

Tabelle VI-9: Immunreaktivität von Anti-AL κ (UNK) (1182/4 und 1183/4) gegen verschiedene κ -haltige Antigene (links), κ -BJP (Mitte) und andere Antigene (rechts) im Ouchterlony-Test (Antigenkonzentration ca. 0.2 mg/ml, vgl. Methodenteil).

Dabei zeigte sich eine leichte Reaktion auch gegen NHS und AH γ , was das Vorhandensein von κ -Ketten in NHS und gering auch in AH γ aufzeigt (vgl. auch Western Blot Abbildung VI-10). Sie kann durch Absorption mit 10% NHS oder κ BJP (vgl. Ouchterlony Abbildung VI-17) eliminiert werden. Dagegen nahm die Reaktion mit AL κ (UNK), anderen AL κ und κ BJP nach Absorption mit 10% NHS nicht oder nur minimal an Intensität ab. Diese Beobachtung wurde als serologischer Beweis dafür gewertet, dass

1. es sich bei dem in der Patientin UNK abgelagerten Amyloid um AL κ handelt (da ein gegen dieses Amyloid erzeugtes Antiserum nur andere Kappa-Proteine präzipitiert, nicht aber Proteine anderer Amyloidklassen),
2. das Antiserum spezifisch gegen κ -Ketten gerichtet ist, da
 - vor Immunisierung keine κ -Ketten erkannt wurden (1. Blutung = negativ),
 - das dem Kaninchen injizierte Material zu > 95% Amyloid enthält und damit die Wahrscheinlichkeit, spezifisch gegen dieses Amyloid gerichtete AK zu erzeugen, relativ hoch ist
 - andere gängige Amyloid-Proteine von Anti-AL κ (UNK) nicht erkannt werden: Reaktionen gegen NHS und AH γ sind auf in NHS und AH γ vorhandene Kappa-Ketten zurückzuführen (vgl. Western Blot Abbildung VI-10 und Ouchterlony Abbildung VI-17).

5.4 Austestung der optimalen Konzentration von Anti-AL κ (UNK) zum Einsatz in der Immunhistochemie

Um Anti-AL κ (UNK) verwertbar in der diagnostischen Immunhistochemie einsetzen zu können, muss außerdem die optimale Verdünnungsstufe etabliert werden (vgl. Spezifisches

Fenster, V.10, Abb. V-8). Ziel ist es, dass der Antikörper gut erkennbar an die spezifische Struktur bindet, ohne dass gleichzeitig nicht relevante Strukturen angefärbt werden. Dazu wurden die Blutabnahmen 1182/2 und 1183/2 vor ihrem Routineeinsatz auf AL κ (UNK)-Amyloid-haltigen Gewebeschnitten ausgetestet (Tabelle VI-10).

Antikörper	Verdünnung	Reaktion	Antikörper	Verdünnung	Reaktion
Anti-AL κ (UNK) 1182/2	1:300	++ - +++++	Anti-AL κ (UNK) 1183/2	1:300	+++
Anti-AL κ (UNK) 1182/2	1:1000	+++	Anti-AL κ (UNK) 1183/2	1:1000	++ - +++
Anti-AL κ (UNK) 1182/2	1:3000	+ - ++	Anti-AL κ (UNK) 1183/2	1:3000	+

Tabelle VI-10: Austestung der optimalen Antikörperverdünnung.

Ebenso wurde auch für spätere Blutabnahmen (1182/4, 1183/4) die Antikörperverdünnung optimiert. Sie lag für den Einsatz in der Immunhistochemie bei 1:1000 - 1:3000 für 1182 und 1:300 - 1:1000 für 1183. Bei einem Auftrag von 300 μ l/OT können so mit 1 μ l Antiserum 1-10 OT untersucht werden.

5.5 Austestung anderer κ -Antiseren gegen AL κ (UNK) im Gewebeschnitt

Da initial Anti-AL κ (SIN) und Anti- κ BJP (mix) das Amyloid AL κ (UNK) auf dem Gewebeschnitt nur schwach bzw. nicht erkannt hatten, und auch sonst rückblickend in der Routinediagnostik nur von mittlerer Sensitivität bei hoher Spezifität bezüglich AL κ waren, wurde nach anderen Antikörpern gesucht, die AL κ (UNK) immunhistochemisch mit höherer Sensitivität detektieren könnten. Dazu wurden nochmals Anti-AL κ (SIN), Anti- κ BJP (mix) sowie zusätzlich einige bereits vorhandene, aber bisher seltener verwendete, gegen κ gerichtete Antiseren ausgetestet:

IP-Nr.	Antikörper	Code	Verdünnung	Reaktivität
602-36	Anti-AL κ (SIN)	880	1:4000	0 - +
602-37	Anti- κ BJP (mix)	803 + 801 + 805 + 556	1:10000	0 - (+)
602-38	Anti-AL κ (KRA)	1157	1:4000	++ - +++++
602-40	Anti- κ_2 BJP/AL κ_2 (TEW)	556 + 558	1:5000	0 - ++

Tabelle VI-11: Ergebnis der immunhistochemischen Austestung weiterer κ -Antiseren gegen AL κ (UNK), vgl. Abbildung VI-7. Anti-AL κ (SIN) ist dabei mit 1:4000 zu hoch verdünnt (vgl. Tabelle VI-12).

Dabei zeigt Anti-AL κ (KRA) die beste Reaktivität gegen AL κ (UNK). Anti-AL κ (SIN) und Anti- κ BJP (mix) zeigen weiterhin nur eine sehr schwache Reaktion mit AL κ (UNK), die zur sicheren Klassifikation von AL κ (UNK) für die Routinediagnostik nicht ausreicht.

5.6 Einsatz von Anti-AL κ (KRA-UNK) in der routinemäßigen Immunhistochemie

Mit dem Ziel, die Sensitivität der routinemäßig in der Immunhistochemie eingesetzten Antikörperbatterie bzgl. AL κ zu erhöhen, wurde Anti-AL κ (UNK) 1:1 mit Anti-AL κ (KRA) gemischt als Anti-AL κ (KRA-UNK) in der Immunhistochemie ab jetzt standardmäßig eingesetzt (Durchführung der Routine-Immunhistochemie durch MTAs Frau Joswig, Frau Steer und Frau Oos). Ein Antikörper-Mix bietet den Vorteil der höheren Sensitivität, da mehr Epitope erkannt werden.

Das Antiserum Anti-AL κ (KRA-UNK) wurde zuvor ebenfalls bezüglich seiner idealen Verdünnung (1:2000) optimiert.

a. Sensitivität: Um zu prüfen, ob der Einsatz von Anti-AL κ (KRA-UNK) die Sensitivität der Routine-Antikörperbatterie gegenüber neu eingegangenen AL κ -haltigen Gewebeschnitten tatsächlich verbessern konnte, wurde bei 500 aufeinanderfolgenden Amyloid-Eingangsnummern (Am 3000 - Am 3499) die Reaktivität von Anti-AL κ (KRA-UNK) im Vergleich zu Anti-AL κ (SIN) retrospektiv ausgewertet (Anti- κ BJP (mix) wurde nicht mehr verwendet):

Von den 500 Eingangsnummern (jeder Patient erhält eine eigene Eingangsnummer) handelte es sich in 371 Fällen um auf OT fixierte Gewebeschnitte. Davon war in 270 Fällen die Kongorotfärbung positiv, in 101 Fällen negativ. An 260 der kongorot-positiven Gewebe wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Dabei handelte es sich in 120 Fällen um AL λ , in 31 Fällen um AA, in 28 Fällen um ATTR, in 0 Fällen um A β ₂M, in 4 Fällen um AApoAI, in einem Fall um AApoAII, in 3 Fällen um AKer, in einem Fall um A β , in 3 Fällen um AFib und in 47 Fällen um AL κ , in einem Fall um AL λ + AA, in einem Fall um AL κ + ATTR, in 3 Fällen um AL κ + AL λ , 17 Fälle konnten damals noch nicht sicher zugeordnet werden.

In den 47 als AL κ diagnostizierten Fällen zeigten die verwendeten Antikörper Anti-AL κ (SIN) und Anti-AL κ (KRA-UNK) folgende Reaktion:

Am-Nr	Anti-AL κ (SIN)	Anti-AL κ (KRA-UNK)	Am-Nr	Anti-AL κ (SIN)	Anti-AL κ (KRA-UNK)
3028	0 - ((+))	+ - ++	3339	++ - +++	++ - +++
3064	0 - (+)	++ - +++	3340	+ - ++	+ - ++
3107	0 - +	++	3343	++ - +++	++ - +++
3123	0 - +	+ - ++	3344	++	+ - ++
3128	0	++	3349	++ - +++	0 - ++
3142	0 - (+)	+ - +++	3360	n.d.	+++
3151	0	0 - +++	3361	++	++ - +++
3173	+ - +++	+ - +++	3373	+ - +++	++ - +++
3179	+	+ - +++	3387	++ - +++	+++
3216	+	+ - ++	3389	+++	+++
3235	++	++ - +++	3392	++	+ - ++
3242	+	+ - ++	3403	n.d.	+++
3253	0 - ++	++	3412	++ - +++	+++
3265	+ - ++	++ - +++	3435	+ - +++	+ - ++
3266	+++	+++	3442	++	++
3268	+++	++ - +++	3451	0 - +	++
3269	+++	++ - +++	3460	++ - +++	++ - +++
3270	+ - ++	++ - +++	3461	++ - +++	++ - +++
3280	+++	++ - +++	3467	+ - ++	+++
3299	++ - +++	+++	3482	+ - ++	n.d.
3302	+ - ++	+ - ++	3489	(+) - ++	0 - ++
3305	++	++	3495	+ - ++	+ - +++
3308	+++	+++	3497	++ - +++	+++
3335	+ - ++	0 - ++			

Tabelle VI-12: Reaktion der in der routinemäßigen Immunhistochemie eingesetzten Antikörper Anti-AL κ (KRA-UNK) und Anti-AL κ (SIN) gegen AL κ -Amyloide. Die schwache Reaktion von Anti-AL κ (SIN) gegen Am 3028-3151 erklärt sich durch eine (hier noch zu hohe Verdünnung) von 1:4000, die ab Am 3173 auf 1:1000 geändert wurde. Diese initial zu hohe Verdünnung von Anti-AL κ (SIN) hat es auch verursacht, dass AL κ (UNK) zunächst immunhistochemisch nicht sicher erkannt wurde. Amyloide mit inkonsistentem Färbeverhalten (vgl. VI.5.7) in einem der beiden Antiseren wurden fett hervorgehoben.

Damit konnte durch Einführung von Anti-AL κ (KRA-UNK) in die Routinediagnostik die Sensitivität für AL κ initial stark verbessert werden (Tabelle VI-12, Am 3028-3151), was im Wesentlichen auf die hier noch zu hohe Verdünnung von Anti-AL κ (SIN) zurückzuführen ist (damals wurden noch keine Positiv-Kontrollen mitgeführt). Nach Optimierung der Antikörperverdünnung von Anti-AL κ (SIN) auf 1:1000 zeigten beide Antiseren eine im Wesentlichen gleich gute Sensitivität für κ -Amyloide (Tabelle VI-12). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Konsistenz der κ -Amyloid-Anfärbung (vgl. VI.5.7) in einigen Fällen (Am-Nr. 3253, 3335, 3349, 3451, 3489) nur durch den Einsatz von 3 Antikörpern (Anti-AL κ (SIN) und Anti-AL κ (KRA-UNK)) gewährleistet ist, während hier die Verwendung von nur einem Antiserum in 50% zu einem inkonsistenten (0-++) und damit nicht sicher für die Amyloiddiagnostik verwertbaren Ergebnis (vgl. Am-Nr 3151) geführt hätte.

b. Spezifität: Anti-AL κ (SIN) und Anti-AL κ (KRA-UNK) zeigten z.T. auch schwache Reaktionen gegenüber als nicht- κ diagnostizierten Amyloiden, da das Amyloid im Gewebe

keine Reinsubstanz darstellt, sondern von Serumproteinen (wie z.B. Immunglobulinen) durchströmt ist, die z.T. haften bleiben. In all diesen Fällen (außer bei den noch unbekanntem Amyloiden AX) war jedoch durch die wesentlich stärkere Reaktion eines gegen die entsprechende andere Amyloidklasse gerichteten Antiserums eindeutig eine AL κ -Amyloidose ausschließbar. Auch das hier stets inkonsistente Färbeverhalten (Tabelle VI-13) spricht gegen die Diagnose einer κ -Amyloidose (vgl. VI.5.7).

Um die Spezifität der Antikörper Anti-AL κ (SIN) und Anti-AL κ (KRA-UNK) miteinander zu vergleichen zu können, wurde die jeweilige Anzahl von κ -Nebenreaktionen mit den nach immunhistochemischer Färbung als nicht-AL κ diagnostizierten Gewebeschnitten der Eingangsnummern 3200-3499 (da hier die Sensitivität (vgl. Tabelle VI-12) beider Antikörper als etwa gleichwertig zu betrachten ist) ausgezählt:

Amyloid	Reaktionsstärke	Anzahl der Nebenreaktionen von Anti-AL κ (SIN) absolut und in % bezogen auf die Anzahl der mit Anti-AL κ (SIN) gefärbten Eingangsnummern der jeweiligen Amyloidklasse	Anzahl für Anti-AL κ (KRA-UNK) absolut und in %
AL λ	(0 - +) / (0 - ++)	20 / 6 von 66 (30% / 9%)	22 / 5 von 68 (32% / 7%)
AA	(0 - +)	3 von 21 (14%)	1 von 20 (5%)
ATTR	(0 - +)	9 von 20 (45%)	4 von 21 (19%)
AKer	(0 - ++)	1 von 3 (33%)	1 von 3 (33%)
AApoAI	(0 - ++)	2 von 3 (67%)	0 von 2 (0%)
AX	(0 - +)	1 von 6 (17%)	1 von 7 (14%)

Tabelle VI-13: Anzahl der Nebenreaktionen von Anti-AL κ (SIN) und Anti-AL κ (KRA-UNK) gegen nicht- κ -Amyloide absolut und in %. Dabei sind Angaben der Reaktionsstärke mit 0-+ als zu schwach für eine sichere Diagnosestellung und mit 0-++ als inkonsistent zu betrachten.

Der Anteil der Nebenreaktionen ist bei beiden Antikörpern für AL λ mit jeweils 39% vergleichbar, über AKer und AApoAI lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl keine Aussage treffen. Bezüglich AA und ATTR zeigt Anti-AL κ (KRA-UNK) eine geringere Tendenz zu Nebenreaktionen als AL κ (SIN). Damit konnte AL κ (KRA-UNK) auch die Spezifität der Routinefärbung für AL κ geringfügig verbessern.

Insgesamt sind positive Nebenreaktionen vermutlich größtenteils auf die unterschiedlich starke Kontamination aller Amyloidklassen mit Immunglobulinen (v.a. mit λ -Ketten, vgl. Western Blots) zurückzuführen, was bedeutend ist (LINKE 1987). Dadurch erscheint die Spezifität von Anti-AL κ (KRA-UNK) (und auch Anti-AL κ (SIN)) in diesem zu engen Blickwinkel geringer, als sie in größerem Zusammenhang ist: Berücksichtigt man konsistentes = spezifisches und inkonsistentes = unspezifisches = „nicht-positives“ Färbeverhalten, so ist bei den hier untersuchten Gewebeschnitten die Anzahl falsch positiver Reaktionen = 0.

5.7 Konsistenz und Inkonsistenz in der Anfärbung

Wie am Beispiel der Sensitivität und Spezifität von Anti-AL κ (KRA-UNK) erläutert (Tabelle VI-12 und Tabelle VI-13), muss bei einer Anfärbung eines Gewebeschnittes mit einem Antikörper stets differenziert werden, ob das gesamte kongorot-positive Gewebe gleichmäßig markiert wird, oder ob es kongophile Bereiche gibt, die immunhistochemisch nur unzureichend erfasst werden. Vorausgesetzt, die Antikörperverdünnung stimmt (Kontrolle anhand einer mitgeführten Positivkontrolle), wird ein Färbeverhalten, in dem einige kongorot-positive Gewebebezirke nicht, nur schwach oder fleckig angefärbt sind, als „inkonsistent“ bezeichnet und die Reaktionsstärke mit 0-+, 0-++ oder 0-+++ angegeben, eine homogene Markierung dagegen als „konsistent“ und mit +, ++, +++ oder ++++ dokumentiert. Bei Angabe der Reaktionsstärke mit 0-+ ist nicht zu differenzieren, ob hier eine inkonsistente oder nur zu schwache Färbung vorliegt. Ein inkonsistentes Färbeverhalten gilt bis zum Beweis des Gegenteils als unspezifisch, ein konsistentes Färbeverhalten dagegen als spezifisch und geeignet zur Diagnosestellung.

Die Beispiele Am 3253, 3335, 3349, 3451 und 3489 (Tabelle VI-12) zeigen jedoch, dass auch aus einer inkonsistenten Reaktion mit einem AL κ -Antiserum nicht zwingend geschlossen werden darf, dass es sich hierbei um eine von AL κ verschiedene Amyloidklasse handelt. Die Amyloidklasse konnte lediglich durch Einsatz nur eines einzigen AL κ -Antiserums nicht sicher diagnostiziert werden. In solchen Fällen ist folgendes Procedere angezeigt:

Bei Reaktionen der Stärke 0-+ (zu schwach/inkonsistent): Kontrolle der Antikörperverdünnung anhand einer Positivkontrolle, falls erfolglos Procedere wie bei 0-++.

Bei Reaktionen der Stärke 0-++, 0-+++ (inkonsistent): Zusätzlicher Einsatz weiterer Antiseren gegen die gleiche Amyloidklasse, falls immer noch Inkonsistenz Einsatz weiterer Antiseren gegen andere Amyloidklassen (ebenfalls mit Negativ- und Positivkontrollen).

Um von vornherein schnellstmöglich die korrekte Amyloidklasse diagnostizieren zu können und Fehldiagnosen zu vermeiden, ist also ein breites Antikörperspektrum gegen verschiedene Amyloid-Klassen sowie die Verwendung mehrerer Antikörper (z.B. drei) pro Amyloidklasse (insbesondere bei Amyloidklassen mit relativ inhomogener Aminosäuresequenz wie AL) in entsprechend korrekter Verdünnung und unter Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen ideal (LINKE et al. 2005, Veröffentlichung folgt).

5.8 Kongorot- und immunhistochemische Darstellung von AL κ (UNK)

Folgende Bildauswahl zeigt die Anfärbung der subkutanen Amyloidablagerungen der Patientin UNK mit Kongorot wie auch mit verschiedenen Antikörpern.

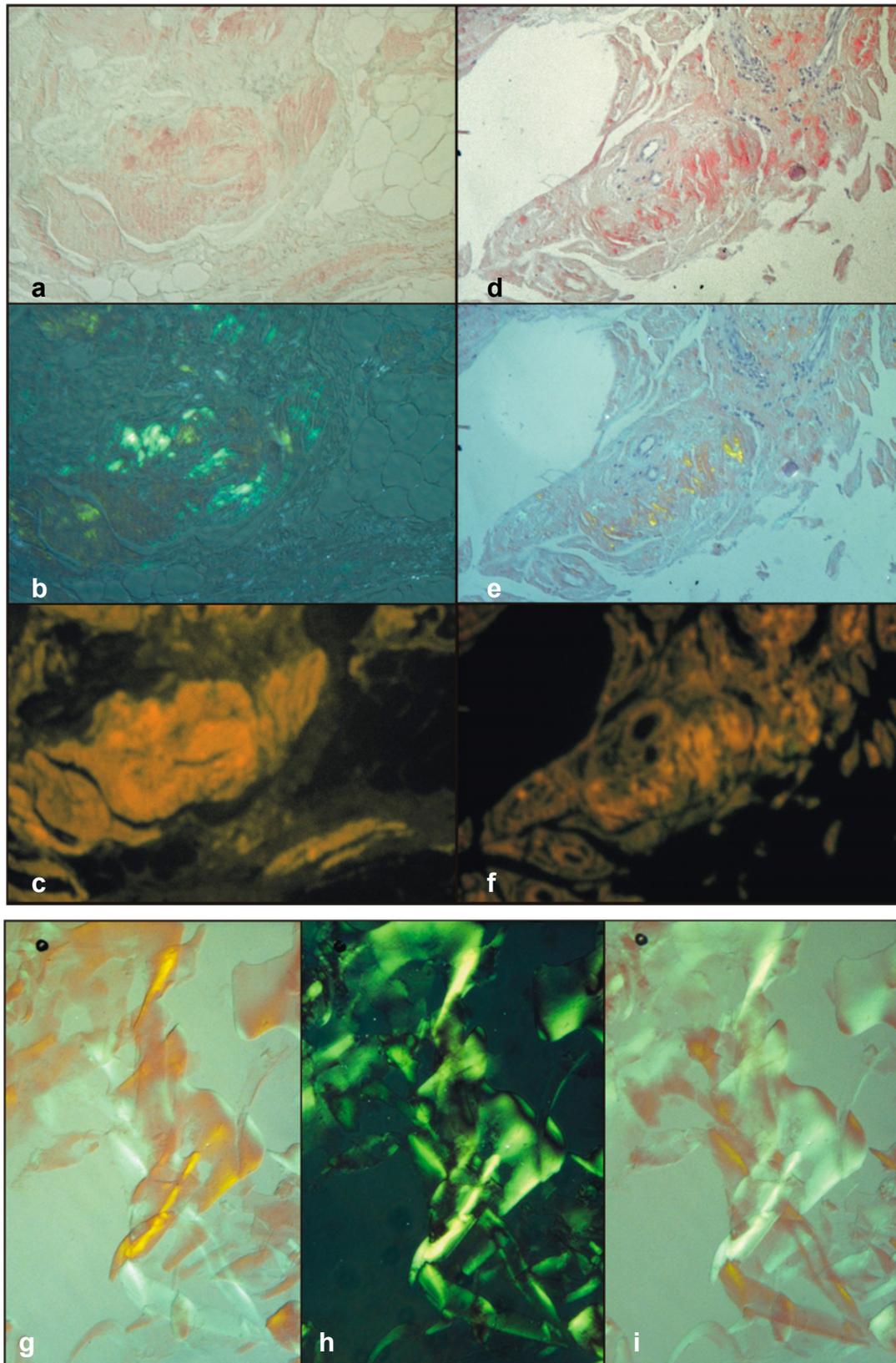


Abbildung VI-6: Amyloiddiagnostik am Beispiel von AL κ (UNK). Amyloidnachweis durch Kongorot-Färbung, -Fluoreszenz, und grüne Doppelbrechung. a-c und d-f: Jeweils derselbe mit Kongorot gefärbte histologische Ausschnitt. a + d: Betrachtung im polychromatischen Durchlicht. b + e: Orange/Grüne Doppelbrechung der Amyloidablagerungen im (halb-)polarisierten Licht. c + f: Orange Fluoreszenz der Amyloidablagerungen. g-i: Gereinigte Amyloidfibrillen (AM 123, 5. H₂O-Ü) in halb-polarisiertem Licht (g + i) und in polarisiertem Licht (h). Korrespondierende Stellen zeigen je nach Drehung des Fluoreszenzfilters keine, orange oder apfelgrüne Doppelbrechung. Vergrößerung: 63x

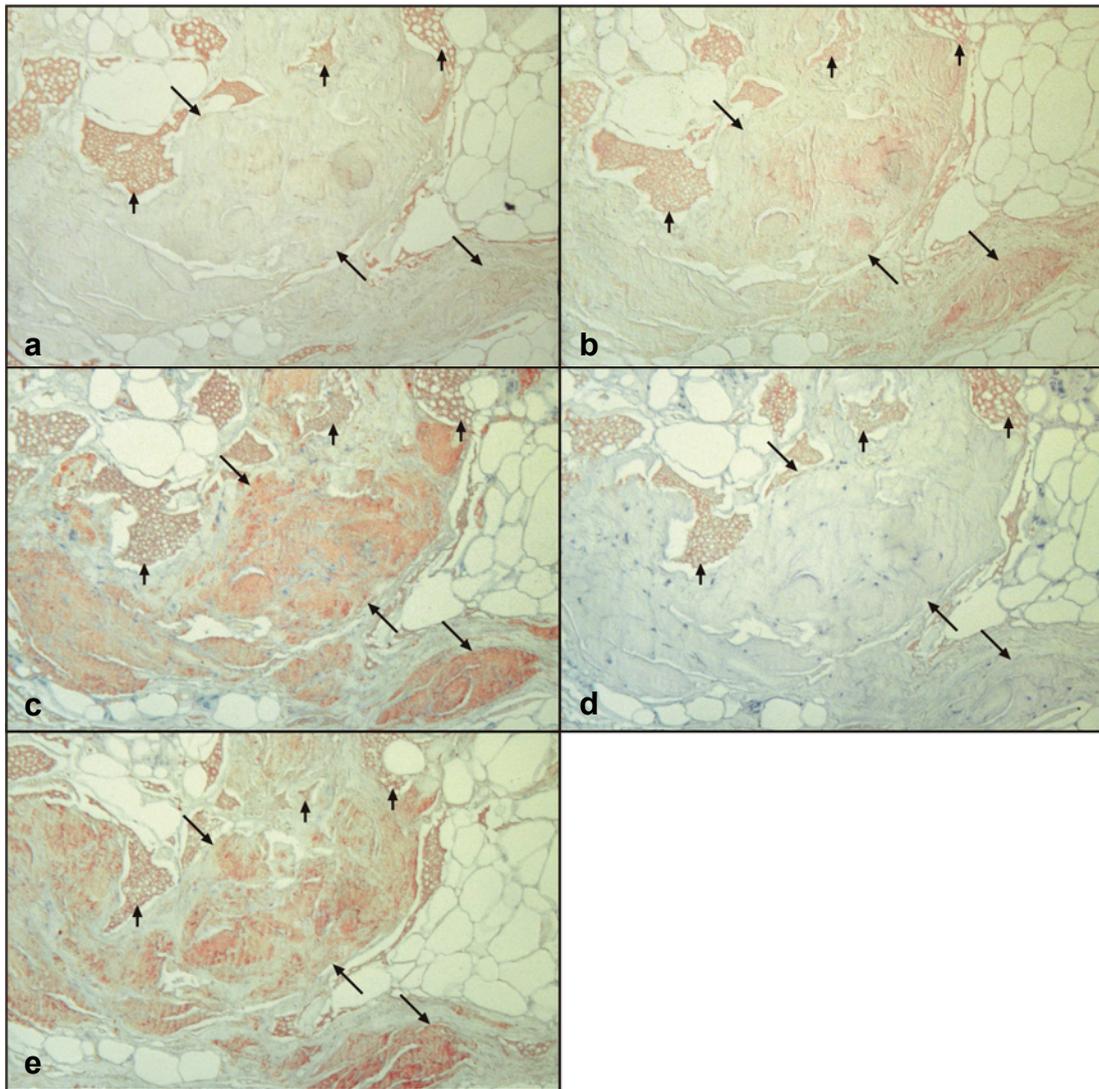


Abbildung VI-7: Der in Abbildung VI-6 a-c dargestellte Ausschnitt nach Anfärbung mit verschiedenen Antiseren:

- | | |
|--|---------------|
| a, IP 602-37: Anti-κBJP (MIX) 1:10000 | 0 |
| b, IP 602-36: Anti-ALκ (SIN) 1:4000 | 0 - + |
| c, IP 602-38: Anti-ALκ (KRA) 1:4000 | ++ - +++ |
| d, IP 602-39: Anti-ALλ (HEN) 1: 2000 | 0 (Kontrolle) |
| e, IP 605-35: Anti-ALκ (UNK) 1182/2 1:3000 | + - +++ |

Diagonale Pfeile weisen auf Amyloidablagerungen hin, senkrechte Pfeile auf Serum, welches entnahmebedingt in Form von Extravasaten in den Gewebespalten zu finden ist.

Die Bilder a und b zeigen die Ausgangssituation (vgl. IP 584, Tabelle VI-1): Ein Gemisch von vier gegen native κ-Ketten erzeugten Antiseren (Anti-κBJP (MIX)) zeigt eine starke Anfärbung des Blutserums (Immunglobuline, native κ-Ketten), jedoch keine Reaktion mit den in Abbildung VI-6 Kongorot-positiven, scholligen Amyloiddeposits (a). Es ergibt sich ein Bild wie bei der Kontrolle Anti-ALλ (d), wo ebenfalls nur Immunglobuline (λ-Ketten) im Serum angefärbt werden, jedoch nicht die Amyloiddeposits. Auch das spezifisch gegen κ-

Amyloid erzeugte Antiserum Anti-AL κ (SIN) zeigt trotz deutlicher Anfärbung der κ -Ketten im Serumextravasat eine nur eingeschränkte Reaktion mit einigen Amyloiddeposits. Diese schwach positive (da die Antikörperverdünnung zu hoch war, was aufgrund damals noch fehlender Kontrollen zunächst nicht bemerkt wurde) Reaktion wurde bei der Erstbeurteilung nicht gesehen (Tabelle VI-1) und retrospektiv nicht ausreichend gewürdigt. Der Unterschied in der Anfärbung von AL κ (UNK) mit Anti- κ BJP (MIX) gegenüber Anti-AL κ (SIN) ist jedoch bedeutsam angesichts der Tatsache, dass Anti- κ BJP (MIX) völlig (!) areaktiv und damit negativ war, was noch vor 2 Jahrzehnten eine sichere immunhistologische Klassifikation nicht zuließ. Erst die (spätere, vgl. Tabelle VI-11) Anfärbung mit Anti-AL κ (KRA) (c) weist die Amyloiddeposits nun auch immunhistochemisch eindeutig als AL κ aus: Die Amyloiddeposits sind ebenso stark angefärbt wie Serum, wie auch die Anfärbung mit Anti-AL κ (UNK) (e) bestätigt.

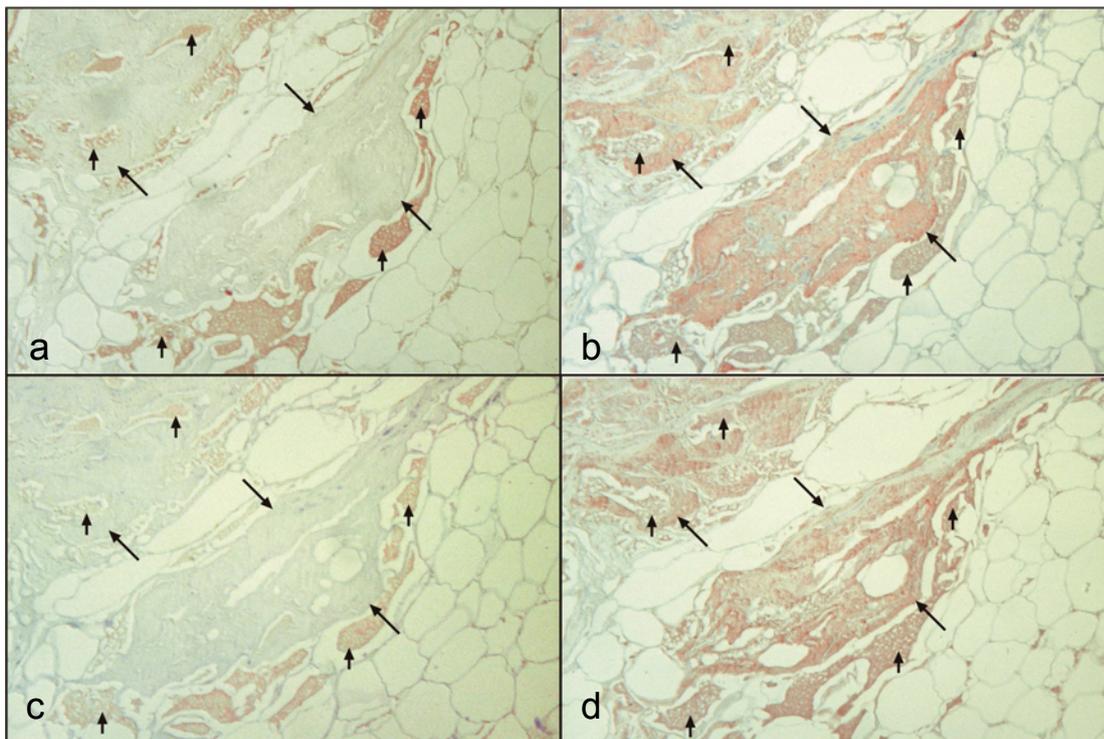


Abbildung VI-8: Weiteres Beispiel der spezifischen Reaktivität von Anti-AL κ (KRA) und Anti-AL κ (UNK) mit AL κ (UNK) im Gegensatz zu Anti- κ BJP (MIX) und Anti-AL λ als Kontrolle:

a, IP 602-37: Anti- κ BJP (MIX) 1:10000
c, IP 602-39: Anti-AL λ (HEN) 1: 2000

b, IP 602-38: Anti-AL κ (KRA) 1:4000
d, IP 605-35: Anti-AL κ (UNK) 1182/2 1:3000

Bemerkenswert ist, dass offensichtlich die Amyloidkonformation κ -Ketten im Gegensatz zum nativen Zustand so verändert, dass die vier in Anti- κ BJP (MIX) enthaltenen, gegen native κ -Ketten gerichtete Antiseren, die aus einer Reihe von Anti- κ BJP-Reagenzien herausgesucht

worden waren weil sie in früheren Testserien gegen einige AL κ -Amyloide reagiert hatten, keine ausreichende Anzahl von Epitopen vorfinden um eine mikroskopisch erkennbaren Färbung des Amyloids hervorzurufen. Dies bestätigt die Beobachtung vieler Untersucher, die mit Antiseren arbeiten, die nicht spezifisch gegen in Amyloidkonformation produzierte Proteine hergestellt wurden und erfahrungsgemäß zu einer relativ hohe Rate an falsch negativen Befunden führen.

5.9 Morphologische Befunde

Die immunhistochemische Färbung der Präparate mit Anti-AL κ (UNK) lässt die Morphologie der Amyloidablagerungen deutlich werden (Abbildung VI-9): Beachtenswert sind die massiven scholligen Amyloidablagerungen (rot), die Gefäße regelrecht ummauern und Ausläufer entlang der Bindegewebssepten bilden. Innerhalb der Amyloiddeposits ist der Zellgehalt spärlich, während sich perivaskulär leukozytäre Infiltrate zeigen (a, c). Man erkennt einzelne (möglicherweise monoklonale) κ -positive Plasmazellnester (b, diagonale Pfeile), die auf eine lokale Paraproteinproduktion hinweisen können.

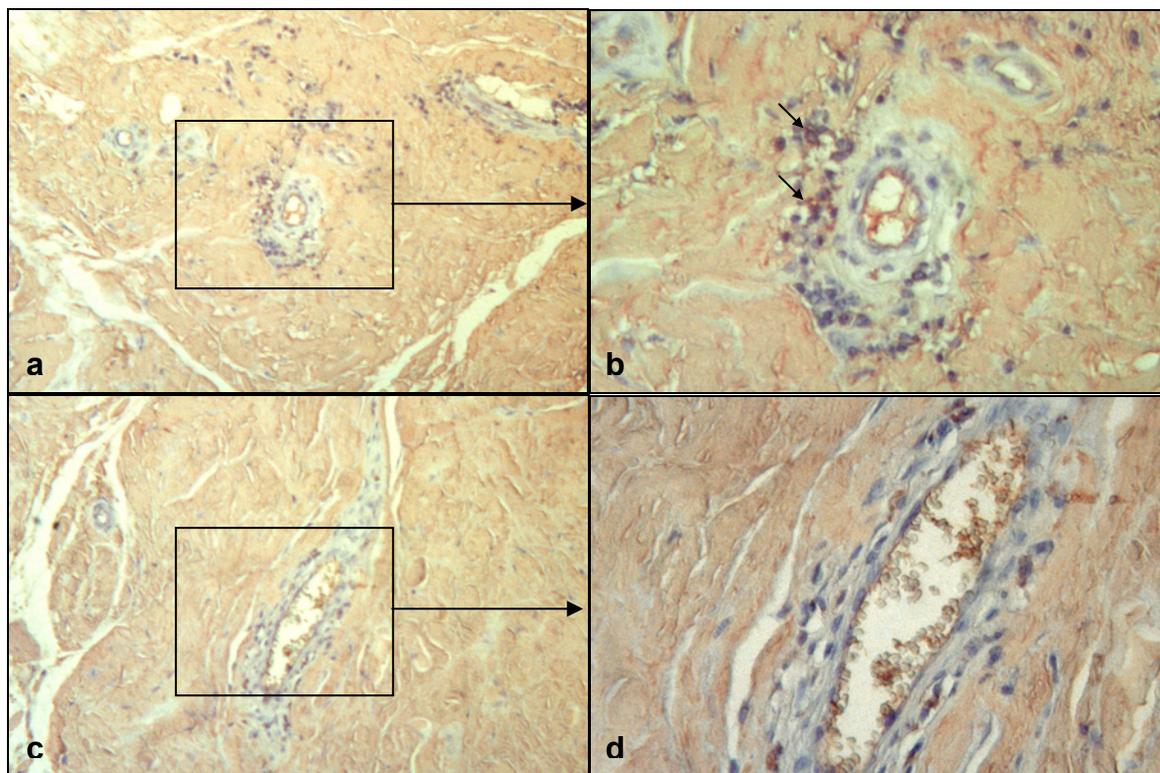
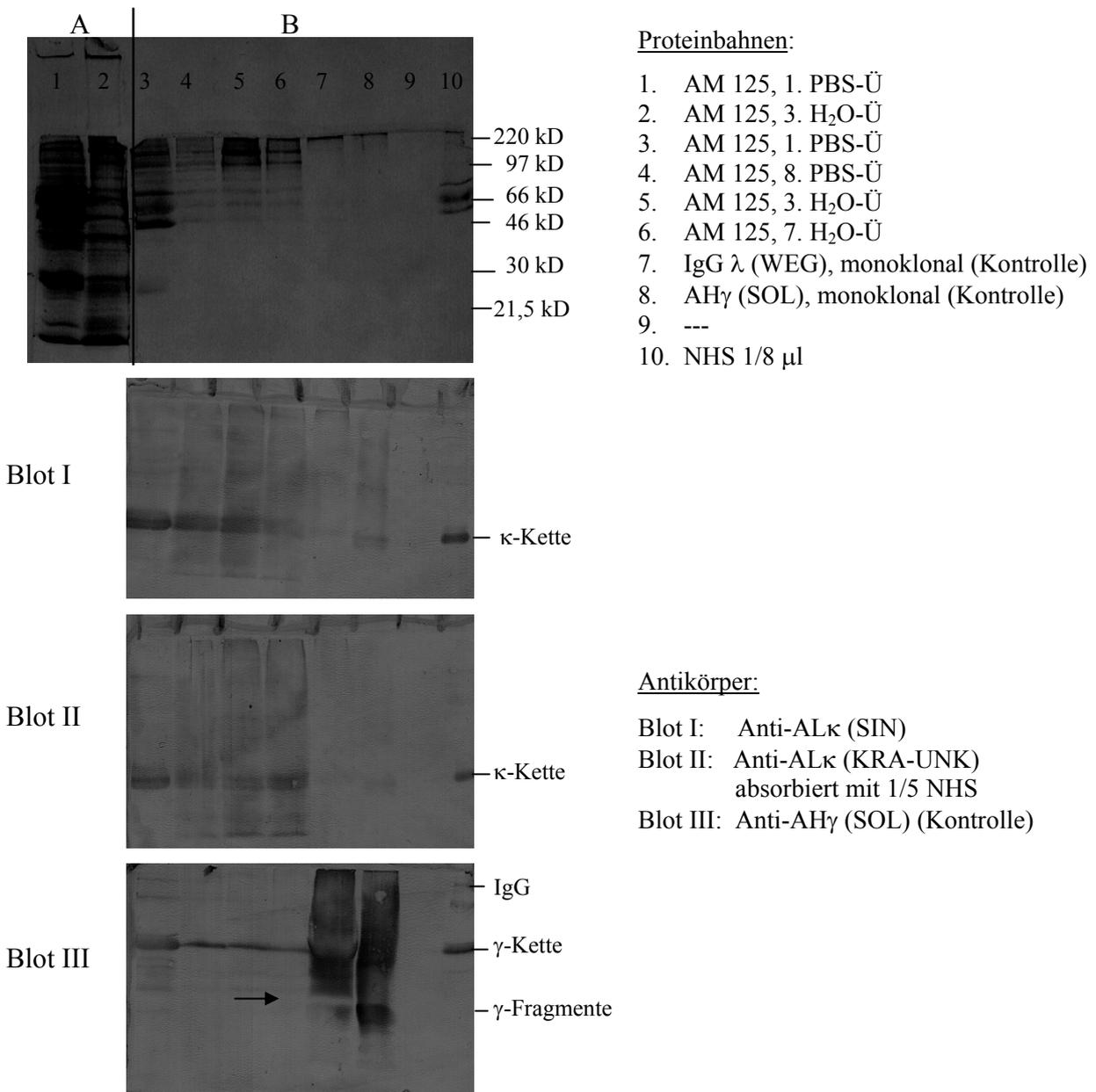


Abbildung VI-9: κ -positive Plasmazellnester in perivaskulären Scheiden, umgebende Amyloiddeposits. (IP 619-48: Anti-AL κ (UNK) 1183/6 1:300). Originalvergrößerung: 63x bzw. 160x. Amyloid ist (+) - + gefärbt, Plasmazellen (Pfeile) ++ - +++.

6. Untersuchung der Proteine isolierter Amyloidfibrillen im Western Blot

Um zu erfahren, aus welchen Proteinen die Amyloidfibrillen der Patientin UNK aufgebaut sind, wurden die Amyloidfibrillen solubilisiert und der Größe nach mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden drei identische SDS-Gele angefertigt. Die Aufträge in Slot 1 + 2 wurden jeweils als Kontrolle mit Coomassie gefärbt, die Aufträge der Slots 3-10 auf Nitrozellulose geblottet und mit Hilfe von Anti-AL κ (SIN), Anti-AL κ (KRA-UNK) und Anti-AH γ (SOL) immunchemisch angefärbt (Abbildung VI-10).



A. Zum Ergebnis des Elektrotransfers:

In der Abbildung VI-10 (oben) wurden die beiden Hälften A und B eines Gels nach der gelelektrophoretischen Proteinauftrennung unterschiedlich behandelt: A wurde direkt mit Coomassie gefärbt, B wurde zum Elektrotransfer der Proteinbahnen 3-10 auf Nitrozellulose verwendet und erst anschließend mit Coomassie gefärbt, um den Transfererfolg abschätzen zu können: Proteine in den unteren Molekulargewichtsbereichen wurden vollständiger transferiert als Proteine mit höherem Molekulargewicht. Außerdem scheinen die PBS-löslichen Proteine leichter transferiert zu werden als Amyloidproteine.

B. Zum Ergebnis der Westernblots:

Blot I und II zeigen die Bindung von Anti-AL κ (SIN) bzw. Anti-AL κ (KRA-UNK) absorbiert mit 1/5 NHS an κ -Ketten und -Fragmente/-Aggregate in den aufgetragenen H₂O- bzw. PBS-Überständen. Als Kontrollen dienen IgG λ (WEG), AH γ (SOL), sowie NHS.

Bei beiden Antikörpern resultiert ein nahezu identischer Western Blot. Es zeigt sich eine starke Reaktivität gegen das Antigen AL κ (UNK), sowohl in den H₂O-Überständen als auch in den PBS-Überständen. Man sieht, dass im Laufe des PBS-Auswasches der löslichen Gewebebestandteile (z.B. Vergleich Auftrag 3 und 5) der prozentuale Gehalt an κ -Amyloidfragmenten (unterhalb der Serum-Kappa-Bande bei 25 kD) sowie an κ -Amyloid-Aggregaten (oberhalb) relativ zunimmt, der Anteil der nativen Kappa-Kette (scharfe Bande bei ca. 25 kD) ab. Mit 1/5 NHS absorbiertes Anti-AL κ (KRA-UNK) erkennt in IgG λ (WEG) und AH γ (SOL) schwach eine Bande auf Höhe der nativen Kappa-Kette, vereinbar damit, dass auch in IgG λ und γ -Amyloid in Spuren Kappa-Ketten vorhanden sind. Ebenso erkennt auch Anti-AL κ (SIN) in einer schwachen Bande die Kappa-Ketten in IgG λ und γ -Amyloid. Beide Antikörper zeigen eine deutliche Anfärbung der Kappa-Bande im NHS. Damit erkennt Anti-AL κ (KRA-UNK) sowohl in Amyloidkonformation befindliche Kappa-Ketten, wie auch intakte Kappa-Ketten, die allerdings, durch die Methoden-bedingte Denaturierung (SDS, β -ME), verborgene antigene Determinanten exponieren, wie es auch für die amyloidogene Transformation charakteristisch ist (LINKE et al. 1973). Anti-AL κ (KRA-UNK) und Anti-AL κ (SIN) erkennen keine Gamma-Ketten, da NHS keine Reaktion bei 50 kD zeigt.

Eine Anfärbung für γ -Ketten (Blot III, Anti-AH γ (SOL)) zeigt in allen Extraktionen wie auch in NHS intakte γ -Ketten. AH γ (SOL) und IgG λ (WEG) fallen durch γ -Fragmente auf. Während die PBS-Überstände von AM 125 γ -Ketten (50 kD) und komplette Antikörper (150 kD) enthalten, finden sich im H₂O-Extrakt nur noch intakte γ -Ketten (solitäre Bande bei ca. 50 kD). Als Kontrollen dienen das monoklonale IgG λ (WEG) und AH γ (SOL), die beide

massiv angefärbt werden, da sie sowohl γ -Fragmente (< 50 kD) als auch -Aggregate (> 50 kD) enthalten. Im Serum zeigen sich ebenfalls ganze Immunglobuline (150 kD) sowie γ -Ketten (50 kD). Nebenbei erkennt man im Auftrag 7 und 8 deutlich ein Auslöschphänomen (Blot III, Pfeil), das auch in den Aufträgen 3-6 angedeutet besteht. Die κ -Kette blockiert hier die Nitrozellulosemembran so stark, dass auch die Hintergrundfärbung reduziert ist. Hier kann Anti-AH γ (SOL) nicht binden und ist damit selektiv für Gamma-Ketten.

Insgesamt weist das extrahierte Protein einen hohen Gehalt an κ -Ketten auf mit „Peak“ bei 25 kD (intakte κ -Kette) und weiteren κ -positiven Banden insbesondere im niedrigeren Molekulargewichtsbereich (Fragmente) wie auch in höheren Molekulargewichtsbereichen (Aggregate). Daneben muss abgesehen vom Nachweis einer (unfragmentierten) γ -Kette auch vom Vorhandensein anderer Serumproteinen ausgegangen werden, wie in der Coomassieblaufärbung (Abbildung VI-10) angedeutet.

7. Präparative Proteinisolierung mittels Säulenchromatographie

Um die relevanten Amyloidproteine für die nachfolgend geplante Aminosäuresequenzierung in höchster Reinheit zu isolieren, sollten die in der SDS-PAGE nachgewiesenen, noch vorhandenen Serum-/Gewebeproteine im oberen MW-Bereich (vgl. VI.6.) möglichst vollständig entfernt werden. Dazu wurden Amyloidfibrillen der Extraktionen AM 123 und AM 125 nach entsprechender Vorbereitung präparativ gelchromatographisch der Größe nach aufgetrennt. Aufgrund von z.T. zu geringer Ausbeute bzw. Verunreinigungen waren mehrere Versuchsansätze erforderlich. Das Säuleneluat wurde entsprechend den photometrisch gemessenen Absorptionspeaks, zu 6-9 Fraktionen (Abbildung VI-11) zusammengefasst. Die Reinheit und das Molekulargewicht der in den einzelnen Säulen-Fraktionen enthaltenen Proteine und Peptide wurde anschließend über eine gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) abgeschätzt.

Säule	Matrix	Maße	Auftrag	Laufpuffer	Laufzeit
C 702	Sephadex G 100	50 x 2 cm	30 mg AM 123, 2. + 3. H ₂ O reduziert + alkyliert	6M Guanidin-HCl	16 h
C 708	Sephadex G 100	50 x 2 cm	60 mg AM 125, 3. H ₂ O reduziert + alkyliert	6M Guanidin-HCl	20 h
C 713 / C 714	Sephacryl 200 S	70 x 2 cm	150 mg / 145 mg AM 125, 4.-7. H ₂ O reduziert + alkyliert	6M Guanidin-HCl	je 6 h

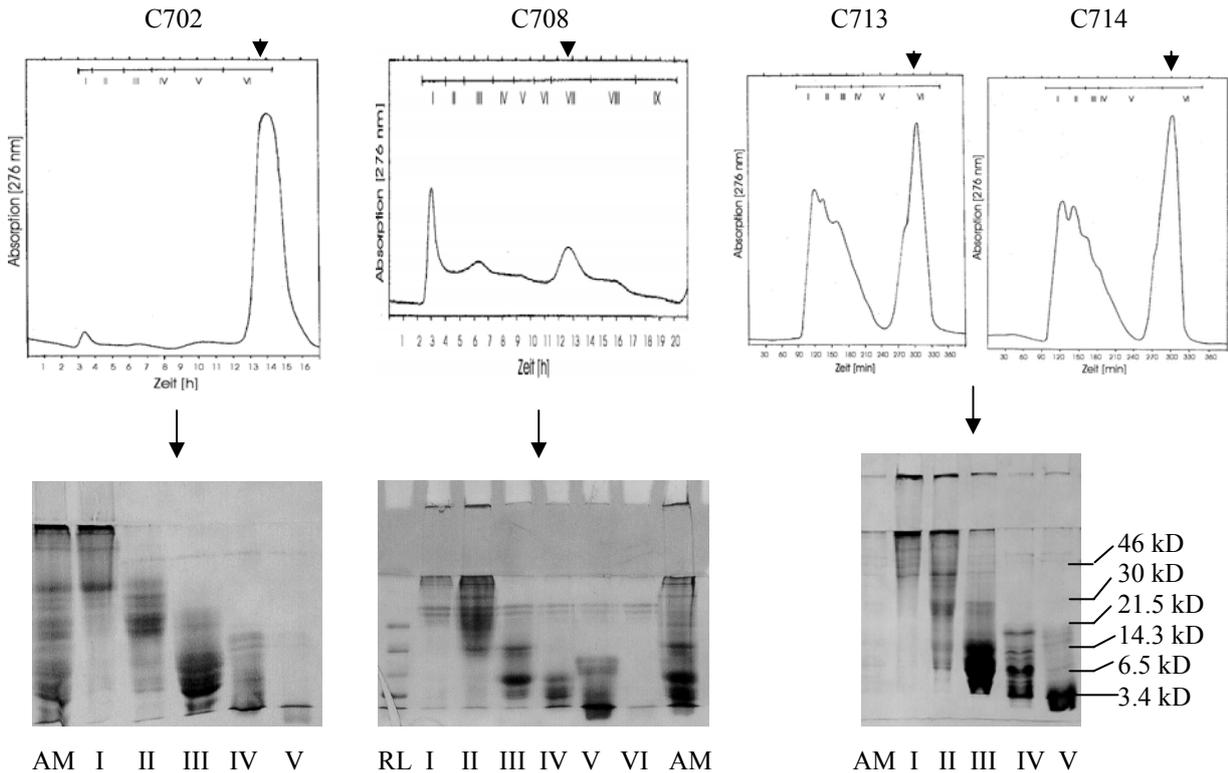


Abbildung VI-11: Gelchromatographische Amyloidprotein-Auftrennung nach der Größe. Dargestellt ist das Elutionsprofil für 4 Auftragungen, der Pfeil (▼) markiert dabei den N^ε-DNP-Lysin-Salzmarker (MW 164.2 D). Die proteinhaltigen Säulenfraktionen (I-V/VI) wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt (12% bei C702, C708; 13,5% bei C713, C714) und mit dem Ausgangsmaterial (AM) bzw. einem Molekulargewichtsmarker (RL) verglichen.

Die hohen photometrischen Absorptionswerte der Fraktionen VI/VII sind durch den hier eluierten Salzmarker N^ε-DNP-Lysin (MW 164.2 D) bedingt, der zugleich das Ende der Protein-/Peptidaufreinigung kennzeichnet. Im nachfolgenden Eluat sind nur noch Moleküle mit einem Molekulargewicht unterhalb von 164.2 D zu erwarten. Im Fall von C702 ist der Salzpeak durch Vorhandensein von Iodacetat und Dithiothreitol besonders deutlich ausgeprägt, während diese zum Reduzieren und Alkylieren (Methodenteil) benutzten Salze in den Aufträgen C 708 und C 713/714 durch vorherige Dialyse weitgehend eliminiert wurden. Die erste gelchromatographische Auftrennung (C 702) lieferte nur wenig Material in den relevanten Fraktionen III-V, da insgesamt nur 30 mg Protein eingesetzt worden waren

(Tabelle VI-14). In C 708 wurde mehr Protein aufgetragen, jedoch war das Eluat durch Verunreinigungen aus einem sich zersetzenden Gummistopfen der Mariottflasche kontaminiert (vgl. durchgehende Doppelbande im höheren Molekulargewichtsbereich), so dass schließlich nur Material aus der Auftrennung C 713/714 (neu gepackte Gelsäule) weiterverarbeitet werden konnte.

Säulenfraktion	Σ	I	II	III	IV	V	Recovery
Proteinmenge C 702	30 mg	4.0 mg	4.6 mg	4.2 mg	2.4 mg	1.0 mg	54 %
Proteinmenge C 708	60 mg	12.2 mg	6.4 mg	6.8 mg	3.1 mg	2.4 mg	51,5 %
Proteinmenge C 713/714	295 mg	50.2 mg	56.3 mg	31.0 mg	21.2 mg	8.7 mg	56,7 %

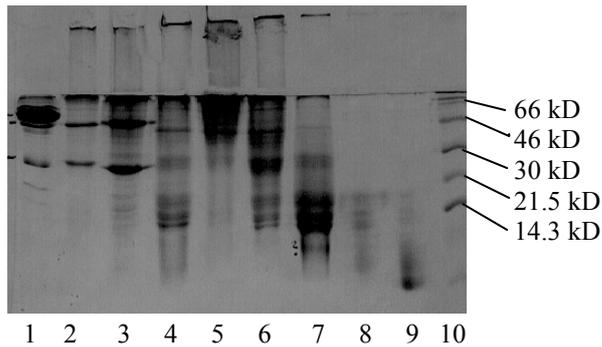
Tabelle VI-14: Proteinmenge der Säulenfraktionen C 713/714 I-V

Bemerkenswert ist, dass die in Fraktion IV von C 713/714 oberste erkennbare Bande ein höheres Molekulargewicht besitzt, als die oberen Banden von Fraktion III. Dies zeigt, dass, obwohl sowohl Gelsäule als auch SDS-Polyacrylamidgel nach dem Molekulargewicht auftrennen, die Protein-Konformation in den unterschiedlichen Lösungsmitteln verschieden ist und dass die Proteinpolymerisierung und -Fragmentierung in beiden Medien unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Eine Rolle spielt dabei z.B. der SDS-Zusatz im Gel, der Proteine auffaltet, bzw. es wäre auch denkbar, dass sich durch Dialysieren und Lyophilisieren der Säulenfraktionen vor dem Auftrag auf SDS-Gel wiederum neue Proteinaggregate gebildet haben könnten, die in einer Bande mit höherem Molekulargewicht resultieren.

Auch hier fällt die insgesamt starke Fragmentierung des Amyloidproteins auf: Neben einem κ -Monomer (Bande bei 21.5 kD) gibt es größere und kleinere molekulare Spezies.

Verglichen mit dem Ausgangsmaterial (H₂O-Überstände) konnten die mutmaßlich „Denaturierte-Amyloidprotein“-haltigen Banden mit einem MW < 30 kD in den Fraktionen III-V selektiv angereichert und zugleich höhermolekulare Proteine (DD Polymere) weitgehend eliminiert werden.

Um dies auch immunchemisch zu bestätigen, wurden wiederum Western Blots angefertigt. Dazu wurden die aus Auftrennung C 713/714 erhaltenen Fraktionen zusammen mit dem Ausgangsmaterial (AM 125) und Kontrollproteinen (NHS, IgG λ (WEG), IgG κ (KAH), MW-Marker) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung VI-12), auf Nitrozellulose geblottet und mit Hilfe der Antikörper Anti-AL κ (UNK), Anti-AL κ (UNK) absorbiert mit κ_1 BJP (MEV), Anti- λ BJP (HEN) und Anti-AH γ (SOL) auf das Vorhanden sein von κ -, λ -, und γ -Ketten(fragmente) untersucht.

Bahnen:

1. 1/8 µl Serum
2. IgGλ (WEG), monoklonal (Kontrolle)
3. IgGκ (KAH), monoklonal (Kontrolle)
4. AM 125, 3. H₂O
5. C713/714 I
6. C713/714 II
7. C713/714 III
8. C713/714 IV
9. C713/714 V
10. Molekulargewichtsmarker

Abbildung VI-12: Größenseparation der Säulenfraktionen C713/714. 1-3: Kontrollen, 4: intakte Fibrille, 5-9: mittels Gelchromatographie aufgetrennte Amyloidproteine (vgl. Abbildung VI-11), 10: Molekulargewichtsmarker. Ziel ist die Identifikation von κ, λ und γ-Ketten in den Säulenfraktionen, Blots nicht abgebildet.

Ergebnis der Western Blots (nicht gezeigt): Anti-ALκ (UNK) und Anti-ALκ (UNK) absorbiert mit 1/20 κ₁BJP (MEV) (0,2 mg/ml) zeigten ein identisches Ergebnis. Dabei sind die Aufträge 4-9 wie erwartet diffus komplett gefärbt i.S. eines hohen Gehalts an κ-Ketten, -Aggregaten und -Fragmenten im H₂O-Ü der Gewebeextraktion wie auch in den Säulenfraktionen. Man sieht in der Serumkontrolle eine Bande bei 25 kD (intakte Kappakette), ebenso wurde in Auftrag 3 deutlich sowie auch schwach in Auftrag 2 eine Bande bei 25 kD angefärbt i.S. des Vorhandenseins einer intakten Kappa-Kette in IgGκ (KAH) wie auch geringer in IgGλ (WEG). Die Anfärbung in IgGλ (WEG) könnte auch durch eine Überladung des Gels zustande gekommen sein (fehlendes spezifisches Fenster).

Anti-λBJP (HEN) zeigt eine diffuse Anfärbung von IgGλ (WEG) mit Betonung einer Bande bei 25 kD (intakte Lambda-Kette), sowie Anfärbung einer solitären Bande bei 25 kD in Auftrag 1 (NHS), 4 (3. H₂O-Ü), 6 (Säulenfraktion II) und 7 (Säulenfraktion III), keine Reaktion mit IgGκ (KAH). Dies zeigt, dass in ALκ (UNK) auch intakte Lambdaketten, wenn auch in geringer Menge, vorkommen, jedoch ohne niedermolekulare Fragmente. Die Nichtanfärbung der Säulenfraktionen I, IV und V ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass diese nur Proteine oberhalb (I) oder unterhalb (IV-V) des Molekulargewichts der leichten Kette enthalten.

Anti-AHγ (SOL) zeigt wie erwartet eine diffuse Anfärbung von IgGλ (WEG) sowie von IgGκ (KAH) im Sinne eines hohen Gehaltes an γ-Schwerenkettens, wiederum mit jeweils deutlicher Aussparung einer Bande im Bereich von 25 kD (vgl. Abbildung VI-10). Diese ausgesparte Bande liegt bei IgGλ etwas höher als bei IgGκ, entsprechend der Lokalisation der λ- und κ-Leichtketten (Coomassiefärbung Abbildung VI-12, Auftrag 2 und 3). Im Serum (Auftrag 1),

im isolierten, gereinigten Amyloid (Auftrag 4), sowie in den Säulenfraktionen I-III (Auftrag 5-7) wurde eine lokalisierte Bande auf Höhe der intakten γ -Kette (ca. 50 kD) angefärbt.

Bewertung: Aus dem Rohgewebe extrahiertes Amyloid enthält (neben anderen Serumproteinen) λ - und γ -Ketten. Diese sind jedoch, verglichen mit der κ -Kette, nur in geringer Menge vorhanden. Sie lassen sich als lokalisierte Banden bei 50 bzw. 25 kD anfärben ohne Hinweis auf Fragmentierung, so dass nicht anzunehmen ist, dass es sich dabei ebenfalls um Amyloidfibrillenproteine handelt. Dagegen findet sich eine kräftige Anfärbung quasi aller Molekulargewichtsbereiche und Säulenfraktionen mit Anti-AL κ im Sinne eines hohen Gehalts an κ -Ketten. Diese sind z.T. stark fragmentiert, liegen andererseits aber auch als höhermolekulare kovalente Aggregate vor, wie es typisch für Amyloid ist. In den niedermolekularen Säulenfraktionen IV und V lassen sich keine λ - und γ -Ketten mehr nachweisen, sie besitzen bezüglich des κ -Gehaltes die höchste Reinheit.

8. Chemische Bestimmung des Kappa-Subtyps durch tryptische Spaltung im Gel, HPLC und Sequenzierung

In der Literatur sind vier verschiedene Subklassen ($\kappa 1$ - $\kappa 4$) der Kappa-Leichtkette beschrieben, die bei Amyloidosen in der Häufigkeit $\kappa 1 > \kappa 3 > \kappa 2 > \kappa 4$ sequenziert wurden. Es lag nahe, dass die bei der Patientin UNK thesaurierte Kappa-Leichtkette möglicherweise einer der seltener vorkommenden Subklassen angehören könnte, da die initial zur immunhistochemischen Detektion eingesetzten Antikörper AL κ (UNK) nur in geringem Maße erkannt hatten. Um diese Frage zu klären, war es nötig, die Aminosäuresequenz weiter C-terminal gelegener Bereiche der Kappa-Leichtkette zu bestimmen.

Die Fraktion IV der Säule C 713/714 (Abbildung VI-11) wurde zur weiteren Analyse ausgewählt, da sie die interessierenden Proteinfractionen in höchster Reinheit enthielt (s.o.) und auch ausreichend Material für mögliche Kontrolluntersuchungen vorhanden war. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (SDS-PAGE, 15%) wurden die Banden mit kolloidalem Coomassie angefärbt, eine kräftige Bande bei ca. 13 kD ausgeschnitten und diese mit Trypsin im Gel gespalten. Der tryptische Spaltmix wurde über eine HPLC aufgetrennt und zwei Elutions-Peaks sequenziert (freundlicherweise durchgeführt von der Abteilung Kellermann / Lottspeich, MPI). Es ergaben sich die zwei Aminosäuresequenzen **ASQAISSNFAWYQLK** und **VDNALQSGNSQESVTEQDSK**. Diese entsprechen im Wesentlichen der CDR 1-Domäne der variablen Region (AS 25-39) bzw. einem Teil der konstanten Region (AS 150-169) der Kappa-Leichtkette (Datenbank: <http://www.expasy.ch>).

Das Fehlen von Insertionen zwischen der 27. und 28. Aminosäure (zwischen Q und A der erstgenannten Sequenz) schließt die Subklassen $\kappa 2$ oder $\kappa 4$ weitgehend aus, eine eindeutige Subklassen-Zuordnung ist jedoch anhand dieser kurzen Peptide nicht möglich. Bemerkenswert ist der Nachweis von Teilen der konstanten Region der Kappa-Leichtkette (vgl. EULITZ und LINKE 1985, SOLOMON et al. 1998, siehe Diskussion).

9. Untersuchung weiterer Gewebeproben, Serum und Urin der Patientin

UNK

Wenngleich bei der Patientin UNK eindeutig eine AL κ -Amyloidose nachgewiesen wurde, ergaben sich anhand des klinischen Befundes, der durchgeführten Funktions- sowie laborchemischen Untersuchungen keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein von Amyloidablagerungen außerhalb der beschriebenen Hauttumore. Serum und Urin wurden auf monoklonale Immunglobuline (M-Gradient) bzw. leichte Ketten (Bence-Jones-Proteinämie oder -urie) untersucht. Eine Immunfixation blieb jedoch in beiden Fällen ohne pathologischen Befund. Von den behandelnden Ärzten wurde außerdem eine Rektumbiopsie sowie eine Knochenmarksbiopsie veranlasst, die unserem Labor zusammen mit Serum- und Urinproben zur Verfügung gestellt wurden.

9.1 Suche nach Amyloid in Rektum- und Knochenmarksbiopsien

Rektumbiopsie nach Kongorotfärbung: Sichtbar ist nur die Lamina propria mucosae, jedoch kein Anschnitt der Muskularis mucosae oder der Submukosa. Daher sind diese Ausschnitte diagnostisch nicht oder nur eingeschränkt verwertbar. In der Kongorotfärbung fand sich kein Amyloid auf 5 OT mit 11 Gewebeschnitten.

Beckenkammbiopsie nach Kongorotfärbung: Der 2 cm lange Stanzzyylinder enthielt ca. 10% Knochenmatrix und ca. 90% Knochenmark. Kein Amyloidnachweis in der Kongorotfärbung auf 5 OT.

Damit findet sich im gesamten untersuchten (z.T. inadäquaten) Probenmaterial kein Hinweis auf systemische Amyloidablagerungen.

9.2 Urin

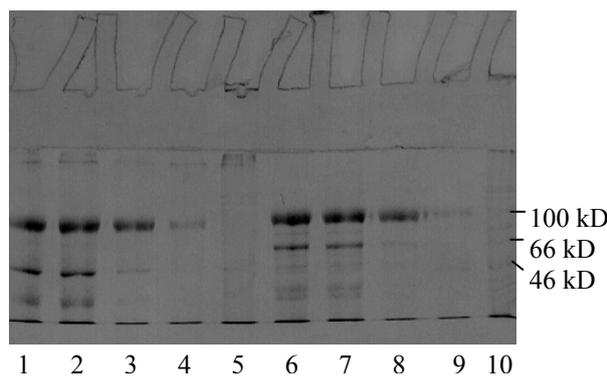
Wie im Methodenteil beschrieben, wurden alle Proteine aus 4 l Urin mit Ammoniumsulfat gefällt und gegen H₂O dialysiert (MWCO 3500).

Das Dialysat wurde zentrifugiert (10 000 rpm). Es zeigte sich ein Sediment und ein Überstand. Das Sediment wurde erneut gewaschen und der dabei erhaltene „Sediment-Überstand“, das Sediment und der zuvor erhaltene Überstand getrennt lyophilisiert.

Überstand	1,567 g, flockig, bräunlich
Sediment-Überstand	0,0145 g, flockig, bräunlich
Sediment	0,255 g, bröckelig, bräunlich

Tabelle VI-15: Aus dem Urin der Patientin (UNK) extrahierte Proteine.

Man erhielt aus 4 l Urin insgesamt 1,8365 g gelblich-bräunliches Lyophilisat (entsprechend 459 mg/l). Klinisch bestand keine Proteinurie: Protein < 60 mg, Albumin < 3 mg pro Liter Urin (Arztbrief 3/01), so dass man davon ausgehen muss, dass das Lyophilisat nur zu einem kleinen Teil aus Protein besteht. Sediment, Sediment-Überstand und Überstand wurden gelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, wie Abbildung VI-13 illustriert.



Auftrag:

1. Urin-Überstand 16 µg ohne β-ME
2. Urin-Überstand 16 µg ohne β-ME
3. Urin-Sediment-Überstand 16 µg ohne β-ME
4. Urin Sediment 16 µg ohne β-ME
5. Am 125, 3. H₂O-Ü, 16 µg ohne β-ME
6. Urin-Überstand 16 µg mit β-ME
7. Urin-Überstand 16 µg mit β-ME
8. Urin-Sediment-Überstand 16 µg mit β-ME
9. Urin Sediment 16 µg mit β-ME
10. Am 125, 3. H₂O-Ü, 16 µg mit β-ME

Abbildung VI-13: Vergleich von Sediment, Sediment-Überstand und Überstand (siehe Tabelle VI-15) in der SDS-PAGE (10%)

In allen drei Urinfraktionen findet man ein im Wesentlichen identisches Bandenmuster, wobei der relative Proteingehalt im Urin-Überstand am größten (dickste Banden), im Urin-Sediment am geringsten (schwächste Banden) ist. Dies weist auf einen hohen Anteil an nicht-Proteinmaterial, z.B. Urochrome, im Sediment hin.

Vergleicht man die Aufträge ohne (1-5) und mit (1-6) β-Mercaptoethanol, fällt auf, dass in beiden Fällen eine kräftige Bande bei ca. 100 kD vorhanden ist, während sich die Bandenmuster im unteren MW-Bereich deutlich unterscheiden: Zusatz von β-ME bewirkt eine Spaltung von Disulfidbrücken, so dass aus höhermolekularen Proteinen Banden von niedrigem MW abgespalten werden, andererseits können Proteine durch stärkere Auffaltung unter β-ME-Zusatz scheinbar an MW gewinnen.

9.3 Vergleich der Proteine in Serum, Urin und Amyloid

Schließlich wurde noch ein Gel zum direkten Vergleich der Molekulargewichte der Serumbanden, Urinbanden und Amyloidextraktionsbanden angefertigt:

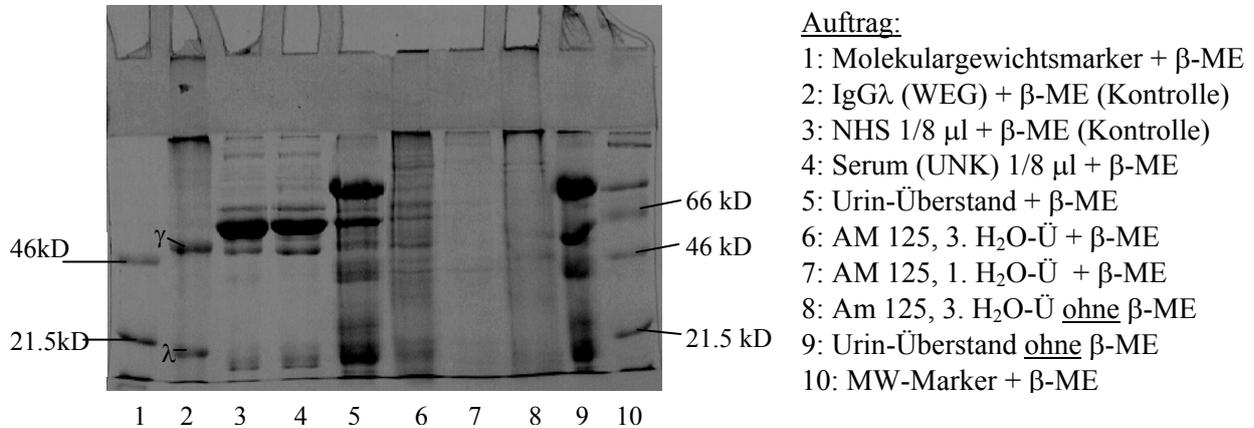


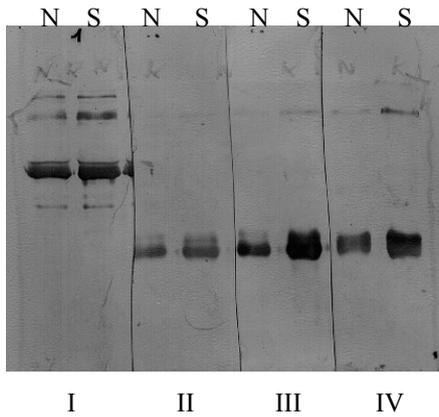
Abbildung VI-14: Vergleich von Proteinen in Serum, Urin und Amyloid in der Auftrennung nach Größe über eine SDS-PAGE (12%)

Im Urin findet sich eine dicke Bande mit dem Molekulargewicht von Albumin, die unteren Banden im Urinauftrag bei ca. 25 kD korrelieren z.T. mit Banden in der Amyloidextraktion bzw. mit den unteren Serumbanden und entsprechen damit am ehesten freien Leichtketten. Die Identität der prominentesten Urinbande oberhalb von 66 kD ist unklar. Auf den ersten Blick sind *keine* Unterschiede zwischen NHS und Serum (UNK) erkennbar, insbesondere keine ausgeprägte Bande bei 25 kD im Serum (UNK), die einer monoklonalen Kappa-Leichtkette hätte entsprechen können oder auch bei 50 kD (γ -schwere Kette).

9.4 Vergleich von Serum und Urin durch Western Blot

Das Serum der Patientin UNK wurde zusätzlich immunchemisch (Western Blot) mit NHS bzgl. des Gehalts an κ , λ und γ -Ketten verglichen (Abbildung VI-15): Es zeigt sich bei jeweils gleicher Auftragsmenge im Patientenserum eine deutlich kräftigere, gedoppelte κ -Bande (III), wie auch eine leicht verstärkte λ -Bande (IV). Bezüglich der Reaktion mit Anti- γ bestehen keine wesentlichen Unterschiede. Ob es sich hier möglicherweise um eine krankheitsrelevante κ -Kettenvermehrung handelt bleibt spekulativ, eine Auftrennung nach Ladung wurde nicht durchgeführt.

In Abbildung VI-16 ist der direkte Vergleich von Urin, Amyloid und Serum der Patientin UNK im Western Blot gezeigt.



Auftrag:

N: NHS 1/8 μ l
S: Serum (UNK) 1/8 μ l

I: Anti-AH γ (SOL)
II: Anti-AL κ (UNK)
III: Anti- κ BJP (KLL)
IV: Anti- λ BJP (HEN)

Abbildung VI-15: Vergleich von NHS und Serum (UNK) im Western Blot (SDS-PAGE, 11%).

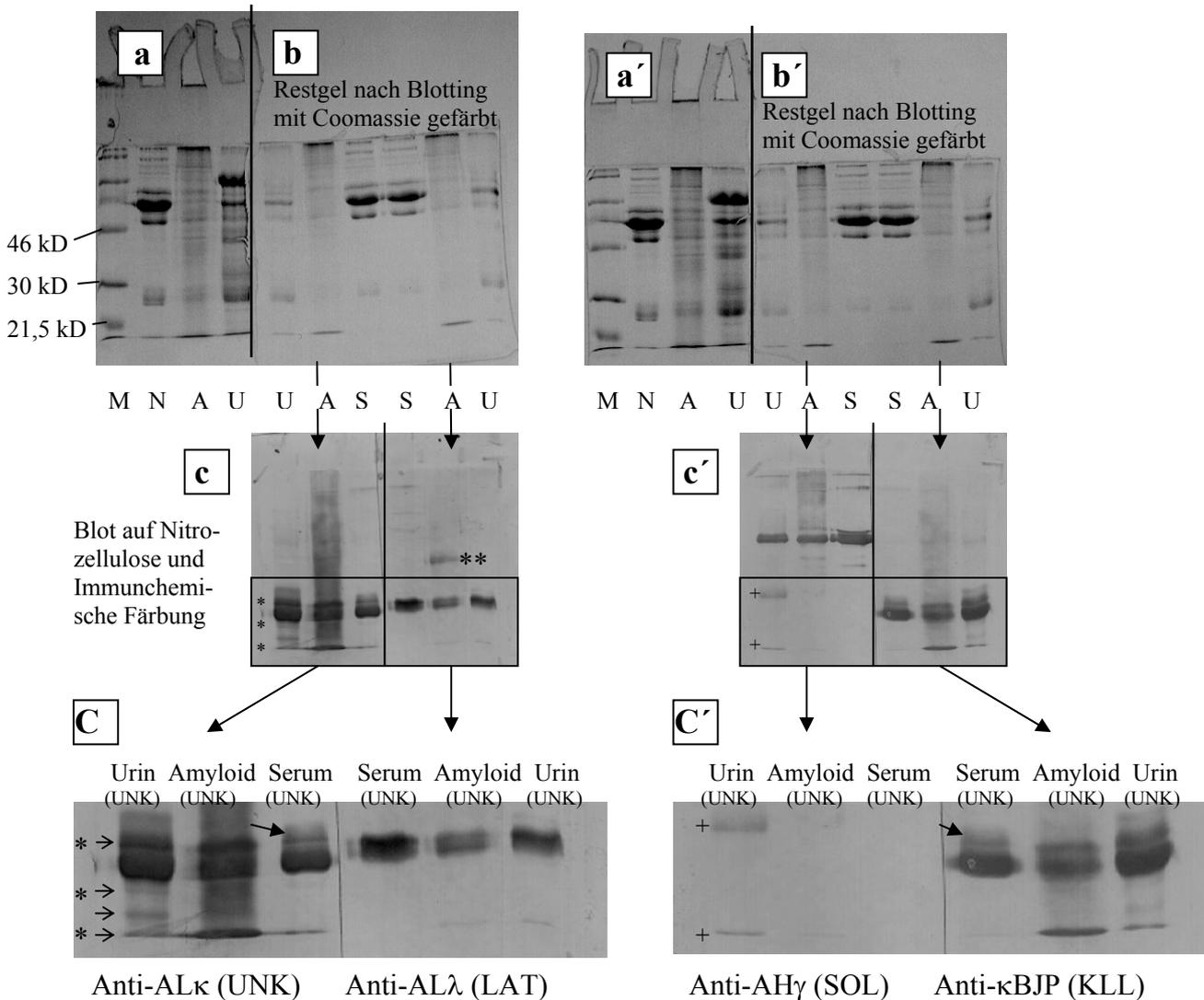


Abbildung VI-16: Direkter Vergleich von Urin, Serum und Gewebeextrakt der Patientin UNK hinsichtlich der Proteinzusammensetzung (κ , λ , γ). Identischer Auftrag auf beide Gele (13,5%): M: MW-Marker, N: NHS, A: AM 125, 3. H₂O-Ü, U: Urin (UNK), S: Serum (UNK) 1/8 μ l. Die ersten 4 Spalten jedes Gels (a, a') wurden mit Coomassie gefärbt, die Spalten 5-10 (b, b') auf Nitrozellulose geblottet und anschließend die Gele gefärbt, um die Vollständigkeit des Blots festzustellen. c, c': Western-Blots von b und b'. C, C': Ausschnitte aus c, c': vergrößert dargestellt (siehe Kasten) ist der MW-Bereich unter 30 kD. Sterne bezeichnen κ -Fragmente im Urin, Pfeile eine zusätzliche κ -positive Bande im Serum (UNK).

Man erkennt, dass der Antikörper Anti-AL κ (UNK) das Antigen AM 125, 3. H₂O-Ü diffus anfärbt im Sinne eines hohen Gehaltes an intakten, fragmentierten und multimerisierten κ -Ketten. Im Serum wird lediglich die intakte κ -Kette angefärbt als Beweis der Spezifität von Anti-AL κ (UNK) für die κ -Kette. Außerdem erkennt Anti-AL κ (UNK) κ -Ketten im Urin der Patientin UNK. Interessant ist dabei, dass im Urin mehrere niedermolekulare Banden unterhalb von 25 kD dargestellt sind (*), sowie auch ein unscharfer Bereich oberhalb von 25 kD. Im Serum zeigt sich hier eine Doppelbande (Pfeil), die jedoch nicht zwingend im Sinne von Monoklonalität gewertet werden darf, da sich auch im Normalserum (Abbildung VI-15) eine, wenn auch nicht so stark ausgeprägte, Doppelbande zeigt.

Die Anfärbung mit Anti-AL λ (LAT) weist λ -Ketten bei 25 kD in Serum, Urin und Amyloid nach. Die Bande bei 50 kD im Amyloid (siehe c, **) stellt vermutlich λ -Dimere dar. Im Gegensatz zur κ -Kette zeigt die λ -Kette im Urin keine Fragmentierung.

Die Färbung mit Anti-AH γ (SOL) (III) zeigt erwartungsgemäß γ -Ketten im Serum und (wie in VI.7. schon nachgewiesen,) auch in der Amyloidextraktion. Man findet auch im Urin γ -Ketten sowie γ -Ketten-Fragmente (siehe c', C' +). Die monoklonalen Kappa-Fragmente werden von Anti-AH γ (SOL) nicht erkannt, da der gesamte Bereich unterhalb von 30 kD, der kräftig mit Anti-AL κ angefärbt wird, ungefärbt bleibt, was wiederum die Spezifität von Anti-AH γ (SOL) für γ -Ketten beweist.

Die Färbung mit Anti- κ BJP (KLL) zeigt schließlich ein ähnliches Bild wie die mit Anti-AL κ (UNK), wobei im Unterschied zu Anti-AL κ (UNK) die Banden unterhalb von ca. 10 kD im Urin nicht bzw. wesentlich schwächer dargestellt sind, wie auch insgesamt alle Banden schwächer angefärbt sind. Zweifellos auffällig ist, dass von λ keine niedermolekularen Fragmente im Urin auftauchen, κ jedoch mehrfach fragmentiert erscheint. Ob diese κ -Ketten-Fragmente das amyloidogene Substrat sind, kann spekuliert werden.

9.5 Immunchemischer Vergleich von Serum und Urin im Ouchterlony-Test

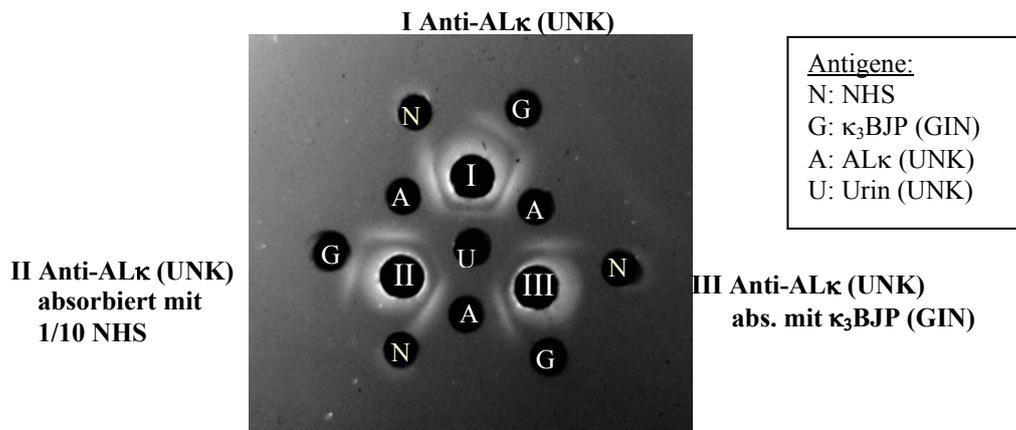


Abbildung VI-17: Vergleich der Reaktivität verschiedenartig absorbierter Anti-ALκ (UNK)-Antiseren gegen NHS, ein κBJP, ALκ (UNK) und Urin (UNK) in der Immundiffusion (Ouchterlony-Test).

Die Immundiffusion zeigt mehrere interessante Reaktionen:

- (1) Anti-ALκ (UNK) reagiert stark mit dem homologen Antigen ALκ (UNK), aber auch mit einem ähnlichen Protein im Urin (UNK), mit einem κ₃BJP eines anderen Patienten (GIN), sowie (schwach) mit den κ-Ketten in NHS.
- (2) Wird ALκ (UNK) mit NHS absorbiert und verliert damit annähernd alle gegen native κ-Ketten gerichtete Antikörper, reagiert es dennoch weiterhin fast unverändert mit dem homologen Antigen ALκ (UNK), was zeigt, dass die relevanten Epitope nicht auf Schwereketten-gebundenen nativen κ-Ketten vorkommen.
- (3) Durch Absorption mit NHS wird die ohnehin schwache Reaktion mit NHS erwartungsgemäß vollständig eliminiert, κ₃BJP (GIN) und Urin werden weiterhin (etwas abgeschwächt) präzipitiert, was als Zeichen einer hohen κ-Konzentration in κ₃BJP (GIN) und Urin (UNK) gewertet werden kann bzw. durch eine im Serum zu geringe κ-Konzentration um alle gegen κ gerichteten Antikörper vollständig zu neutralisieren.
- (4) Interessant ist auch, dass bei Absorption mit κ₃BJP (GIN) nicht nur erwartungsgemäß die Reaktivität gegen κ₃BJP (GIN), sondern gleichzeitig auch die (ohnehin sehr schwache) Reaktivität von Anti-ALκ (UNK) gegen NHS vollständig unterbunden wird. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die positive Reaktion von Anti-ALκ (UNK) gegen NHS durch die κ-Ketten im Serum bedingt ist und nicht durch unspezifische Reaktionen mit anderen Serumbestandteilen, die alleine mit κBJP nicht hätten absorbiert werden können.
- (5) Durch Absorption mit κ₃BJP (GIN) fällt die Reaktivität von Anti-ALκ (UNK) gegen NHS weg, gegen ALκ (UNK) besteht weiterhin eine kräftige Reaktion. Auch gegen Urin zeigt sich

weiterhin eine schwache aber deutlich erkennbare Präzipitationslinie. Die Restaktivität nach Absorption mit κ_3 BJP (GIN) ist damit in erster Linie gegen das Amyloid (fragmentiertes und umgefaltetes κ BJP (UNK)) gerichtet. Es könnte aber auch eine Restaktivität gegen den Subtyp des κ -Amyloids (UNK) enthalten sein im Sinne eines durch Absorption mit κ_3 BJP (GIN) neu entstandenen Anti-Subklassenspezifischen Antiserums, das im Urin enthaltene κ -Ketten, die dann möglicherweise als κ BJP zu deuten sind, weiterhin präzipitiert.

10. Immunologische Klassifizierung des Amyloids (UNK) mit Hilfe der Immundiffusion (Ouchterlony-Test) (LINKE 1985)

10.1 Immunchemischer Beweis, dass es sich bei A (UNK) um AL κ -Amyloid handelt

Im Ouchterlony-Test konnte das Amyloid (UNK) auch immunchemisch als AL κ klassifiziert werden. Dazu wurden gegen verschiedene Amyloidklassen (ATTR, AA, AL κ , AL λ , AH γ , A β_2 M) gerichtete Antikörper jeweils gegen entsprechende Kontrollantigene und gegen AL κ (UNK) aufgetragen. Abbildung VI-18 zeigt beispielhaft einen derartigen Ouchterlony-Test, hier mit drei antigenen Systemen.

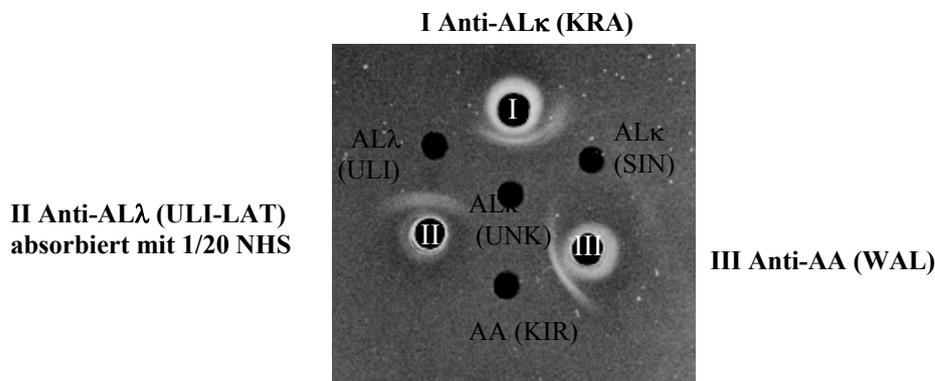


Abbildung VI-18: Klassifizierung des Amyloidproteins von UNK mit Hilfe der Immundiffusion. Das Stanzloch in der Mitte enthält solubilisiertes AL κ (UNK) Protein. Die äußeren Stanzlöcher enthalten drei antigenen Systeme (Antigen + entsprechender Antikörper): AA - Anti-AA; AL λ - Anti-AL λ ; AL κ - Anti-AL κ .

Anti-AL λ (ULI-LAT) reagiert nur gegen das Kontrollantigen AL λ (ULI), nicht jedoch gegen AL κ (UNK) oder AA (KIR), ebenso reagiert Anti-AA (WAL) gegen AA (KIR), nicht jedoch gegen AL κ (UNK) oder AL κ (SIN). Anti-AL κ (KRA) dagegen reagiert gegen AL κ (SIN) und gegen AL κ (UNK), was das Vorhandensein gleicher oder zumindest sehr ähnlicher Epitope auf beiden Antigenen beweist, d.h. dass A (UNK) κ -antigene Determinanten enthält. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Präzipitationslinien gegen AL κ (SIN) leicht über die

von AL κ (UNK) spornt, d.h. auf AL κ (SIN) werden mehr präzipitierende Epitope erkannt als auf AL κ (UNK). Dies könnte z.B. dadurch bedingt sein, dass AL κ (KRA) und AL κ (SIN) die gleiche Subklasse besitzen, die eine andere ist als die von AL κ (UNK) oder größere Fragmente repräsentieren. Die Tatsache, dass die Präzipitationslinien in allen Fällen konkav zum Antikörperauftrag verlaufen zeigt, dass die Antikörper mit ca. 150 kD ein höheres Molekulargewicht als ihre korrespondierenden Antigene besitzen (vgl. Abbildung V-4).

Im Ouchterlony präzipitiert der Antikörper Anti-AL κ (SIN) AL κ (UNK) deutlich, während er in der immunhistochemischen Färbung anfangs geringer (Tabelle VI-1) reagiert hatte.

Keines der gegen eine andere Amyloidklasse als Ak gerichteten Antiseren zeigte eine Präzipitation von AL κ (UNK), so dass auch immunologisch A (UNK) eindeutig als AL κ identifiziert werden konnte.

10.2 Subklassenzuordnung

Durch Teilsequenzierung kurzer Peptide war es nicht gelungen, die κ -Subklasse von AL κ (UNK) eindeutig festzulegen, da in den sequenzierten Abschnitten Subklassen-spezifische Sequenzen fehlten. Es wurde daher versucht, die κ -Subklasse auf immunchemischem Wege zu bestimmen. Im Vorfeld wurden folgende theoretische Überlegungen angestellt:

Ein gegen eine beliebige (vollständige) κ -Kette gerichtetes polyklonales Antiserum sollte in der Regel alle vier Subklassen erkennen, da alle Subklassen die gleiche C-Region, falls vorhanden, aufweisen, sowie gewisse Bereiche in der variablen Region (z.B. FR3) bei allen Subklassen relativ ähnlich sind.

Daraus lässt sich ein Anti-Subklassen-Antiserum erzeugen, wenn man es mit der (vollständigen, wegen der C-Region) κ -Kette eines oder mehrerer anderen Subklassen absorbiert. Im Idealfall sollte das Ausgangs-Antiserum gegen die Subklasse erzeugt worden sein, gegen die man das subklassenspezifische Antiserum herstellen will. Dementsprechend ist ein Anti- κ 1-spezifisches Antiserum ein Antiserum gegen κ 1, das mit κ 2, κ 3 oder κ 4 absorbiert wurde. Absorbiert man mit nur einer anderen Subklasse, ist es theoretisch möglich, dass trotzdem noch andere Subklassen erkannt werden. Wird dagegen mit κ 2, κ 3 und κ 4 absorbiert, könnte es sein dass, da jede κ -Kette unabhängig von der Subklasse im Rahmen der Antikörper-Vielfalt (vgl. Einleitung) in der Regel keiner anderen κ -Kette gleicht und in Teilbereichen anderen Subklassen in der Aminosäureabfolge ähneln kann, so viel der Spezifität absorbiert wird, dass ungewollt ein Anti-Idiotyp-Antiserum resultiert.

Das Anti-Idiotyp-Antiserum sollte nur noch die (monoklonale) Kappa-Kette erkennen, gegen die es erzeugt wurde. Es kann am einfachsten hergestellt werden durch Absorption eines Antiserums durch eine κ -Kette gleicher Subklasse, die aber aus einem anderen Organismus bzw. einem anderen Klon stammt wie die κ -Kette, gegen die das Antiserum erzeugt wurde.

Da aufgrund der hohen Sequenzvariabilität von κ -Leichtketten und zusätzlicher Fragmentierung der aus Amyloiddeposits extrahierten κ -Ketten (unklarer Gehalt an Fragmenten der C-Region) die zur Verfügung stehenden Antikörper wie auch zur Absorption verwendeten Antigene äußerst heterogen und diesbezüglich kaum charakterisiert (d.h. außer κ_1 BJP (MEV) nicht oder nur z.T. sequenziert) waren, führten die zahlreich durchgeführten Ouchterlony-Tests mit unterschiedlich absorbierten Antiseren zu widersprüchlichen Ergebnissen, ohne dass es gelang, mit letzter Sicherheit Rückschlüsse auf die Subklasse von AL κ (UNK) zu ziehen.

Allerdings konnte erfolgreich ein Anti-Idiotyp-Antiserum hergestellt werden (Abbildung VI-19). Möglicherweise ist hier aber auch ein Amyloid-spezifisches Antiserum entstanden, da nur noch Amyloid, jedoch nicht mehr κ BJP erkannt werden.

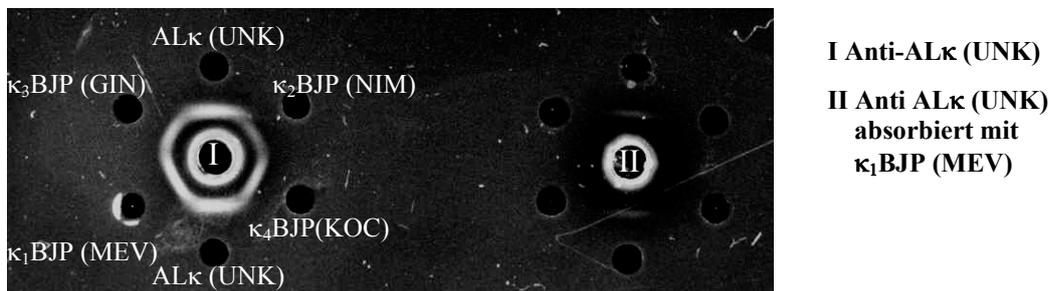


Abbildung VI-19: Herstellung eines Anti-Idiotypischen Antiserums durch Absorption.

11. Vollständige Sequenzierung des AL κ (UNK)-Proteins

Um endgültige Klarheit über die Subklassenzugehörigkeit von AL κ (UNK) zu erlangen und auch Hinweise auf die in der Literatur diskutierte Beziehung zwischen AS-Primärstruktur, Amyloidogenität und Organotropismus eines Proteins zu erhalten, wurde die bei der Patientin UNK thesaurierte κ -Leichtkette vollständig sequenziert. Sie wurde dazu durch enzymatischen Verdau mit Trypsin (11.1), Asp-N (11.2) und Chymotrypsin (11.3) zunächst in kleinere Peptide zerlegt und diese einzeln analysiert. Die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungen - Auftrennung des jeweiligen Spaltmix über HPLC, Aminosäuresequenzanalyse durch Edman-Abbau sowie zugehörige massenspektrometrische Daten - werden im Folgenden dargelegt.

Anhand von Referenzsequenzen aus der Internet-Datenbank (<http://www.expasy.ch>) wurden dann die sequenzierten Fragmente in die richtige Reihenfolge gebracht und mit Hilfe überlappender Peptide die vollständige Sequenz ermittelt (11.4). Schließlich wurden einige der in AL κ (UNK) im Western Blot nachgewiesenen κ -Ketten-Fragmente N-terminal ansequenziert und bezüglich ihres Molekulargewichtes untersucht (11.5).

11.1 Tryptische Spaltung im Gel

Die erwiesenermaßen (vgl. VI.7.) hochreine Säulenfraktion C 713 / 714 IV wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt. Es konnten 6 Banden unterschieden werden, deren molekulare Größe abgeschätzt wurde wie in Abbildung VI-20 dokumentiert.

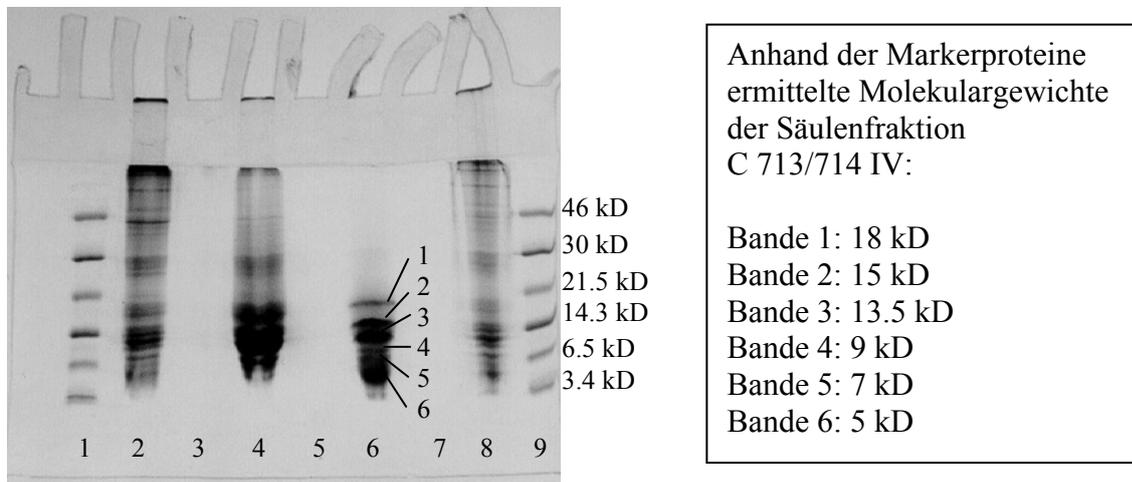


Abbildung VI-20: SDS-PAGE-Auftrennung (15%) der Säulenfraktion C 713/714 IV (Slot 6): Es konnten 6 Banden im Molekulargewichtsbereich von ca. 5 bis 18 kD unterschieden werden. Daneben: 1+9: Molekulargewichtsmarker; 2: AM 125, 3. H₂O-Ü; 4: C 713/714 III; 8: AM 125, 12. H₂O-Ü.

Jede der 6 Banden wurde mit dem Skalpell einzeln aus dem Gel ausgeschnitten und, wie im Methodenteil beschrieben, mit Trypsin verdaut. Da Trypsin C-Terminal von R (Arg) und K (Lys) spaltet, sind - die letztendlich ermittelte Sequenz von AL κ (KUN) zugrundegelegt (vgl. Abbildung VI-27) - folgende Spaltstücke (geordnet von N-terminal nach C-terminal) zu erwarten:

Spaltstück NR	Sequenz	monoisotopische Masse (M + H) ⁺	AS-Pos.
1	AIQLTQSPSSLSAFVGDGVTITCR	2451.3 + 57	1-24
2	ASQAISSNFAWYQLK	1713.9	25-39
3	SGK	291.2	40-42
4	APK	315.2	43-45
5	VLIYDVSTLQSGVPPR	1743.9	46-61
6	FDGSGSGTDFTLTISNLQPEEFATYYCQQLNS FPITFGQGTR	4638.1 + 57	62-103
7	LEIR	530.3	104-107
8	R	175.1	108
9	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	1946.0	109-126
10	SGTASVVCLLNNFYPR	1740.9 + 57	127-142
11	EAK	347.2	143-145
12	VQWK	560.3	146-149
13	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	2135.9	150-169
14	DSTYLSLSTLTLTK	1502.8	170-183
15	ADYEK	625.3	184-188
16	HK	284.2	189-190
17	VYACEVTHQGLSSPVTK	1818.9 + 57	191-207
18	SFNR	523.3	208-211
19	GEC	308.1 + 57	212-214

Tabelle VI-16. Nach Trypsinverdau erwartete Spaltstücke (1-19) aus ALκ (UNK). Angabe der Massen in Dalton sowie zugehörige AS-Position im Molekül.

Anmerkung 1: Eine Massenzunahme + 57 kommt durch die Carboxyamidomethylierung von Cystein durch Reduzieren und Alkylieren mit DTT und Iodacetamid zustande.

Anmerkung 2: Der Einfachheit halber wird hier die letztendlich ermittelte Sequenz zugrundegelegt. Im praktischen Vorgehen konnte natürlich nicht von vornherein die fertige Aminosäuresequenz zugrundegelegt werden, da diese ja erst ermittelt werden musste.

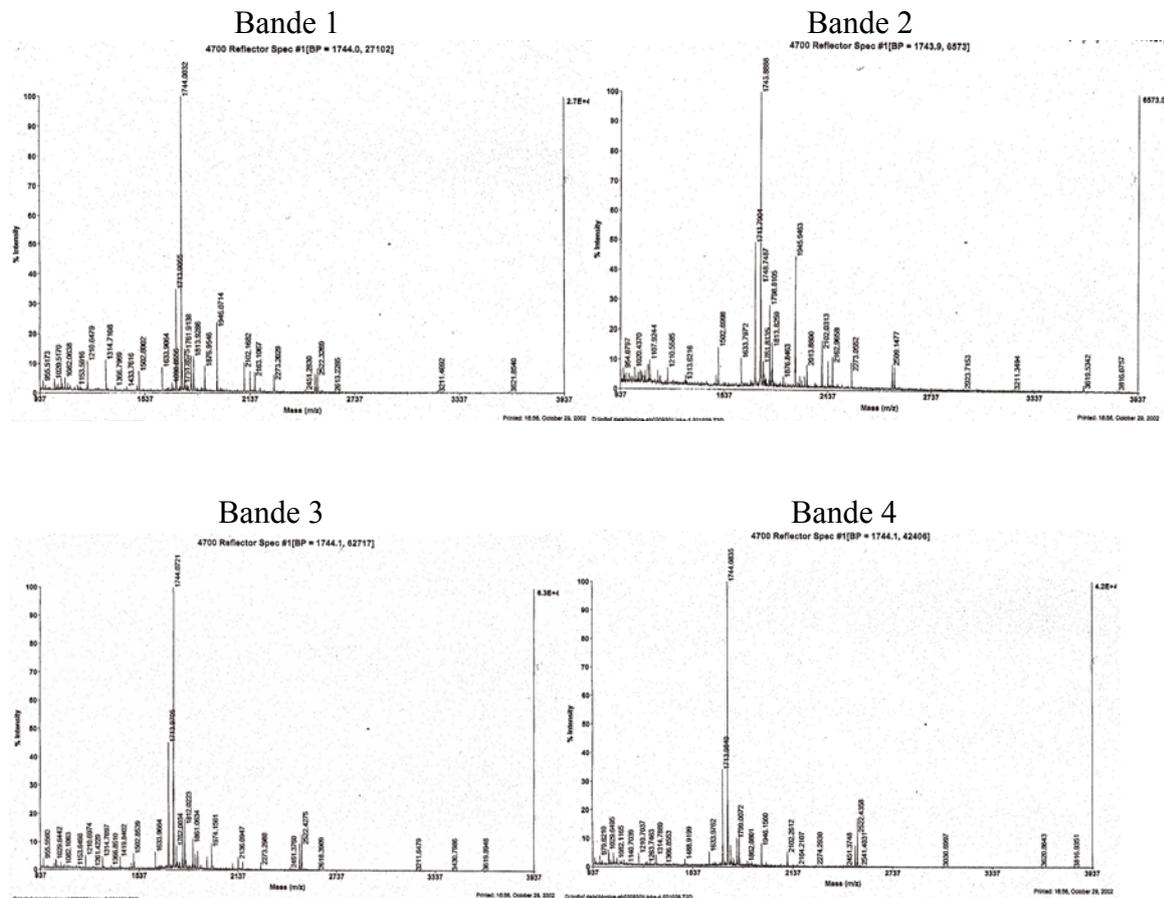
Es wurden praktisch also zunächst die Einzelfragmente sequenziert. Dabei gab es, da jeder sequenzierte HPLC-Peak in der Regel 1-4 Peptide enthielt (vgl. Tabellen VI-17, VI-19, VI-20), für jede Aminosäureposition mehrere in Frage kommende Aminosäuren. Um zu entscheiden, welche Aminosäure an welcher Position die richtige ist, dienen folgende Kriterien: 1. Falls in einem Peak mehrere Peptide enthalten sind, so meist in ungleichen Anteilen, so dass aus der Höhe des Peaks einer Aminosäure auf deren Zugehörigkeit zur Haupt- oder Nebensequenz geschlossen werden kann. 2. Die im Edman-Abbau ermittelten Aminosäuresequenzen lassen sich anhand der im zugehörigen HPLC-Peak gefundenen Massen (erwartete Masse - massenspektrometrisch ermittelte Masse) auf Stimmigkeit überprüfen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn zwei Peptide mengenmäßig etwa gleichstark in einem HPLC-Peak vertreten sind und Haupt- und Nebensequenz damit anhand der Peakhöhen nicht sicher unterschieden werden können. 3. Aus verschiedenen

enzymatischen Spaltungen gewonnene Peptide überlappen sich und geben zusätzliche Sequenzsicherheit. 4. Datenbanksequenzen geben Hinweise auf die mögliche Aminosäureabfolge (z.B. <http://www.expasy.ch>).

So war es möglich, schließlich die hier angegebene vollständige Sequenz zu ermitteln und mit deren Hilfe schließlich wiederum zu überprüfen, ob die enzymatische Spaltung erwartungsgemäß erfolgte.

Massenspektrometrie

Wenn man den tryptischen Verdau massenspektrometrisch untersucht, d.h. alle im tryptischen Spaltmix enthaltenen Peptide auf ihre Masse hin analysiert, ergibt sich ein sogenannter massenspektrometrischer *fingerprint*, der alle enthaltenen Massen (X-Achse) und deren Häufigkeit (~ Intensität, Y-Achse) in einem Diagramm zusammenfasst. Ein solcher *fingerprint* wurde für alle sechs Banden freundlicherweise von Fr. Monica Zabowa (Abt. Lottspeich, MPI) erstellt. Im Idealfall korrespondieren die theoretisch erwarteten Massen der Spaltpeptide (Tabelle VI-16) mit den tatsächlich gefundenen Massen.



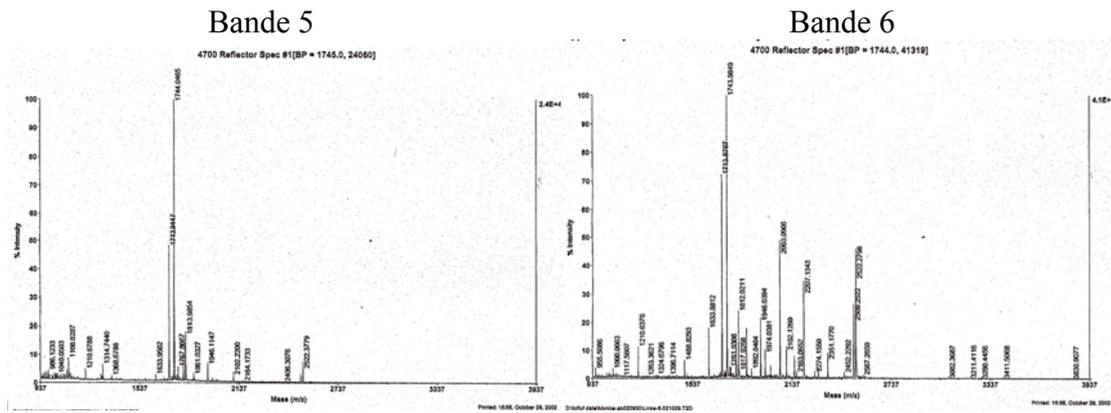


Abbildung VI-21: Massenspektrometrische Untersuchung des tryptischen Spaltmixes der Banden 1-6 aus Säulenfraktion C 713 / 714 IV

Dabei kommen u.a. die Massen 1713, 1743, 1946 und 2509 (tryptischen Peptiden der Kappa-Leichtkette mit den Positionen 25-39 (ASQAISNFAWYQLK), 46-61 (VLIYDVSTLQSGVPPR), 109-126 (TVAAPSVFIFPPSDEQLK) und 1-24 (AIQLTQSPSSLSAFVGDGTITCR) der Aminosäuresequenz entsprechend, vgl. Tabelle VI-16) im Spaltmix aller 6 Banden vor, dagegen die Massen 1502, 1875 und 2135 (entsprechend den Positionen 170-183 (DSTYLSSTLTLK), 191-207 (VYACEVTHQGLSSPVTK), 150-169 (VDNALQSGNSQESVTEQDKS)) nur in den oberen Banden 1-3.

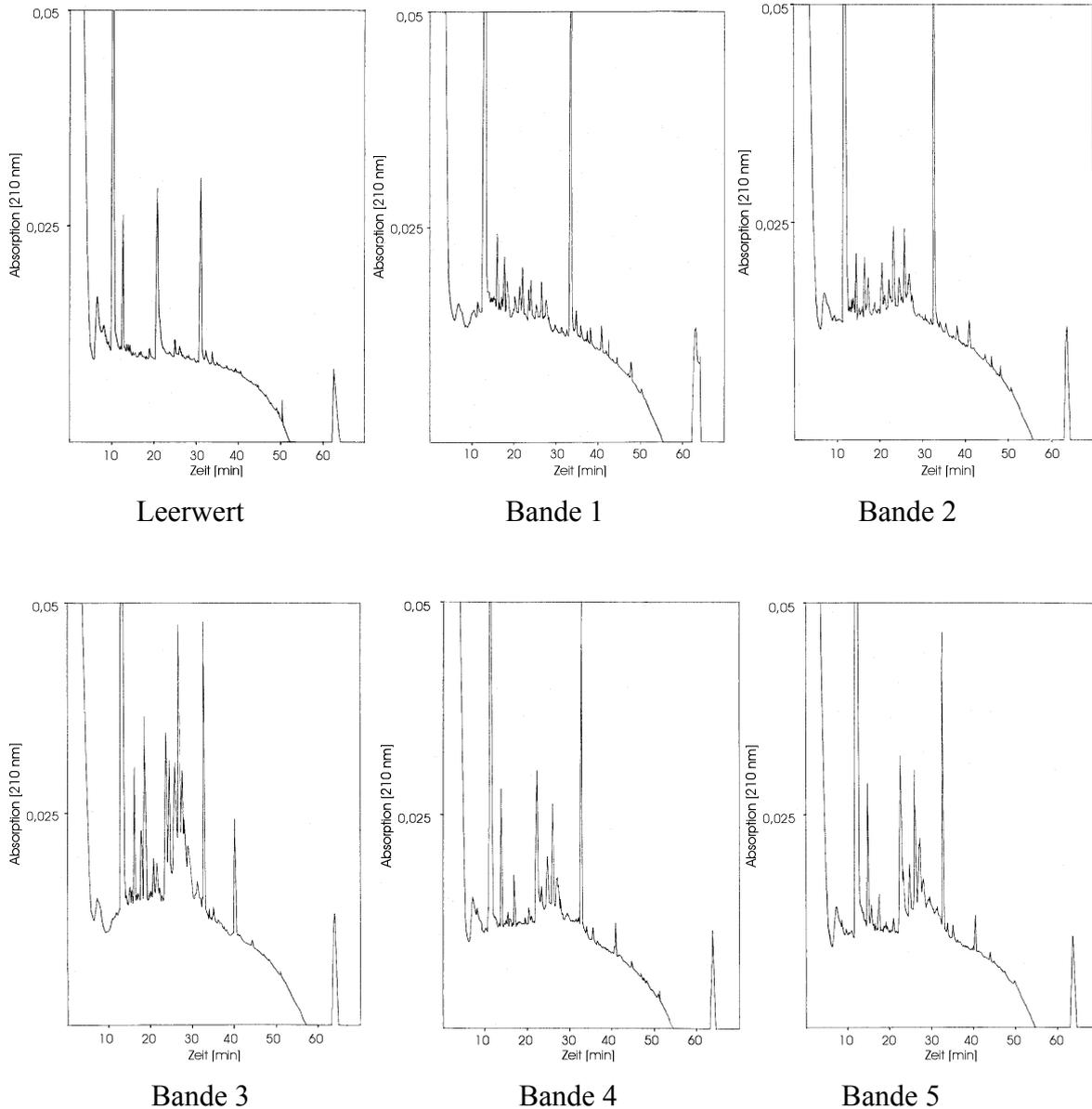
Weitere häufiger vorkommende Massen sind 955, 1210, 1633, 1761, 1812, 2102, 2273 und 2522. Davon ließe sich die Masse 1210 der Sequenz SFPITFGQGTR zuordnen, für 2102 käme RTVAAPSVFIFPPSDEQLK in Frage, für 1633 (eher unwahrscheinlich) FPITFGQGTRLEIR.

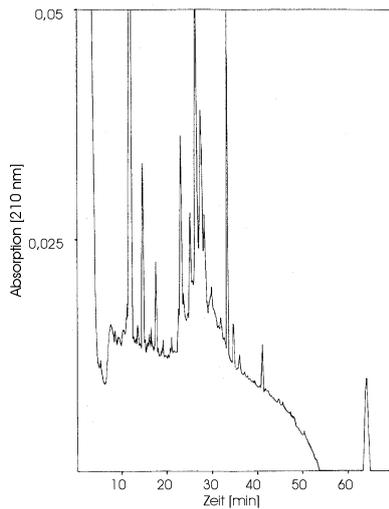
Das Vorkommen übereinstimmender Massen in allen *fingerprints* stützt die Vermutung, dass alle 6 Banden unterschiedlich lange Fragmente derselben Kappa-Kette enthalten. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Banden in sich inhomogen sind, d.h. nicht nur ein einziges Fragment enthalten, das mit der 1. Aminosäure beginnt und mit dem am weitesten C-terminal liegendsten, massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptid endet. Denn dann müsste das Protein in Bande 6 aus mindestens (von AIQ bis QLK) 126 Aminosäuren bestehen, was nicht mit seiner Größe (5 kD) vereinbar ist. Vielmehr sind offenbar in einer Bande verschiedene, etwa gleich lange / schwere Fragmente der Kappa-Kette vorhanden, wobei die Banden 1-3 massenspektrometrisch Sequenzen aus der gesamten Leichtkette bieten, während die Banden 4-6 vermutlich nur Sequenzen aus dem Bereich vor der 170. Position (Ende des tryptischen Spaltstücks Nr. 13) beinhalten, da die in Banden 1-3 nachgewiesenen Massen 2135

(tryptisches Spaltstück Nr. 13), 1502 (Nr. 14) und 1818 + 57 (Nr. 17) in den Banden 4-6 fehlen.

HPLC

Der Spaltmix jeder Bande wurde ferner über HPLC in die einzelnen aus der tryptischen Spaltung resultierenden Peptide aufgetrennt. Die HPLC-Läufe zeigt Abbildung VI-22:





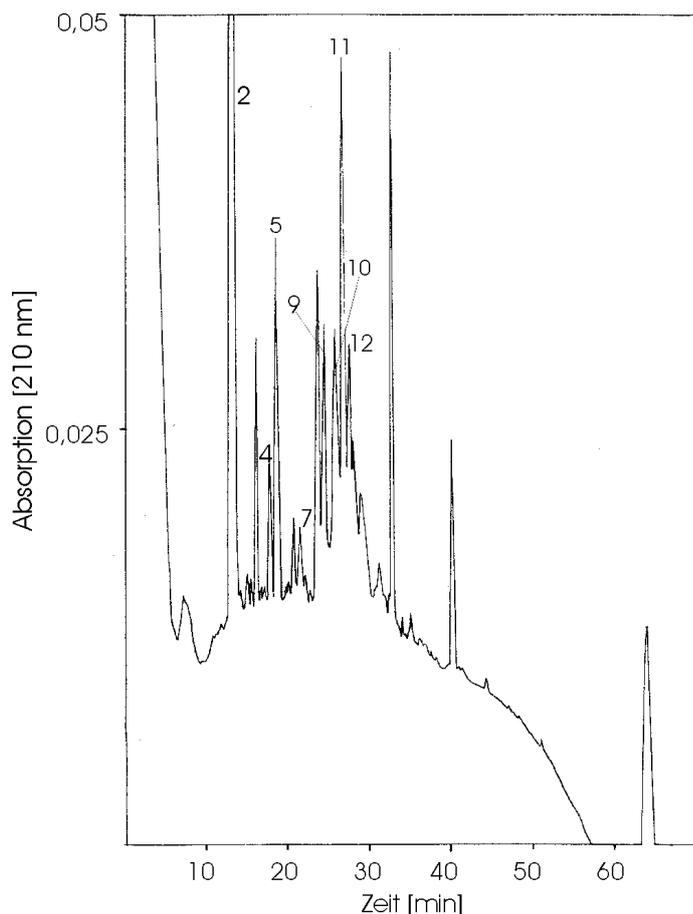
Bande 6

Abbildung VI-22: HPLC-Auftrennung des tryptischen Verdaus der Banden 1-6

Wenn man die auch schon im „blank“ (Leerwert = Chromatogramm ohne Probe) vorhandenen Peaks jeweils abzieht, erkennt man ähnliche Peaks v.a. in Banden 3-5, wobei jedoch die Peakhöhe teilweise erheblich variiert.

Aminosäuresequenzierung des tryptischen Spaltmix von Bande 3

Die 3. Gelbande wurde, da sie in HPLC (hohe Peaks), Gellauf (dickste Bande) wie auch Massenspektrometrie (viele Massen) am erfolgversprechendsten schien, zur Aminosäuresequenzierung ausgewählt. Die Peaks aus dem HPLC-Lauf (Abbildung VI-23) wurden dazu einzeln massenspektrometrisch untersucht und mittels Edman-Abbau sequenziert. So ergab sich jeweils ein Daten-Paar aus über die Sequenzierung und die Masse ermittelten Proteinsequenzen (Tabelle VI-17).



Sequenzen der analysierten HPLC-Fractionen der Bande 3 aus der Säulenfraktion C 713/714 IV nach tryptischer Spaltung im Gel:

2: ADYEK
 4: VDNALQS
 5: VYWK + LEIR
 7: VYACEVTHQGL
 9: DST
 10: VLIYDVSTCQSGVPPR
 11: ASQAISNFAWYQLK
 12: TVAAPSVFIFPPSDEQLK(SGT) + AIQLTQSPSSLSAFVGDGTVTITCR

Abbildung VI-23: HPLC-Lauf der tryptisch verdauten Bande 3 der Säulenfraktion C 713/714 IV, sequenzierte Peaks nummeriert; daneben die aus den Peaks erhaltenen Aminosäuresequenzen.

HPLC-Fraktion	gefundene Sequenz im Edman-Abbau	gefundene Masse (M + H) ⁺	erwartete Masse (M + H) ⁺	der Masse entsprechende Sequenz	AS-Position
T 2	ADYEK		625.3	ADYEK	184-188
T 4	VDNALQS	2136.1	2135.9	VDNALQSGNSQESVTEQD SK	150-169
T 5	VQWK LEIR		560.7 530.3	VQWK LEIR	146-149 104-107
T 7	VYACEVTHQGL	1876.9	1818.9 + 57	VYACEVTHQGLSSPVTK	191-207
T 9	DST	1502.5	1502.8	DSTYLSSTLTLSK	170-183
T 10	VLIYDVSTLQSGVPPR	1743.8	1743.9	VLIYDVSTLQSGVPPR	46-61
T 11	ASQAISNFAWYQLK	1713.8	1713.8	ASQAISNFAWYQLK	25-39
T 12	TVAAPSVFIFPPSDEQLK AIQLTQSPSSLSAFVGD GVTITCR	1946.1 2509.4	1946.0 2451.2 + 57	TVAAPSVFIFPPSDEQLK AIQLTQSPSSLSAFVGDGV TITCR	109-126 1-24

Tabelle VI-17: Zusammenschau von Ergebnissen aus Proteinsequenzierung und Massenspektrometrie. Die Massenzunahme + 57 von C-haltigen Peptiden wurde unter 11.1 erklärt (vgl. Tab. VI-16).

Für alle ermittelten Sequenzen > 10 Aminosäuren (entsprechend MW >1000) konnte ein massenspektrometrisches Korrelat gefunden werden. Peptide mit einer Masse < 1000 wurden

technisch bedingt nicht erfasst. Nicht alle massenspektrometrisch nachgewiesenen tryptischen Peptide konnten vollständig sequenziert werden. Bemerkenswert ist, dass Peptide aus verschiedenen Bereichen (V und C Region) der gesamten Leichtkette gefunden wurden. Bis auf die kleinen Fragmente SGK, APK, R (Tabelle VI-16, Nr. 3,4,8) und das 42-Aminosäurefragment FDG...GTR (Nr. 6) konnten alle erwarteten tryptischen Spaltpeptide der variablen Region nachgewiesen werden.

11.2 Asp-N Spaltung im Gel

Um die noch fehlenden Teilstücke der variablen Region und überlappende Sequenzen zu erhalten, wurde ein Asp-N Spaltung durchgeführt (Methodenteil). Asp-N spaltet N-terminal von D und gelegentlich auch E, also an anderen Stellen als Trypsin. Hier sind folgende Spaltstücke der Kappa-Kette zu erwarten (letztendliche Sequenz (11.4) zugrundelegt):

Spaltstück NR	Sequenz	monoisotopi- sche Masse (M + H) ⁺	AS-Pos.
1	AIQLTPQSPSSLSAFVG	1605.7	1-16
2	DGVTITCRASQAISNFAWYLGKSGKAPKVLIIY	3614.9 + 57	17-49
3	DVSTLQSGVPPRF	1402.7	50-62
4	DGSGSGT	580.2	63-69
5	DFTLTISNLQPEEFATYYCQQLNSFPITFGQGTRLEIRRRTVAAP SVFIFPPS	5910.9 + 57	70-121
5a	DFTLTISNLQPE	1248.7	70-81
5b	E	148,06 (-18)	82
5c	EFATYYCQQLNSFPITFGQGTRL	2685.3 + 57	82-104
5d	DFATYYCQQLNSFPITFGQGTRL (alternativ gefundene Sequenz)	2671.3 + 57	82-104
5e	EIRRRTVAAPSVFIFPPS	1887.1	105-121
6	DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR	3322.7 + 57	122-150
6a	D	134.1	122
6b	EQLKSGTASVVCLLNNFYPR	2240.2 + 57	123-142
6c	EAKVQWKV	987.6	143-150
7	DNALQSGNSQESVTEQ	1706.8	151-166
7a	DNALQSGNSQ	1033.5	151-160
7b	ESVT	435.2	161-164
7c	EQ	276.12	165-166
8	DSK	349.2	167-169
9	DSTYLSSTLTLSKA	1573.8	170-184
10	DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	3412.6 + 2 x 57	185-214
10a	DY	297.1	185-186
10b	EKHKVYAC	978.5 + 57	187-194
10c	EVTHQGLSSPVTKSFNRG	1946.0	195-212
10e	EC	252.1 + 57	213-214

Tabelle VI-18: Nach Asp-N-Verdau erwartete Spaltstücke von AL κ (UNK). Angabe der Massen in Dalton sowie der zugehörigen AS-Positionen 1-214 im Molekül. Anmerkung: Eine Massenzunahme + 57 kommt durch die Carboxyamidomethylierung von Cystein durch Reduzieren und Alkylieren mit DTT und Iodacetamid zustande.

Für die Sequenzierung wurden die Banden 1-6 wiederum aus dem Gel ausgeschnitten und dieses Mal alle Banden gemeinsam enzymatisch verdaut. Die HPLC-Auftrennung des enzymatischen Verdau („Spaltnix“) zeigt Abbildung VI-24.

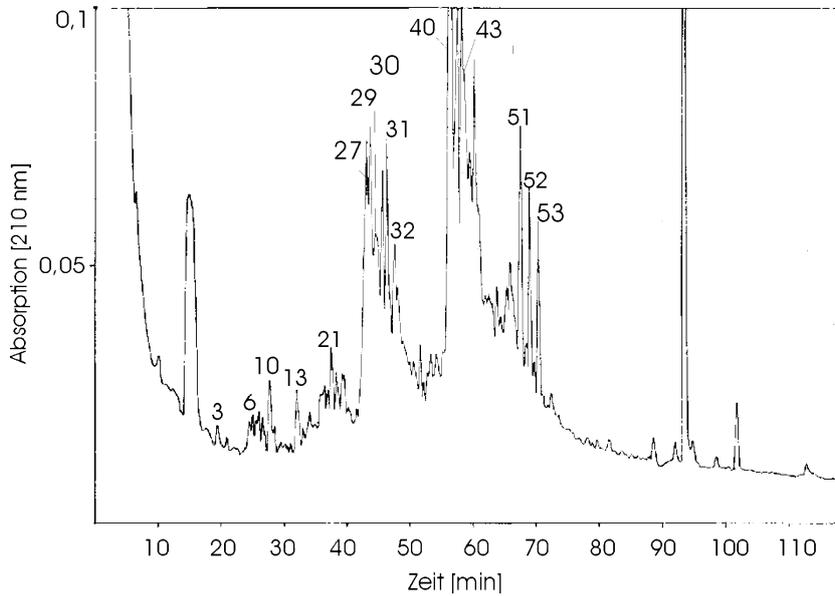


Abbildung VI-24: HPLC-Auftrennung des Asp-N-Verdaus

Ausgewählte Peaks wurden sequenziert und einzeln massenspektrometrisch untersucht. Die dabei erhaltenen Sequenzen und Massen zeigt Tabelle VI-19:

HPLC-Fraktion	Sequenz im Edman-Abbau	gefundene Masse (M + H) ⁺	erwartete Masse (M + H) ⁺	der (gefundenen) Masse entsprechende Sequenz	AS-Pos.
D 3	EIR		417.3	EIR	105-107
D 6	SNLQP		558.6	SNLQP	76-80
D 10	DVSTLQ QGTRL		662.3 574.3	 QGTRL	50-55 100-104
D 13	DVST				50-53
D 21	DGVTITCR				17-24
D 27	DVSTLQSGVPPRF	1518.8 1661.9 1718.9 1805.9 1862.9 1964.0	1517.8 1661.8 1718.8 1805.9 1862.9 1963.9	DVSTLQSGVPPRFD DVSTLQSGVPPRFDGS DVSTLQSGVPPRFDGS DVSTLQSGVPPRFDGS DVSTLQSGVPPRFDGS DVSTLQSGVPPRFDGS	50-63 50-65 50-66 50-67 50-68 50-69
D 29	DVSTLQSGVPPRF				50-62
D 30	VLIY DVSTLQSGVPPRF (S)GKAPKVLIIY				46-49 50-62 40-49

D 31	DFATYY (DVSTLQS..)	1401.7 1517.7 1574.7 1718.7 1963.8	1402.7 1517.8 1574.8 1718.8 1963.9	DVSTLQSGVPPRF DVSTLQSGVPPRFD DVSTLQSGVPPRFDG DVSTLQSGVPPRFDGSG DVSTLQSGVPPRFDGSGSGT	82-87 50-62 50-63 50-64 50-66 50-69
D 32	DVSTLQSGVPPRF	1402.9 1517.9 1662.0 1719.9 1806.1 1863.2 1964.2 1946.2	1402.7 1517.8 1661.8 1718.8 1805.9 1863.9 1963.9 1946.0	DVSTLQSGVPPRF DVSTLQSGVPPRFD DVSTLQSGVPPRFDGSG DVSTLQSGVPPRFDGSG DVSTLQSGVPPRFDGSGSG DVSTLQSGVPPRFDGSGSGT EVTHQGLSSPVTKSFNRG	50-62 50-63 50-65 50-66 50-67 50-68 50-69 195-212
D 40	AIQLTQSPSSLSAFVG DFTLTISNLQPE EIRRTVAAPSVFIFP	1605.7 1377.6 2258.9	1605.9 1377.7 2259.2	AIQLTQSPSSLSAFVG DFTLTISNLQPEE EIRRTVAAPSVFIFPPSDEQ	1-16 70-83 105-124
D 43	DFTLTISNLQ DEQLKSGTASV EIRRTVAAPSV AIQLTQSPSSL	1886.8	1887.1	EIRRTVAAPSVFIFPPS	70-79 122-132 105-121 1-11
D 51	DFATYYCQQLNSFPITF GQGTRL EIRRTVAAPSVFIFPP AIQLTQ	2741.2 1886.9	2670.3 + 57 1887.1	(!)EFATYYCQQLNSFPITFGQ~ GTRL EIRRTVAAPSVFIFPPS	82-104 105-121 1-6
D 51w	DFA..				82-84
D 52	EFATYYCQQLNSFPITF GQGTRL	2728.4	2686 + 57	(!)DFATYYCQQLNSFPITFGQ~ GTRL	82-104
D 53		2670	2670.3	DFATYYCQQLNSFPITFGQ~ GTRL ohne Mod. des Cystein	82-104

Tabelle VI-19: Sequenzen ausgewählter Peptide aus dem Asp-N-Verdau, Angabe der Aminosäureposition in der Gesamtsequenz.

Anmerkung: Deamidierung von Q/N -->E/D verändert die Masse + 1. Natrium verändert die Masse + 22. Oxidationsstufe = + 38, Oxidationsstufe und Natrium = + 60. Beispiel: DFTLTISNLQPE: normal 1377, mit Natrium 1399, oxidiert 1415, oxidiert und Natrium: 1437 (letzteres wurde massenspektrographisch in D 40 gefunden). Doppelpeaks mit Massenunterschied von 1 zeigten sich in D 27, 31, 32. 51W: Wiederholung der Sequenzierung von Peak D 51: Es bestätigt sich die Sequenz DFA.

Auffällig war dabei das Vorkommen von einer Variante EFATYY (D 52) neben DFATYY (D51), wobei die für den HPLC-Peak D 51 (Sequenz im Edman-Abbau: DFATYY..) ermittelte Masse mit der Sequenz „EFATYY“ und die für den HPLC-Peak D 52 (Sequenz im Edman-Abbau EFATYY..) ermittelte Masse mit der Sequenz „DFATYY“ vereinbar war. Auch eine nochmalige Ansequenzierung für D51 ergab wieder DFA. Dieser Unterschied wurde wiederholt gefunden, so dass das Vorkommen beider Varianten angenommen werden muss. Für die gestaggerten Sequenzen fällt auf, dass die massenspektrometrisch ermittelten Massen meist mit den erwarteten übereinstimmen, manchmal aber ein Unterschied von 1 besteht. Bei genauer Betrachtung der Massenspektrogramme zeigt sich dabei jeweils ein

Doppelpeak, der die erwartete Masse und die erwartete Masse + 1 enthält. Dies könnte auf eine teilweise Deamidierung von Q(Gln) zu E(Glu) zurückzuführen sein. Aber auch die initiale Behandlung mit Iodacetat vor Säulenauftrag (C + 58) und nachfolgend mit Iodacetamid bei der Spaltung im Gel (C + 57) könnte bei C-haltigen Fragmenten einen Massenunterschied von 1 verursachen. Auffällig war weiterhin, dass die Fortsetzung des Peptides DVSTLQSGVPPRF nicht sequenziert werden konnte, sondern lediglich in der Masse gestagert auftauchte (Abbildung VI-25):

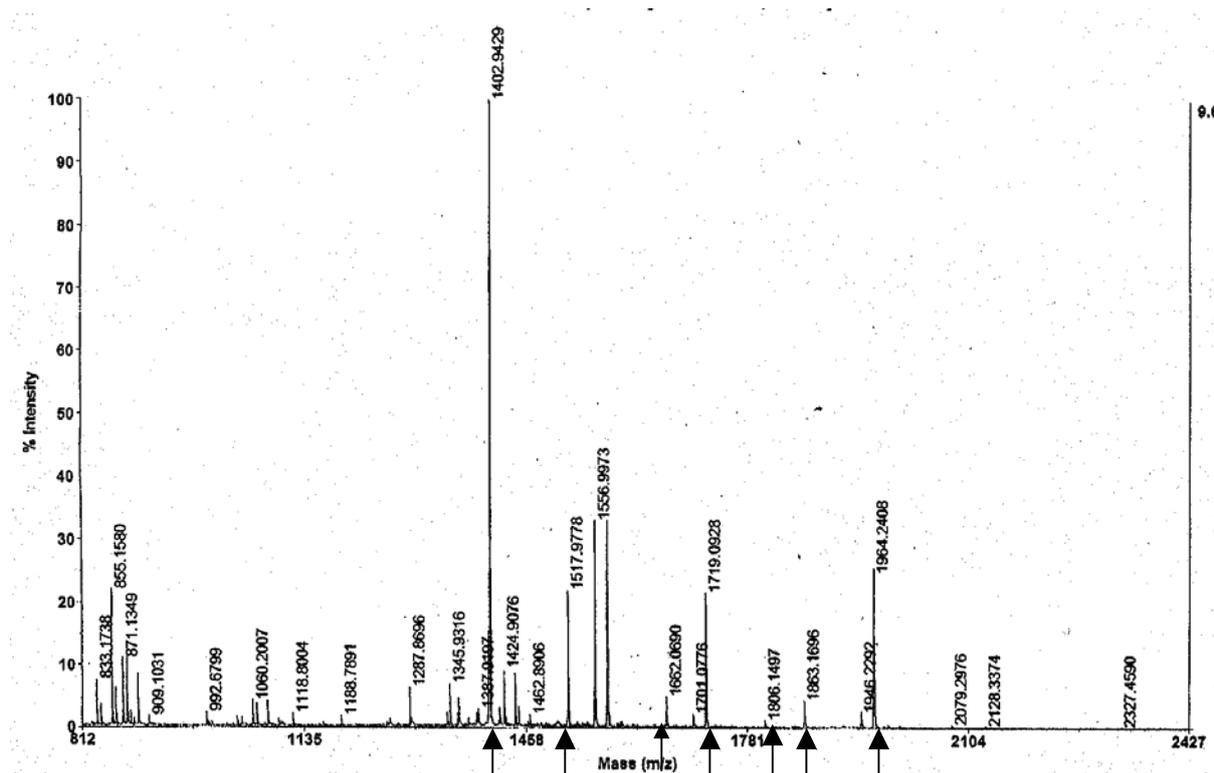


Abbildung VI-25: Massenspektrometrische Untersuchung des Peaks D 32 aus der Asp-N Spaltung. Es findet sich hauptsächlich das Fragment DVSTLQSGVPPRF (vgl. Tabelle VI-19), mit der gestagerten Fortsetzung (Pfeile) bis DVSTLQSGVPPRFDGSGSGT.

11.3 Chymotrypsische Spaltung der Säulenfraktion C 713/714 IV

Da nach dem Zusammenfügen der über die Trypsin- und Asp-N-Spaltung ermittelten Peptide immer noch Unklarheit über die Identität der Aminosäure an Position 40 der variablen Region herrschte, wurde noch eine Chymotrypsinspaltung angeschlossen. Dazu wurde die Säulenfraktion C 713 / 714 IV nicht mehr gelelektrophoretisch aufgetrennt, sondern das lyophilisierte, mit Iodacetat reduzierte und mit DTT alkylierte Protein direkt verdaut (Methodenteil). Dieses Vorgehen war durch die nachgewiesenermaßen hohe Reinheit von C 713 / 714 IV gerechtfertigt. Nach 4,5 h Verdau wurde das Peptidgemisch auf der HPLC-Säule

aufgetrennt, die Peaks gesammelt, massenspektrometrisch untersucht und sequenziert. Die HPLC-Auftrennung zeigt Abbildung VI-26:

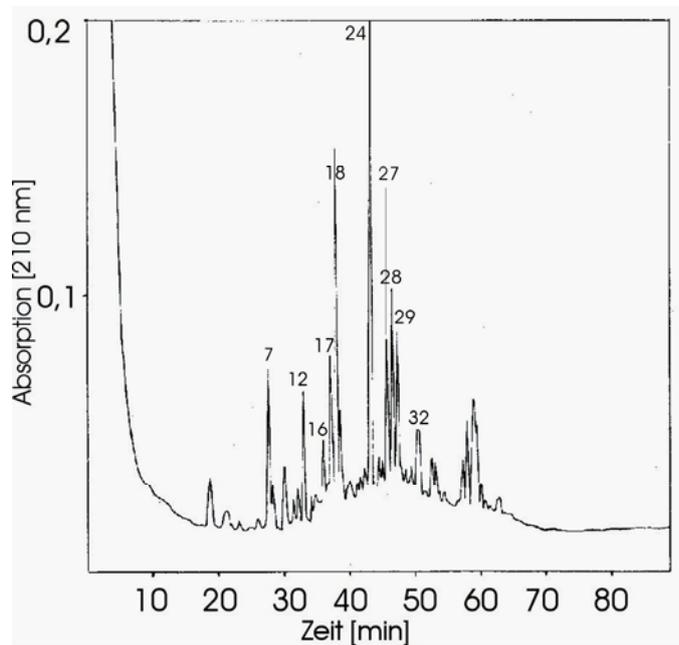


Abbildung VI-26: HPLC-Auftrennung des Spaltmixes nach Chymotrypsinspaltung

Die HPLC-Peaks der chymotryptischen Spaltung (Chymotrypsin spaltet nach hydrophoben Aminosäuren wie F, Y, W, (L)) wurden sequenziert und massenspektrometrisch untersucht:

HPLC-Fraktion	Sequenz im Edman-Abbau	gefundene Masse (M + H) ⁺	erwartete Masse (M + H) ⁺	der Masse entsprechende Sequenz	AS-Pos.
CT 7	GQGTRL EKHKVY				99-104 187-192
CT 12	TLS SKA ATY	1367.7	1367.7	SKADYEEKHKVY	180-182 182-192 84-86
CT 16	IFPP				117-120
CT 17		1581.8	1581.8	TLSKADYEEKHKVY	180-192
CT 18	QLKSGKAPKV VDNALQSGNS KVDNALQSGN	2601.9 2730.0	2602.1 2730.2	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS T Y	37-46 150-173 149-173
CT 24	AWY TCRASQAISN ACEVTH GQGTRLE(I)	1342.7	1284.6 + 58	TRCASQAISNF	34-36 22-33 193-198 99-106
CT 27	AIQLTQS	1144.7	1144.6	AIQLTQSPSSL	1-7
CT 28	IYD	1710.9	1710.8	QSGVPPREFDGSSTDF	48-50 55-71
CT 29	EIRRTVAAPSV IFPPSD	1345.8	1345.8	EIRRTVAAPSVF	105-116 117-122
CT 32	(S)AFVGD NNFY				12-17 137-140

Tabelle VI-20: Zusammenschau von Ergebnissen aus Proteinsequenzierung und Massenspektrometrie der chymotryptischen Spaltung. Anmerkung: Eine Massenzunahme + 58 kommt durch die Carboxymethylierung von Cystein (C) durch Reduzieren und Alkylieren mit DTT und Iodacetat zustande.

Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass alle Peptidbruchstücke, selbst die als Nebensequenz vorhandenen, ausschließlich der leichten Kette zuzuordnen waren, d.h. keine im Edman-Abbau nachweisbare Kontamination mit anderen Gewebeproteinen vorlag. Das ist vereinbar mit einem Gehalt an kontaminierenden Proteinen von sicher unter 10% in allen untersuchten Fraktionen.

11.4 Vollständige Sequenz

Durch Zusammenfügen der einzelnen Sequenzbruchstücke ergibt sich folgende Sequenz für ALκ (UNK) :

```

<-----FR1 (1-23)-----><--CDR 1--><-FR2 (35-49)-><CDR 2>
1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
AIQLTQSPSSLSAFVGDGVTITCRASQAISSNFAWYQLKSGKAPKVLIIYDVSTLQS
<-----T12-----><-----T11----->      <-----T10----->
<-----CT24-->      <--CT18-->      <--D32-->

<-----FR3 (57-88)-----><--CDR 3><--FR4-->
60      70      80      90      100
|      |      |      |      |
GVPFRFDGSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYQQLNSFPITFGQGTRLEIRR
----->      E      <T5>
<-----D40-----><-----D51/52-----><----->

110      120      130      140      150      160      170
|      |      |      |      |      |      |
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKYDNALQSGNSQESVTEQDSKD
<-----T12----->      <T5><-----T4-----><----->
--D43/51--><-----D43-->      CT32      <-----CT18----->
<-----04/02----->

180      190      200      210
|      |      |      |
STYSLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
-----T9-----><T2->      <-----T7----->

-->      C12      <-CT7>      (<-----D32----->)
<-----CT12----->
    
```

Legende:

- <----->: nur über die Masse nachgewiesenes Peptid
- <----->: sequenziert, ohne dass die Masse gefunden wurde
- <----->: sequenziert und durch die Masse bestätigt
- <----->: gestagert in der Masse nachgewiesen
- <--04/02->: Peptid aus der Trypsinspaltung 04/02 (VI.8.)

SKADYEK: fett = sequenzierte Teile der Kette

A (unterstrichen): Sequenzbeginn eines natürlicherweise vorkommenden Peptidfragments (ohne vorherige enzymatische Spaltung, vgl. VI.11.5)

AS 1-108: variable Region (N-terminal gelegen)

AS 109-214: konstante Region (C-terminal gelegen)

✦: mögliche Glykosylierungsstelle

Abbildung VI-27: Vollständige Aminosäuresequenz von ALκ (UNK) ermittelt durch Zusammenfügen überlappender Peptidsequenzen, gestützt durch massenspektroskopische Untersuchungen

Durch Vergleich mit bereits bekannten κ -Ketten-Sequenzen (vgl. Abbildung. I-8, VII-1) kann AL κ (UNK) nun eindeutig der κ -Subklasse 1 zugeordnet werden.

11.5 Charakterisierung von κ -Ketten-Fragmenten in AL κ (UNK)

Um herauszufinden, wieso nach gewissen enzymatischen Spaltungen auch untypische Peptidfragmente im Edman-Abbau gefunden wurden, die eigentlich nicht aus der experimentellen enzymatischen Spaltung herrühren können, sondern möglicherweise in vivo entstanden sein könnten, wurde die Fraktion C 713 / 714 IV ohne vorherige Spaltung über HPLC aufgetrennt, die Peaks gesammelt und N-terminal ansequenziert. Ziel war es, bereits im Ausgangsmaterial vorliegende κ -Bruchstücke zu ermitteln und insbesondere zu erfahren, mit welcher Aminosäure sie beginnen. Die HPLC-Auftrennung (linearer Gradient 80% / 60 min, Auftrag C 713/714 IV gelöst in a. dest. 20 μ l + 50 μ l 70 % Ameisensäure) zeigt Abbildung VI-28.

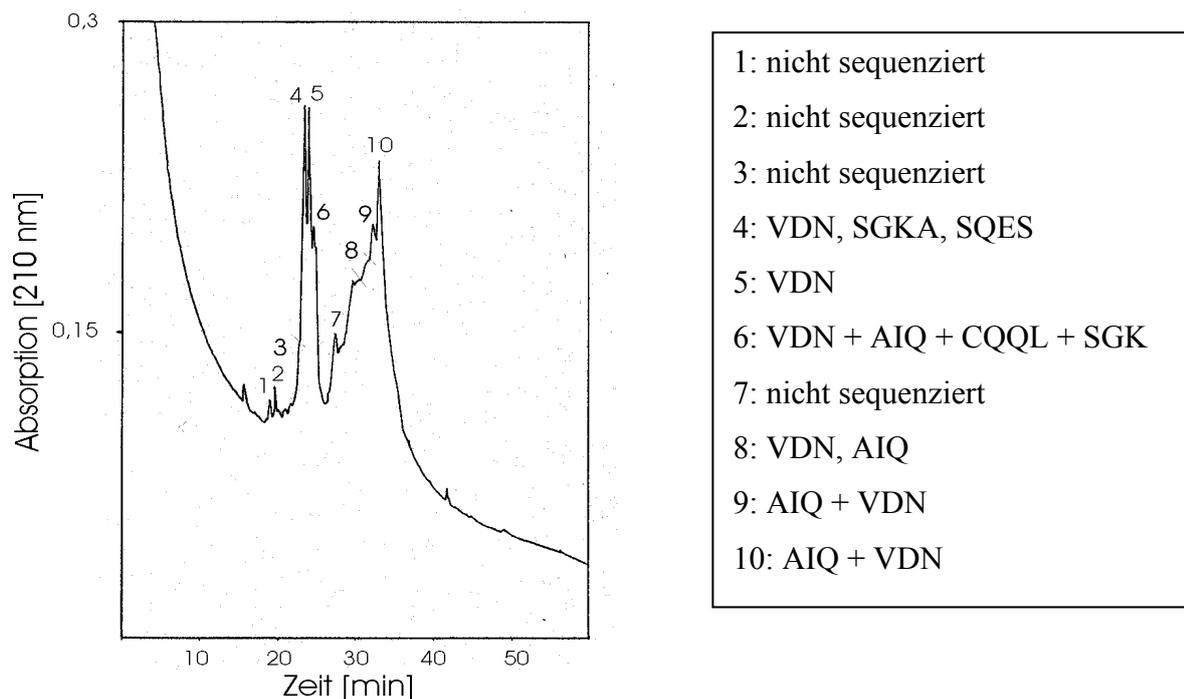
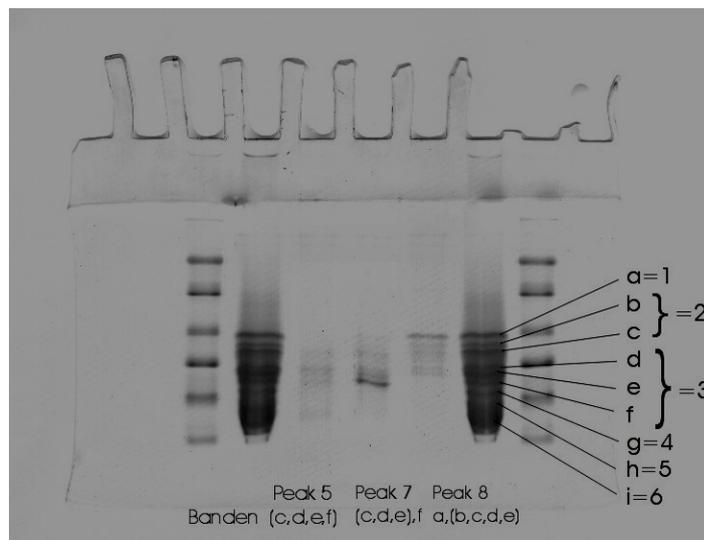
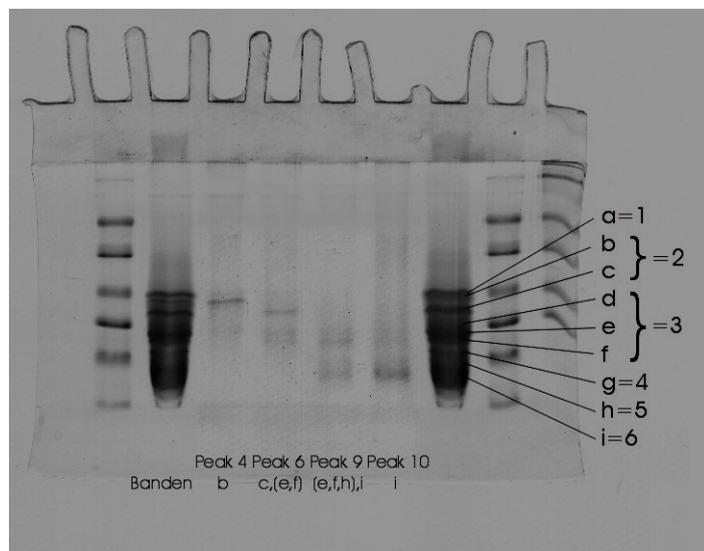


Abbildung VI-28: HPLC der Säulenfraktion C 713/714 IV ohne enzymatischen Verdau und N-terminale Sequenzierung ausgewählter Peaks zur Identifizierung irregulär beginnender, unabhängig vom enzymatischen Verdau vorliegender Fragmente der κ -Kette.

Die ermittelten Sequenzen entsprechen Fragmenten mit N-Terminus bei AS-Position 1(AIQ), 40(SGK), 88(CQQL), 150(VDN) und 159 (SQES).

Um ferner diese HPLC-Peaks den 6 in der SDS-PAGE identifizierten Gelbanden zuordnen und damit auf die ungefähre Länge der Fragmente schließen zu können, wurden die

sequenzierten Peaks 4, 6, 9, 10 sowie die Peaks 5, 7, 8 mit der Speed-Vac (Bachofer, Reutlingen) eingengt und zusammen mit der kompletten Säulenfraktion C 713/714 IV auf 15%-ige Polyacrylamidgele aufgetragen:



Zuordnung der HPLC-Peaks zu den Gelbanden und Sequenzen:

HPLC-Peak	Sequenz	Gelbande
4	VDN SGKA SQES	2
5	VDN	(2,3)
6	VDN AIQ CQQL SGK	2,(3)
7	nicht sequenziert	(2),3
8	VDN AIQ	1,(2,3)
9	AIQ VDN	(3-5),6
10	AIQ VDN	6

Abbildung VI-29: Zuordnung der HPLC-Peaks zu Gelbanden (15%-ige SDS-PAGE). In diesem Gellauf erscheint die Säulenfraktion C 713 / 714 IV in 9 Banden (a-i) aufgetrennt, die sich jedoch im Vergleich mit dem in Abbildung VI-20 gezeigten Gellauf problemlos wieder den dort markierten 6 Hauptbanden zuordnen lassen.

Die einzelnen Fragmente weisen damit folgende über das jeweilige Molekulargewicht abgeschätzte Längen auf (wenn für eine AS ein MW von ca. 115 D angenommen wird):

Bande	Fragment	AS-Position	MW	Länge	Fragmentumfang
1	VDN AIQ	150 1	18 kD	ca. 155 AS	AS 150 - 304 (nicht möglich ¹) AS 1-155
2	VDN SGKA SQES AIQ CQQL	150 40 159 1 88	15 kD	ca. 130 AS	AS 150 - 279 (nicht möglich ¹) AS 40-169 AS 159-288 (nicht möglich ¹) AS 1-130 AS 88-217 (nicht möglich ¹)
3	(VDN) (AIQ) (CQQL) (SGK)	150 1 88 40	13.5 kD	ca. 120 AS	AS 150-269 (nicht möglich ¹) AS 1-120 AS 88-207 AS 40-159
4	(AIQ) (VDN)	1 150	9 kD	ca. 80 AS	AS 1-80 AS 150-229 (nicht möglich ¹)
5	(AIQ) (VDN)	1 150	7 kD	ca. 60 AS	AS 1-60 AS 150-209
6	AIQ VDN	1 150	5 kD	ca. 45 AS	AS 1-45 AS 150-194

Tabelle VI-21: Abschätzung der Fragmentlängen der in Fraktion C 713 / 714 vorliegenden in vivo generierten Bruchstücke der κ -Kette. Mit „¹“ bezeichnete Fragmentumfänge sind nicht möglich, da die ganze κ -Kette nur 214 AS umfasst (vgl. Abbildung VI-27).

Wenngleich nicht alle ermittelten Fragmente heute schon erklärt werden können, fällt dennoch auf, dass Fragmente mit gleicher Anfangs-Aminosäure in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen (AS 1, 40, 88, 150, 159) vorliegen, insbesondere mehrere mit AS 1 beginnende Fragmente unterschiedlicher Länge. Auffallend ist weiter, dass VDN vielen Banden zugeordnet werden kann, jedoch eigentlich oberhalb dem Molekulargewichtsbereich von Bande 5 nicht vorkommen kann. Da natürlich, wie im Gel zu sehen, die HPLC-Peaks jeweils aus mehreren Gelbandenbereichen zusammengesetzt sind, gleichwohl mit der Dominanz einer Bande, kann man entweder annehmen, dass VDN ein Polymerisat aus Peptiden mit niedrigerem Molekulargewicht repräsentiert, oder eine das MW erhöhende Modifikationen der C-Region C-terminal von VDN vorliegt. Letzteres erscheint aber wegen vorausgegangenem Reduzieren und Alkylieren eher unwahrscheinlich.

VII. Diskussion

Die Amyloidogenese ist bis heute auf molekularer Ebene noch nicht im Detail verstanden.

AL-Amyloidosen nehmen dabei insofern eine Sonderstellung ein (BELLOTTI et al. 2000), als die thesaurierten Leichtketten(fragmente) die größte interindividuelle Sequenzvariabilität aller Amyloidose-assoziierten Proteine aufweisen. Ebenso variabel sind, vielleicht genau aus diesem Grunde, die klinischen Erscheinungsbilder der AL-Amyloidose.

Bei allen Patienten liegt jedoch die manchmal massenhafte, monoklonale Überproduktion von Immunglobulin(teilen) mit lokaler (Amyloidome), organlimitierter oder systemischer Konzentration als Voraussetzung der Amyloidogenese zugrunde. Andererseits entwickeln nur 10-15% aller Patienten mit monoklonaler Gammopathie (vgl. Einleitung) eine Amyloidose.

Die strukturelle und klinische Heterogenität der AL-Amyloidosen erschwert es erheblich, einen schlüssigen Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz einer Immunglobulin-Leichtkette, ihrer Amyloidogenität und dem bevorzugten Ort der Thesaurierung (Organotropismus) abzuleiten (WANG et al. 2001, SAMDAL et al. 2001). Im Gegensatz dazu korrelieren vor allem bei hereditären Amyloidosen wie ATTR, die von einem einzigen Gen kodiert werden, eine ganze Reihe von bekannten Aminosäureaustauschen (z.B. Val30Met) eindeutig mit Amyloidogenität (HAMILTON et al. 1992) und beeinflussen nicht selten sogar die Art der klinischen Manifestation, das Erkrankungsalter und die Prognose (IKEDA et al. 2002). Aber auch bei erblichen Amyloidosen spielen weitere, bis heute noch nicht vollständig verstandenen Faktoren eine Rolle in der klinischen Krankheitsausprägung.

Trotz der genannten Schwierigkeiten ist man bestrebt, auch bei AL-Amyloidosen aus der Primärstruktur des thesaurierten Proteins Rückschlüsse auf die Amyloidogenität ziehen zu können bzw. durch Vergleich von amyloidogenen mit nicht amyloidogenen Leichtketten Aminosäuresequenzen aufzudecken, die Amyloidogenität erzeugen oder durch Destabilisierung der Tertiärstruktur dazu prädisponieren (LIEPNIEKS et al. 1990).

Je mehr Sequenzen zum Vergleich vorliegen, desto deutlicher können sich vor dem Auge des Untersuchers die entscheidenden Mutationen auf dem Weg zur Fibrillogenese herauskristallisieren, wie von HURLE et al. 1994 gezeigt. Insofern trägt jede zusätzliche vollständige Aminosäuresequenz zusammen mit dem klinischen Bild des an AL-Amyloidose erkrankten Patienten dazu bei, das große „Puzzle“ aus den Variablen Aminosäuresequenz, Proteinkonzentration, Fragmentnatur und Milieufaktoren zu vervollständigen, um die Pathogenese der AL-Amyloidosen im Besonderen wie auch die wesentlichen Prinzipien der Amyloid-Entstehung im Allgemeinen besser zu begreifen.

1. Aminosäuresequenz des untersuchten Amyloids AL κ_1 (UNK)

Durch Aminosäuresequenzierung der Amyloidproteine von UNK konnte die Primärstruktur von AL κ (UNK) vollständig aufgeklärt werden. Dabei gelang es, alle Aminosäuren der variablen Region (AS 1-108) sowie den N-terminalen Teil (AS 109-132) der konstanten Region sicher zu identifizieren. Außerdem konnten auch weiter C-terminal gelegene Bruchstücke der konstanten Region bis zur Aminosäure 202 (von 214 AS) in der Sequenzierung detektiert und massenspektrometrisch bis AS 207 (Trypsin-Spaltung) bzw. fraglich bis AS 212 (Asp-N-Spaltung) nachgewiesen werden.

Dabei hat sich gezeigt, dass das Amyloid AL κ (UNK) nicht aus einem einzigen Fragment, sondern aus einer ganzen Reihe von verschieden langen N-terminalen Fragmenten des κ -Bence-Jones-Protein UNK besteht, wozu sich noch einzelne hydrophobe Fragmente aus der C-Region addieren (vgl. Tabelle VI-21).

1.1 Sequenz im Vergleich mit anderen κ -Leichtketten

1.1.1 C-Region

Im sequenzierten Bereich lagen die in der Literatur als einzige variable Aminosäuren der C-Region beschriebenen an Position 153 (hier A) und 191 (hier V), so dass AL κ (UNK) den Inv b⁺ - Marker (HILSCHMANN und CRAIG 1965) trägt und dem Km³-Allotyp (STEINBERG et al. 1974) zuzuordnen ist. Die Anwesenheit von C-Regionen von Leichtketten in Amyloid wurde zum ersten Mal von EULITZ und LINKE 1985 beschrieben.

SOLOMON et al. (1998) und WALLY et al. (1999) haben außerdem von einem Austausch 177(S \rightarrow N) in der C-Region amyloidogener κ -Ketten berichtet, wobei interessanterweise, wenn eine solche Mutation vorlag, Fragmente der C-Region dann zu einem überproportional hohen Anteil in den Amyloiddeposits zu finden waren. SOLOMON schlägt hierfür in Anlehnung an STEINBERG et al. die Bezeichnung „Km⁴-Allotyp“ vor.

Bei AL κ (UNK) ergab sich massenspektrometrisch kein Hinweis auf eine Mutation an der Position 177. Für den übrigen Teil der konstanten Region wurden in der Literatur keine AS-Austausche beschrieben, auch wir fanden hier keine neuen Mutationen, was - abgesehen von der Biklonalität an Pos. 82 D/E - die Monoklonalität des hier thesaurierten Proteins zusätzlich unterstreicht.

1.1.2 V-Region

Nachfolgend aufgeführt sind die Sequenzen der variablen Regionen (AS 1-108) von 65 in vivo amyloidenen sowie nicht amyloidenen κ-Ketten der Subgruppen κ1 - κ4. ALκ (UNK) wird mit diesen Sequenzen verglichen. Der oberste Block beinhaltet - ALκ (UNK) mitgerechnet - 18 Sequenzen von in vivo amyloidenen κ1-Ketten. Die vier Blöcke darunter zeigen Sequenzen von 22 κ1-Ketten, 6 κ2-Ketten, 13 κ3-Ketten und 6 κ4-Ketten, die mit Ausnahme von KV2D und KV4D, nicht amyloidogen sind. In der obersten und letzten Zeile ist die nicht-amyloide κ1-Sequenz „sp|P01593|KV1A“ als Bezugssequenz angegeben.

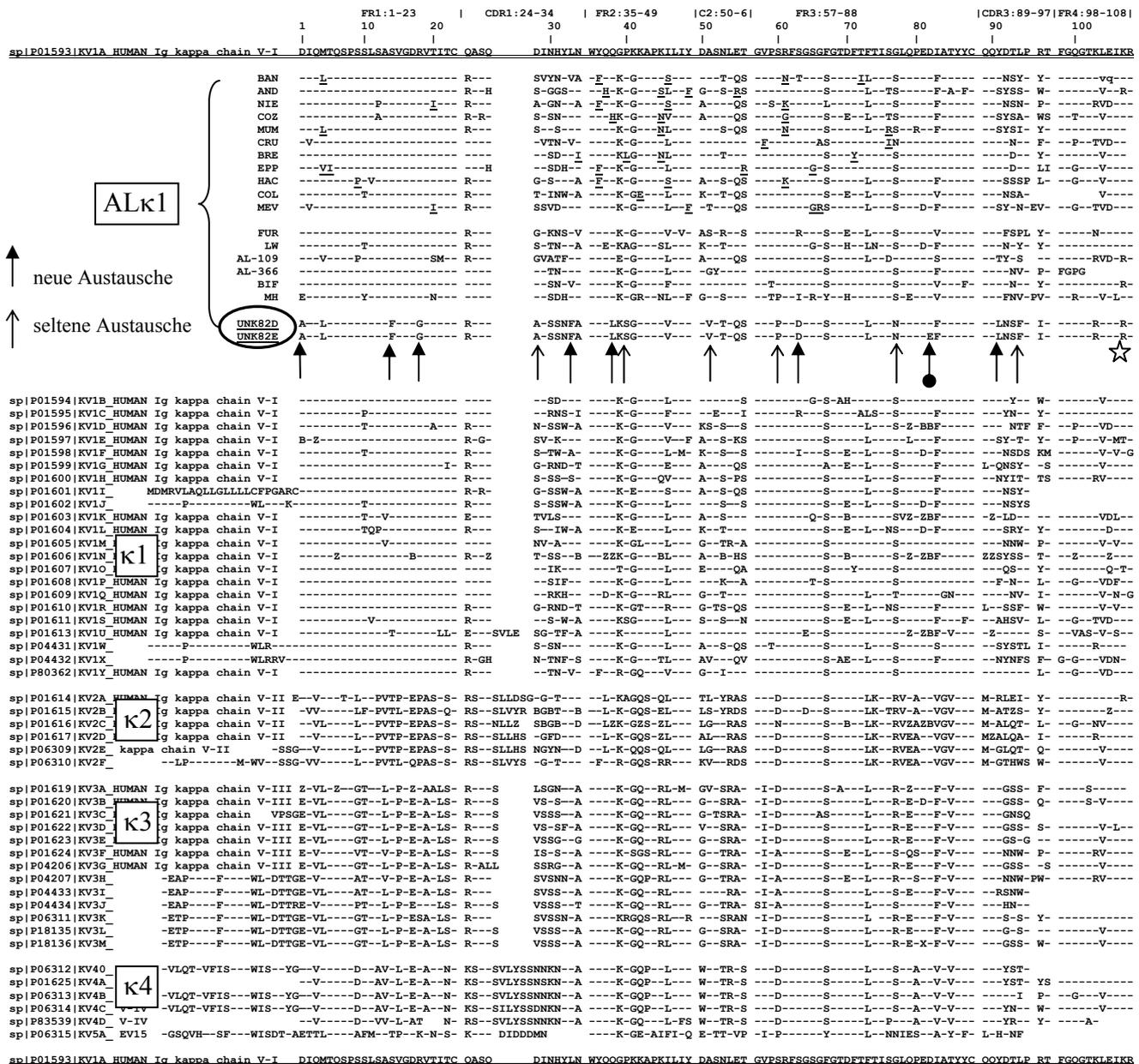


Abbildung VII-1: Vergleich der AS-Sequenz von ALκ (UNK) (fett umkreist) mit Sequenzen von weiteren in vivo gefundenen (monoklonalen) κ-Ketten.

Legende: Ganz oben / unten (doppelt unterstrichen) ist die Sequenz der nicht-amyloidogenen κ 1-Kette „sp|P01593|KV1A“ angegeben. Sie stammt aus der Proteindatenbank Swissprot (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de> („immunoglobulin kappa chain human“)) und dient als Referenz für alle nachfolgend aufgeführten Sequenzen. Striche bedeuten Identität mit der Referenzsequenz, AS-Austausche sind durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die Nummerierung der AS-Positionen erfolgt nach KABAT et al. (1991). Direkt unterhalb der Referenzsequenz folgt ein Block von Sequenzen von in vivo amyloidogenen, menschlichen κ 1-Leichtketten einschließlich AL κ (UNK) (geschweifte Klammer). Die mit BAN, AND, NIE, COZ, MUM, CRU, BRE, EPP, HAC, COL und MEV bezeichneten Sequenzen sind bei SCHORMANN et al. (1995) aufgeführt, wobei die nach LIEPNIKS et al. (1990) mutmaßlich mit der Amyloid-Fibrillenbildung assoziierten Aminosäureaustausche unterstrichen wurden. Dabei entspricht MEV dem Protein KV1T und BAN dem Protein KV1V aus der Swissprot-Datenbank (zur Vermeidung von Redundanz in den Blöcken darunter weggelassen). Es schließen sich die Sequenzen von sechs weiteren, seither in der Literatur neu beschriebenen amyloidogenen κ 1-Leichtketten FUR (ODANI et al. 1998), LW (RAMSTAD et al. 1995), AL-109 (WANG et al. 2001), AL-366 (SAMDAL et al. 2001), AL BIF (SOLOMON et al. 1998) und AL MN (FOSS et al. 1998) an. Die Sequenz von AL κ (UNK) ist zum Vergleich ebenfalls angegeben (fett umkreist). Pfeile markieren Aminosäureaustausche, die in den übrigen aufgelisteten Sequenzen bisher nicht (\uparrow) oder nur 1-2x (\uparrow) beschrieben sind. (\uparrow) bezeichnet die in einem Teil der Sequenzen von AL κ (UNK) vorhandene (neue) Mutation an Position 82, wo sowohl D („UNK 82D“) als auch E („UNK 82E“) gefunden wurde.

Wiederum darunter schließen sich vier Blöcke (geordnet nach κ 1, κ 2, κ 3 und κ 4) aller in der Proteindatenbank Swissprot (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de> („immunoglobulin kappa chain human“)) zugänglichen Sequenzen von auf Aminosäure- oder Nukleinsäureebene sequenzierten, in vivo gefundenen menschlichen Kappa-Ketten an. Sie sind, mit Ausnahme von KV2D (TEW) und KV4D (STH), nicht amyloidogen und zu ihrer Identifikation mit dem Code „sp|Pxxxxx|KVxx“ gekennzeichnet (KV1x = κ 1-Kette, KV2x = κ 2-Kette u.s.w.).

AL κ (UNK) lässt sich nun eindeutig der Subklasse κ 1 zuordnen, da die für κ 2 - κ 4 charakteristischen Insertionen nach der 27. AS fehlen und die für κ 1 typische Sequenz der FR1-Region vorliegt.

Verglichen mit den oben angeführten Sequenzen aller κ -Subgruppen besitzt AL κ (UNK) sechs bzw. (wenn man die Variante AS 82 \rightarrow E mitberücksichtigt) sieben bisher nicht beschriebene, neue Aminosäureaustausche: 1 (D \rightarrow A), 14 (S \rightarrow F), 18 (R \rightarrow G), 33 (L \rightarrow F), 38 (Q \rightarrow L), 63 (S \rightarrow D), (82 (D \rightarrow E)) und 91 (Y \rightarrow L) .

Zusätzlich liegen sechs weitere seltene Aminosäureaustausche vor, die in o.a. Proteinsequenzen erst 1-2 mal beschrieben wurden: 28 (S \rightarrow A), 40 (P \rightarrow S), 51 (A \rightarrow V), 60 (S \rightarrow P), 77 (S \rightarrow N) und 94 (L \rightarrow F).

Insgesamt ergibt sich folgende Aminosäurezusammensetzung der variablen Region von AL κ (UNK):

Ab- kürzung	voller Name	Anzahl / %	hydro phob	pos.	neg.	polar	gela- den	klein	aro mat.	ali phat.
A	Ala	Alanin	7 (6.5 %)	X				X		(X)
C	Cys	Cystein	2 (1.9 %)	(X)						
D	Asp	Asparaginsäure	5 (4.6 %)		X	X	X			
E	Glu	Glutaminsäure	2 (1.9 %)		X	X	X			
F	Phe	Phenylalanin	7 (6.5 %)	X					X	
G	Gly	Glycin	9 (8.3 %)	((X))				X		(X)
H	His	Histidin	0	((X))	X	X	X			
I	Ile	Isoleucin	7 (6.5 %)	X						X
K	Lys	Lysin	3 (2.8 %)	((X))	X	X	X			
L	Leu	Leucin	9 (8.3 %)	X						X
M	Met	Methionin	0	X						
N	Asn	Asparagin	3 (2.8 %)			X				
P	Pro	Prolin	6 (5.6 %)	X						
Q	Gln	Glutamin	9 (8.3 %)			X				
R	Arg	Arginin	5 (4.6 %)		X	X	X			
S	Ser	Serin	14 (13.0 %)			X		X		
T	Thr	Threonin	10 (9.3 %)	((X))		X				
V	Val	Valin	5 (4.6 %)	X						X
W	Trp	Tryptophan	1 (0.9 %)	X		X			X	
Y	Tyr	Tyrosin	4 (3.7 %)	((X))		X			X	

Tabelle VII-1: Aminosäurezusammensetzung der variablen Region von AL κ (UNK). X = oben angegebene Eigenschaft liegt bei der jeweiligen Aminosäure vor. (X) bedeutet: in der Literatur wird diese Eigenschaft für die entsprechende Aminosäure von den meisten Autoren angegeben, aber nicht von allen. ((X)) bedeutet: manche Autoren geben für diese Aminosäure die gegenteilige Eigenschaft an (in diesem Fall hydrophil), daher werden die betroffenen Aminosäuren als bezüglich dieser Eigenschaft als „indifferent“ gewertet.

Doch ist AL κ (UNK) auch eine besonders „amyloidogene“ Sequenz?

1.2 Kalkulation der Amyloidogenität von AL κ (UNK) aus der Aminosäuresequenz

1.2.1 Amyloid-typische Mutationen

LIEPNIEKS et al. publizierten 1990 einen Vergleich von 10 amyloidogenen κ 1-V-Regionen. Die Autoren spekulierten dabei, dass die in Abbildung VII-1 in der oberen Hälfte von Block 1 (BAN-MEV) unterstrichenen AS-Austausche Leu(L)/Val(V)4, Ile(I)5, Pro(P)9, Ile(I)20, Ile(I)34, Phe(F)36, His(H)37, His(H)38, Leu(L)40, Glu(E)42, Ser(S)/Asn(N)46, Ser(S)47, Phe(F)49, Arg(R)55, Arg(R)56, Phe(F)58, Asn(N)/Lys(K)61, Gly(G)65, Arg(R)66, Tyr(Y)71, Ile(I)72 und Arg(R)/Ile(I)76 besonders zur Amyloidbildung prädisponierend sein könnten. In Übereinstimmung damit zeigt AL κ (UNK) lediglich den Austausch M \rightarrow L an Position 4, jedoch keine weiteren der von LIEPNIEKS et al. genannten Mutationen.

STEVENS et al. (1995) kommen in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass am ehesten die Austausche Ile(I)20, Asp(D)31, Asn(N)45, Phe(F)49, Asp(D)50, Gln(Q)55, His(H)70, Asn(N)/Gly(G)93, Pro(P)/Val(V)96 sowie eine hydrophobe AS in Pos. 40 die

Fibrillenbildung begünstigen. AL κ (UNK) zeigt davon Asp(D)50 und Gln(Q)55. Nach WALLY et al. (1999) ist Asp(D)50 durch seine Fähigkeit, Salzbrücken zu Lysin-Resten auf Leichtkettenmonomeren auszubilden, wichtig für die hypothetische Proamyloid-Filament-Bildung. Auch bei den anderen publizierten amyloidogenen κ 1-Sequenzen kommt dieser Austausch gehäuft vor.

2000 hat STEVENS ein Scoring-System publiziert, womit angeblich die meisten amyloidogenen κ -Ketten aufgrund ihrer Struktur identifiziert werden. AL κ (UNK) erhält für den Verlust von P40 3 Punkte, für den Gewinn von L73 -1 Punkt, für I96 -2 Punkte, so dass ein Score von zusammengerechnet 0 AL κ (UNK) als nicht amyloidogen kennzeichnet (Durchschnitts-Score für nicht-amyloidogene κ -Ketten: 0,5 +/- 3.6 (n=84), amyloidogene 10.4 +/- 5.3 (n=37). Außerdem besitzt AL κ (UNK) keine der vier laut STEVENS bei amyloidogenen κ -Ketten am häufigsten gefundenen Risikofaktoren: Verlust von Ile 27b, Gewinn von Asp 31, Verlust von Arg 61 oder Besitz von einer N-X-S/T-Glykosylierungsstelle. Berücksichtigt man allerdings (vgl. VII 1.2.4.) die potentielle Glykosylierungsstelle DFT (70-72), erhält AL κ (UNK) einen Score von immerhin 3 Punkten. Damit zeigt AL κ (UNK) vier von 34 oben angeführten bisher in der Literatur als amyloidogen beschriebene Aminosäureaustausche: 4 (M \rightarrow L), 40(P \rightarrow S), 50 (D) und 55 (E \rightarrow Q).

Im Vergleich insbesondere mit den erst kürzlich publizierten amyloidogenen κ 1-Sequenzen AL-109 und BIF fällt außerdem der Austausch K \rightarrow R an Position 107 (☆ in Abbildung VII-1) auf, den amyloidogene κ 1-Ketten, so auch AND und AL κ (UNK), überzufällig häufig zu tragen scheinen. Möglicherweise erhöht dieser Austausch ebenfalls das Risiko, eine Amyloidose zu entwickeln. Um dies zu verifizieren wäre es jedoch wünschenswert, noch mehr Sequenzen vergleichen zu können.

Bemerkenswert ist auch, dass 28(A) nur die amyloidogenen Sequenzen NIE und UNK aufweisen, jedoch keine der übrigen aufgeführten Kappa-Ketten.

Insgesamt kann aus den erhobenen Daten jedoch geschlossen werden, dass die Amyloidogenität auch im Falle UNK derzeit nicht allein aus bis jetzt definierten Aminosäureaustauschen resultiert bzw. kalkuliert werden kann, wie LIEPNIEKS et al. und STEVENS es vorschlagen. Dagegen scheint die aus der Summe der Austausche und durch Fragmentierung letztendlich resultierende Destabilisierung der Proteintertiärstruktur vielleicht die bedeutendste Rolle auf dem Weg zur Amyloidentstehung zu spielen.

1.2.2 Austausch in hochkonservierten Regionen

Mutationen in hochkonservierten Aminosäurepositionen beeinflussen die Stabilität des Proteins. Eine Destabilisierung der Proteinstruktur begünstigt die Umfaltung des löslichen Vorläuferproteins zur unlöslichen Amyloidfibrille (HURLE et al. 1994).

FOSS ET AL. (1998) bringen insbesondere Austausche an den sonst hochkonservierten Positionen 20(T) und 60(S) mit Amyloidogenität in Verbindung. AL κ (UNK) zeigt die Mutation 60(S \rightarrow P).

1.2.3 Abnahme der Hydrophilie

Mutationen in den variablen Bereichen der V-Region können die Oberfläche der Leichkette hinsichtlich ihrer Hydrophilie verändern. Zweifellos steigt die Wahrscheinlichkeit der β -Fibrillen-Bildung mit zunehmender Hydrophobizität eines Proteins (LINKE 1981, LIEPNIEKS et al. 1990, LINKE und HUS 1992). Vor diesem Hintergrund wurden die bei AL κ (UNK) gefundenen neuen oder „seltenen“ AS-Austausche (Pfeile in Abbildung VII-1) auf ihre Auswirkungen bezüglich der Hydrophilie des Proteins untersucht. Zugrundegelegt wurde dabei die in allen nicht-amyloidogenen κ 1-Sequenzen an der jeweiligen Position am häufigsten vorkommende Aminosäure.

AS	Austausch	Änderung der Hydrophobizität	Hydrophobizität
1	D (Aspartat) \rightarrow A (Alanin)	hydrophil \rightarrow hydrophob	\uparrow
14	S (Serin) \rightarrow F (Phenylalanin)	hydrophil \rightarrow hydrophob	\uparrow
18	R (Arginin) \rightarrow G (Glycin)	hydrophil \rightarrow indifferent	\uparrow
33	L (Lysin) \rightarrow F (Phenylalanin)	indifferent \rightarrow hydrophob	\uparrow
38	Q (Glutamin) \rightarrow L (Lysin)	hydrophil \rightarrow indifferent	\uparrow
63	S (Serin) \rightarrow D (Aspartat)	hydrophil \rightarrow hydrophil	\leftrightarrow
(82)	D (Aspartat) \rightarrow E (Glutamat)	hydrophil \rightarrow hydrophil	\leftrightarrow
91	Y (Tyrosin) \rightarrow L (Leucin)	indifferent \rightarrow hydrophob	\uparrow

Tabelle VII-2: Veränderung der Hydrophilie durch in AL κ (UNK) neu gefundene AS-Austausche. Zugrundegelegt wurde jeweils die in κ 1 am häufigsten vorkommende AS. \uparrow : Zunahme der Hydrophobizität durch den AS-Austausch. \leftrightarrow : keine Änderung der Hydrophobizität

AS	Austausch	Änderung der Hydrophobizität	Hydrophobizität
28	S (Serin) \rightarrow A (Alanin)	hydrophil \rightarrow hydrophob	\uparrow
40	P (Prolin) \rightarrow S (Serin)	hydrophob \rightarrow hydrophil	\downarrow
51	A (Alanin) \rightarrow V (Valin)	hydrophob \rightarrow hydrophob	\leftrightarrow
60	S (Serin) \rightarrow P (Prolin)	hydrophil \rightarrow hydrophob	\uparrow
77	S (Serin) \rightarrow N (Asparagin)	hydrophil \rightarrow hydrophil	\leftrightarrow
94	L (Leucin) \rightarrow F (Phenylalanin)	hydrophob \rightarrow hydrophob	\leftrightarrow

Tabelle VII-3: Veränderung der Hydrophilie durch in AL κ (UNK) vorliegende seltene AS-Austausche. Zugrundegelegt wurde jeweils die in κ 1 am häufigsten vorkommende AS. \uparrow : Zunahme der Hydrophobizität, \leftrightarrow : keine Änderung, \downarrow : Abnahme der Hydrophobizität

Damit haben die hier erstmals gefundenen Austausche (Tabelle VII-2) in sieben Fällen eine erhöhte Hydrophobizität des Proteins zur Folge, zweimal keinen Einfluss auf die Hydrophilie des Proteins. Die „selteneren“ Austausche (Tabelle VII-3) haben in zwei Fällen die Hydrophobizität des Proteins erhöht, drei mal keinen Einfluss darauf und ein mal die Hydrophobizität erniedrigt. Insgesamt hat die Hydrophobizität des Proteins AL κ (UNK) durch die Aminosäureaustausche deutlich zugenommen und bestätigt daher die Annahme erhöhter Hydrophobizität amyloidogener κ -Ketten.

1.2.4 Glykosylierung und akzessorische Proteine

Autoren wie SLETTEN et al. (1986), WANG et al. (2001), SCHIFFER (1996) und SCHACHTER (1984) bringen auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen mit erhöhter Amyloidogenität in Verbindung. In der Tat sind amyloidogene Leichtketten im Vergleich zu normalen Leichtketten (die zu ca. 15% glykosyliert sind, SOX und HOOD 1970) zu einem signifikant höheren Anteil glykosyliert (SLETTEN et al. 1986). Die AS-Sequenz „DFT“ (Pos. 70-72) wurde von WANG et al. (2001) als möglicher Ort einer N-Glykosylierung der κ_1 -V-Region genannt. Auch bei AL κ (UNK) findet sich diese Aminosäureabfolge an gleicher Stelle. Eine von STEVENS 2000 genannte Glykosylierungsstelle der Form N-X-S/T ist in AL κ (UNK) nicht vorhanden. In dieser Arbeit erfolgte keine gezielte Untersuchung des Proteins auf Glykosylierungen und es ergab sich aus der Aminosäuresequenzierung oder massenspektrometrischen Untersuchung kein konkreter Hinweis darauf. Dennoch wäre eine Glykosylierung von AL κ (UNK) denkbar, da insbesondere der Nachweis (Western Blot) von Anti-AL κ -positivem Material in multiplen Molekulargewichtsbereichen gut mit den Produkten einer partieller Deglykosylierung vereinbar ist (WANG et al. 2001).

Ebenfalls nicht untersucht wurden sonstige posttranslationale Modifikationen der κ -Kette, sowie Art und Anteil akzessorischer, möglicherweise fibrillenstabilisierender Substanzen. Immerhin wurden bei der AS-Sequenzierung keine Nebensequenzen anderer Proteine gefunden, so dass ihr Anteil (in der sequenzierten Säulenfraktion C 713 / 714 IV) mit < 10% angegeben werden kann.

1.2.5 Bewertung des „strukturellen Amyloidogenitäts-Risikos“

Bisher wurden identische Aminosäuresequenzen bei amyloidogenen κ -Ketten aus verschiedenen Individuen noch nie beobachtet. Ebenso wenig konnten Aminosäureaustausche identifiziert werden, die mit absoluter Sicherheit eine Amyloidose induzieren. Deshalb kann aus der Primärstruktur einer κ -Kette bisher (noch) nicht mit letzter Sicherheit auf ihre

Amyloidogenität geschlossen werden. Jedoch kennt man, wie oben erwähnt, mehrere Faktoren, die eine κ -Kette zur Umfaltung in die β -Faltblattstruktur prädisponieren.

Für AL κ (UNK) sind dies die Austausche 4(M \rightarrow L), 40(P \rightarrow S), 50(D), 55(E \rightarrow Q) und 60(S \rightarrow P), möglicherweise auch 107(K \rightarrow R) und 28(D \rightarrow A). Hervorzuheben ist außerdem die starke Zunahme der Hydrophobizität von AL κ (UNK) durch die hier neu gefundenen oder seltenen AS-Austausche. Eine Glykosylierung von AL κ (UNK) an Pos. 70-72 (DFT) ist denkbar und möglicherweise ebenfalls mit erhöhter Amyloidogenität verbunden.

Damit ist AL κ (UNK) aufgrund seiner besonderen Primärstruktur sicherlich in gewisser Weise zur Entwicklung einer Amyloidose prädisponiert. Ob diese tatsächlich auftritt, kann nur beobachtet aber nicht sicher vorhergesagt werden.

Unabhängig davon ist die (lokal) hohe Konzentration monoklonaler Proteine (und die damit einhergehende Überforderung regulärer Abbausysteme) eine wesentliche Voraussetzung für Aggregation, Polymerisation und Fibrillenbildung (LANSBURY 1999).

1.3 Bedeutung der C-Region

Interessant ist der Nachweis von Fragmenten der C-Region in den Deposits von AL κ (UNK). Frühe Veröffentlichungen von AL-Amyloidosen gingen von einer Thesaurierung hauptsächlich der V-Regionen bei teilweisem oder völligem Fehlen der C-Region (GLENNER et al. 1970) aus. Mit verbesserten Sequenzierungsmethoden (EULITZ und LINKE 1995) und speziell gegen die C-Region gerichteten Antikörpern (OLSEN et al. 1998) erkennt man heute zunehmend, dass in fast allen Ablagerungen vom AL κ -Typ auch Peptide der C-Region vorhanden sind. Selten konstituiert die C-Region sogar den überwiegenden Anteil der Amyloidablagerungen, insbesondere wenn sie die Mutation 177 (S \rightarrow N) aufweist. SOLOMON et al. (1998) und WALLY et al. (1999) bringen diesen Austausch daher mit einem aktivem Beitrag der C-Region zur Fibrillogenese in Verbindung. SLETTEN et al. (1986) und ENGVIG et al. (1998) sehen in einer Glykosylierung der C-Region eine Prädisposition zur Fibrillogenese. Über die Rolle der nicht-mutierten C-Region bei der Amyloidentstehung gibt es bisher aber noch keine Erkenntnisse.

Die unterschiedlichen Anteile von C- und V-Regionen in Amyloiddeposits verschiedener Patienten werden auf strukturelle Ursachen zurückgeführt, wobei die Resistenz gegen Abbauvorgänge offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt: SOLOMON et al. (1998) konnten in einem in-vitro-Assay zeigen, dass bei κ -Ketten, von denen vorwiegend die C-Region abgelagert wird (beim Austausch 177 (S \rightarrow N)), V schneller als C degradiert wird und umgekehrt (die meisten κ -Ketten ohne Mutation der C-Kette).

Es lässt sich nicht feststellen, ob auch in den Amyloiddeposits von AL κ (UNK) die komplette konstante Region vorhanden war, da die AS 203-214 nicht sequenatorisch nachgewiesen werden konnten. Jedoch kann mit ziemlicher Sicherheit über massenspektrometrische Untersuchungen ein (ansequenziertes (AS 191-202)) Trypsin-Fragment (AS 191-207) bestätigt werden. In der Asp-N-Spaltung findet sich in geringer Menge die Masse 1946.2 (vgl. Tabelle VI-17), die dem Fragment AS 195-212 entsprechen könnte, wobei sequenatorisch hierfür kein Korrelat gefunden wurde.

Auch andere Autoren konnten die Aminosäuresequenz thesaurierter C-Regionen nicht immer bis AS 214 nachweisen, insbesondere finden SOLOMON et al. 1998 nur Bruchstücke der C-Region bis AS 207, obwohl hauptsächlich die C-Region thesauriert wurde.

In AL κ (UNK) spielt die C-Region offenbar eine bedeutende Rolle, da Fragmente der C-Region in großer Anzahl in der Aminosäuresequenzierung nachgewiesen werden konnten: in der Trypsin-Spaltung wurden 6 Fragmente der C-Region, gegenüber 4 Fragmenten der V-Region gefunden; in der Chymotrypsin-Spaltung 10 Fragmente der C-Region, 8 Fragmente der V-Region und 1 Fragment aus dem V-C-Übergang. In der Asp-N-Spaltung zeigten sich dagegen ganz überwiegend (21, in verschiedenen Peaks zum Teil gleiche) Fragmente der V-Region, nur 1 C-Region-Fragment und 3 (gleiche) Fragmente des V/C-Übergangs.

Da auch der V-C-Übergang gefunden wurde (D40, CT28), ist prinzipiell davon auszugehen, dass V- und C-Region nicht voneinander getrennt, sondern als durchgehender Strang gemeinsam abgelagert wurden, wie auch schon von TERRY et al. in einer Arbeit von 1973 gezeigt. Bemerkenswerterweise konnte AL κ (UNK) trotz des Vorhandenseins von großen Teilen der C-Region nicht von gegen κ BJP erzeugten Antikörpern erkannt werden (vgl. z.B. Abbildung VI-7, VI-8), was auf eine im Vergleich zum Nativzustand erheblich veränderte Proteinkonformation von AL κ (UNK) im Zuge der Umfaltung zur Amyloidfibrille hinweist.

1.4 Fragmentierung

Bei AL κ (UNK) konnte das Vorliegen von multiplen κ -Ketten-Fragmenten nachgewiesen werden: Zum einen zeigen sich in der SDS-PAGE Banden in höheren (Aggregate von Fragmenten, potentiell glykosyliert) und niedrigeren Molekulargewichtsbereichen (Fragmente, potentiell glykosyliert bzw. partiell deglykosyliert) der nativen κ -Kette (25 kD), die mit Anti-AL κ im Western Blot (denaturiertes Protein) anfärbbar waren (VI.6), zum anderen konnten in der Proteinsequenzierung ohne vorherigen Verdau Aminosäuresequenzen beginnend mit AS 40, 88, 150 und 159 nachgewiesen werden (Tabelle VI-21). Außerdem

zeigten sich auch nach enzymatischer Spaltung Fragmente, die nicht typischerweise auf die jeweilige enzymatische Spaltung zurückführbar waren (Tabellen VI-18, VI-19).

Auch viele anderer Autoren haben eine starke Fragmentierung der aus AL-Amyloiddeposits extrahierten Amyloidproteinen beobachtet (HUSBY und SLETTEN 1986, WANG et al. 2001).

Auffallend ist jedoch, dass auch die Fragmentierung in sich nicht homogen ist, sondern für alle „natürlichen“, d.h. ohne vorausgehende enzymatische Spaltung, gefundenen Fragmentanfänge (40 SGK, 88 CQQL, 150 VDN und 159 SQES, vgl. Tabelle VI-21) in der enzymatischen Spaltung jeweils überlappende Fragmente nachgewiesen wurden (CT 18: AS 37-46, D 51: AS 82-103, CT18: AS 149-173). Damit muss angenommen werden, dass nur ein Teil der thesaurierten κ -Ketten fragmentiert vorlag, ein anderer nicht, bzw. die Fragmentierung innerhalb der Deposits inhomogen ist.

Erwähnenswert ist hierbei auch der Befund des „gestagert“ vorliegenden Fragments D 32: massenspektrometrisch konnten nach Asp-N-Spaltung im selben HPLC-Peak sechs mit Aminosäure 50 beginnende Fragmente der V-Region nachgewiesen werden, die sich in ihrer Länge (AS 50-63,-65,-66,-67,-68,-69) um genau zwei bzw. eine Aminosäure unterschieden (vgl. Abbildung VI-25). Diese Staggerung ist nicht durch die Asp-N-Spaltung erklärbar und auch in den anderen enzymatischen Spaltungen konnte kein überlappendes Fragment für diese Region sequenziert werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die κ -Kette in diesem Bereich bereits primär (bzw. zumindest nach Gewebeextraktion) gestagert vorlag. Eine derartige Beobachtung ist in der Literatur für AL-Amyloidosen bisher nicht beschrieben.

Es stellt sich die Frage, ob nun die zweifelsfrei gefundenen Proteinfragmente auch schon in den Amyloid-Deposits vorgelegen haben, oder erst durch die Proteinextraktion artifiziell erzeugt wurden. Gegen letztere Annahme spricht, dass immunologisch (Western Blot) auch native λ - und γ -Ketten als scharfe Banden im Proteinextrakt nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung VI-12, 16), jedoch keine λ - und γ -Fragmente in unteren Molekulargewichtsbereichen. Ferner konnten in der Proteinsequenzierung keine Nebensequenzen anderer (konsequenterweise dann durch die Extraktion ebenso fragmentierter) Proteine gefunden werden. Dass die Fragmentierung zumindest nicht durch extraktionsbedingten enzymatischen Verdau zustande kommt belegen Experimente mit dem κ -Ketten-Homologen β_2 M-Protein, das bei Extraktion mit und ohne Enzyminhibitoren das gleiche Muster multipler Fragmente zeigt (LINKE et al. 1989). Ob jedoch beispielsweise ein mit nativen Proteinen überhaupt nicht zu vergleichendes verändertes Extraktionsverhalten der Amyloidfibrillen im Sinne höherer Fragilität beim Herauslösen der Einzelproteine aus der stabilen Fibrillenstruktur und Matrixbindung die Fragmentierung (mit-)bedingt, lässt sich nicht sicher ausschließen. Man

könnte hier beispielsweise spekulieren, dass einige Bereiche der κ -Kette (z.B. N-terminal) sich besser aus der Fibrillenstruktur lösen lassen als andere (C-terminale) und daher die Amyloidextraktion dominieren. Um diese Hypothese zu prüfen, wäre es erforderlich, das nach Amyloidextraktion verbleibende Rest-Pellet auf die Natur der verbleibenden Proteine (Sequenz, Verhältnis von N- und C-terminalen Peptiden) zu überprüfen, was sich bei erwartungsgemäß sehr fester Bindung der κ -Ketten-Anteile an Matrixbestandteile jedoch als schwierig erweisen dürfte.

Wenn man davon ausgeht, dass die κ -Kette bereits in den Amyloiddeposits fragmentiert vorlag, stellt sich die weitere Frage, ob diese Fragmentierung erst in den Amyloiddeposits aufgetreten ist, oder die Vorläuferproteine bereits vor ihrer Deposition partiell degradiert und fragmentiert wurden. Für beide Annahmen gibt es gute Argumente:

Für SAA konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung in AA und ein C-terminales Fragment (SL-Polypeptid) Voraussetzung der Amyloidogenese ist (LINKE 1980).

Möglicherweise muss die κ -Kette durch partielle Degradation (evtl. durch Abspaltung von C-terminalen Resten), ebenfalls erst in ihrer Konformation so verändert werden, dass Amyloidogenität resultiert. Dafür spricht das häufig beschriebene komplette Fehlen des C-Terminus in Amyloiddeposits. Auch bei AL κ (UNK) konnten die Aminosäuren 208-214 nicht nachgewiesen werden. Unwahrscheinlich erscheint dagegen, dass AL κ (UNK) aus vorher präformierten verschiedenartigen Fragmenten zusammengesetzt ist: dagegen spricht sowohl die Vielzahl und Heterogenität der Fragmente sowie andererseits der Nachweis von die Fragmente überlappenden Sequenzen.

Für eine Fragmentierung der κ -Ketten erst nach der Aggregation zu Fibrillen spricht die Beobachtung, dass der Körper durchaus versucht, entstandene Amyloiddeposits wieder abzubauen (Nachweis von Makrophagen am Rand von Amyloiddeposits, ARGILES et al. 2002). Dabei sind vor allem vulnerable Teile der abgelagerten κ -Kette, nämlich an den Seiten der Fibrillen „überstehende Reste“, Hauptangriffspunkt, während der hydrophobe Kern der Fibrille so dicht gepackt und inert ist, dass Enzyme hier wenig Angriffsfläche finden. Aus der Tertiärstruktur der nativen κ -Kette kennt man Bereiche, die als (anti-)parallele β -Stränge im Zentrum der V- bzw. C-Region liegen, sowie diese verbindende, exponierte „loops“ (vgl. Abbildung I-12). Auch innerhalb von Amyloidfibrillen ist von einer ähnlichen Tertiärstruktur der κ -Kette auszugehen (STEINRAUF et al. 1998). STEINRAUF et al. geben die Aminosäurepositionen der β -Stränge in der variablen Region des von ihnen untersuchten amyloidogenen Proteins kappa I Bre wie folgt an: Strang A: AS 2-7, B: AS 8-13, C: AS 18-25, D: AS 32-38, E: AS 45-50, F: AS 52-55, G: AS 61-67, H: AS 70-75, I: AS 85-90, J: AS

96-107. Die loops befinden sich jeweils dazwischen und stellen den mutmaßlich vulnerabelsten Teil der Fibrille dar. Der in AL κ (UNK) unabhängig von enzymatischer Spaltung gefundenen Fragmentbeginn bei AS 40 (SGK) (vgl. Abbildung VI-27) und in enzymatischen Spaltungen für das jeweilige Enzym untypische Fragmentbeginne bei AS 46 (D30) AS 76 (D6) und AS 82 (D31) liegen damit innerhalb von loops. Allerdings befindet sich die Staggerung des Fragmentes D32 (AS 63-69) hauptsächlich in Strang G, was die Hypothese der sekundären Fragmentierung der κ -Kette an exponierten Bereichen nicht unterstützt. Ebenso liegen auch das Fragment CQQ (AS 88, vgl. Abbildung VI-28), sowie die nach enzymatischer Spaltung gefundenen untypischen Fragmentbeginne bei AS 100 (D10) und AS 105 (D40) im Bereich von β -Strängen. Somit kann diese These an AL κ (UNK) nicht verifiziert werden.

Möglicherweise verändern sich Amyloidablagerungen jedoch im Laufe der Jahre auch im Sinne einer Lösung von Peptidbindungen in ihrem Inneren, ohne dass die Fibrillenarchitektur gefährdet ist, so dass man nach Denaturierung der Fibrille Fragmente aus allen Bereichen der κ -Kette finden kann, was bisher nicht belegt ist. Dies stünde auch im Einklang mit obiger Hypothese, dass die unterschiedlich starke Matrixbindung sekundär (d.h. erst nach Fibrillenbildung) entstandener Proteinefragmente darüber bestimmt, welche Fragmente bei der Methode nach PRAS et al. (1968) extrahiert werden und so das Verhältnis der Proteinefragmente aus unterschiedlichen Teilen der κ -Kette unausgewogen erscheint.

In vivo könnten beide Aspekte eine Rolle spielen: Die Abspaltung eines mehr oder weniger großen C-terminalen Fragments, wodurch sich die Hydrophobizität und damit Amyloidogenität gegenüber dem Ausgangsprotein erhöht (evtl. i.S. der Bildung eines protofibrillären Intermediates, LANSBURY 1999), wie auch die Spaltung von (exponiert liegenden) Peptidbindungen der fertigen Fibrille. Eine aberrante Synthese von primär C-terminal verkürzten κ -Ketten wäre theoretisch denkbar, wurde bisher aber noch nicht beschrieben (zugehörige κ -Bence-Jones-Proteine besaßen stets normale Länge bzw. zugehörige Plasmazellen exprimierten vollständige Ketten).

Unklar ist die Genese der im Urin der Patientin UNK gefundenen Anti- κ (UNK)-positiven Banden unterhalb von 25 kD. Sie sind scharf, so dass von κ -Fragmenten definierter Größe ausgegangen muss. Möglicherweise handelt es sich um unvollständige Abbauprodukte zirkulierender monoklonaler κ -Ketten. EULITZ und LINKE berichteten bereits 1993 über eine λ -Ketten-, ODANI et al. 1999 über eine unterschiedliche κ -Leichtketten-Fragmentierung in der Zirkulation bzw. in der thesaurierten Form. Im Urin der Patientin UNK konnte jedoch kein monoklonales Protein in der Immunfixation nachgewiesen werden.

1.5 Hinweise auf eine Affinitätsreifung bei AL κ (UNK)

Die hohe Mutationsrate von AL κ (UNK) gegenüber anderen bekannten κ 1-Sequenzen deutet auf eine Ak-Reifung hin. Auch PERFETTI et al. (1998) halten eine Antigen-induzierte Reifung von amyloidogenen Leichtketten für wahrscheinlich in dem Sinne, dass bereits ausgereifte Plasmazellen sekundär monoklonal entarten. Um dies zu verifizieren, müsste man die im Genom der Patientin UNK am ehesten mit der auf Proteinebene gefundenen Sequenz übereinstimmende Sequenz bezüglich im Rahmen der Plasmazellreifung aufgetretener Mutationen vergleichen. Von KLEIN et al. (1993) wurden die Sequenzen von exprimierten menschlichen Immunglobulin κ -Genen und Hypermutationen veröffentlicht. STEVENS et al. (1995) halten die « germline » O8-O18 für präferentiell mit AL-Formation assoziiert. Für AL κ (UNK) zeigen sich die größten Übereinstimmungen mit L8 (17 Mutationen auf Aminosäureebene), und L18 (18 Mutationen), so dass AL κ (UNK) möglicherweise auf eines dieser Keimlinien-Gene zurückgeht.

Ein Befund, der auf eine mögliche weitere Hypermutation des monoklonalen Plasmazellklons schließen lässt, ist der Nachweis von zwei verschiedenen Aminosäuren (D und E) an Position 82 (FR3) der variablen Region. Die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Befund um ein Artefakt handelt (z.B. durch eine Modifikation eines Teils des extrahierten Materials, die erst durch die Proteinaufarbeitung entstanden ist), scheidet aus, da neben den entsprechenden Sequenzen im Edman-Abbau auch passende Massen gefunden wurden und dieser Befund mehrfach verifiziert wurde. Damit ist anzunehmen, dass ein Teil des Klons an dieser Stelle mutiert ist, so dass nun eine **biklonale Plasmazellvermehrung** stattfindet und entsprechend zwei verschiedene κ -Ketten (in unterschiedlichen Mengen) thesauriert werden. Dies wäre sowohl im Falle eines systemischen wie auch subkutan lokalisierten Plasmazellklon denkbar. Dafür spricht die genetische Verwandtschaft der Aminosäuren D und E, deren 3-Buchstaben-Code sich nur in einer Position unterscheidet: für D: GAT oder GAC, und für E: GAA oder GAG. Auch in der Literatur wurde von biklonalen Paraproteinämien (GONI et al. 1988) berichtet. MEEKER et al. (1985) beschreiben das Auftreten von Idiotyp-Varianten während der Behandlung eines B-Zell-Lymphoms mit Anti-Idiotyp-Antikörpern, was zu einer Selektion der nicht reaktiven Zellvariante führt.

Von einer biklonalen Paraproteinämie bei Amyloidose wurde bisher nur in sehr wenigen Fällen von λ -Ketten berichtet (PACE et al. 2001). Über den Nachweis biklonaler κ -Ketten in Amyloidablagerungen ist meines Wissen bisher nicht berichtet worden.

Da die vollständige Sequenzierung nur an einem der exstirpierten Amyloidknoten, nämlich AM 125, erfolgte, bleibt unklar, ob auch in anderen Amyloidknoten eine biklonale

Amyloiddeposition erfolgte, oder ob der eine Knoten mehr die D82-Variante und ein anderer Knoten mehr die E82-Variante enthält.

1.6 Überlegungen zur Quartärstruktur

Die genaue Anordnung von AL κ (UNK) innerhalb der Amyloidfibrillen sowie das Aussehen der Fibrillen und ihre Zusammensetzung aus Filamenten kann aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht abgeleitet werden. Diesbezüglich möchte ich auf die Arbeit von STEINRAUF et al. 1999 verweisen, dessen Modell jedoch nur für die κ -V-Region gilt und von einer helikalen Anordnung der als „ β -sandwich“ vorliegenden V-Regionen mit 12 Molekülen pro *turn* ausgeht. Auch Proteinmodifikationen und die Rolle akzessorischer Proteine spielen in seinem Modell keine Rolle. Die Quartärstruktur von AL κ -Amyloidfibrillen mit der genauen Anordnung der Einzelmoleküle ist bisher nur sehr unzureichend erforscht.

2. Klinische Manifestation

2.1 Kutane Amyloidosen

Die klinische Manifestation der AL κ -Amyloidose der Patientin UNK stellt insofern eine Besonderheit dar, als es sich um auf die Unterhaut beschränkte, noduläre Amyloidablagerungen ohne Hinweis auf systemischen Organbefall handelt.

Erste Hinweise auf eine nodulär-kutane Manifestation einer Amyloidose finden sich bei GOTTRON (1950). Er beschreibt eindrucksvoll und detailliert das klinische Bild zweier Patienten mit großknotiger Hautamyloidose, wobei sich verblüffende Ähnlichkeiten zur Patientin UNK ergeben: Auftreten in fortgeschrittenem Lebensalter, schubweises Auftreten neuer Knoten, Betreff vor allem der unteren Extremitäten, jahrelanger Krankheitsverlauf ohne Hinweis auf systemische Beteiligung. Wenngleich GOTTRON das Vorläuferprotein der Ablagerungen nicht bestimmen konnte, so ergab sich doch aus klinischen Beobachtungen die Assoziation zum Multiplen Myelom (z.B. erhöhter Anteil von Plasmazellen im Knochenmark). Bei histologischer Untersuchung der entnommenen Knoten fiel GOTTRON auf, dass die Ablagerungen in der Dermis lokalisiert waren, in die obere Subkutis reichten, und Gefäßwände der umgebenden subkutanen Arterien ebenfalls Amyloidablagerungen aufwiesen. Diese Beobachtung konnte von SEPP et al. (1992) bestätigt werden. Eine andere GOTTRON'sche Amyloidose wurde als AL λ klassifiziert (WIDMER et al. 1993).

Auch in der neueren Literatur gibt es zahlreiche Fallberichte über primär lokalisierte kutane Amyloidosen an multiplen Stellen der Haut und im Unterhautfettgewebe. Nach dem

makroskopischen Aspekt werden sie in Lichen amyloidosus, makulöse Amyloidose, noduläre Amyloidose und Sonderformen (poikilodermieartige, bullöse, aurikuläre, vitiliginöse, anosaktrale Formen) unterteilt (RUZICKA et al. 1990). Nicht alle Hauterscheinungen sind jedoch vom Immunglobulin-Typ: Seltener liegt eine Amyloidose vom β_2 M- (FUJIMOTO et al. 2002) oder ATTR-Typ (MOCHIZUKI et al. 2001) vor. Das Amyloid bei Lichen amyloidosus stammt wahrscheinlich von Keratin ab (AKer, KOBAYASHI und HASHIMOTO 1983)). Der klinischer Verlauf kutaner Amyloidosen ist ganz überwiegend gutartig (NGUYEN et al. 2001, MOON et al. 2003).

Bei vielen der (überwiegend von Dermatologen publizierten) Fälle primär lokalisierter, kutaner Amyloidosen erscheint zwar die AL-Identität gesichert, jedoch wurde meist die klinische Situation nicht befriedigend geklärt, d.h. ob bei den Patienten bereits initial diskrete Hinweise auf eine systemische monoklonale Plasmazellproliferation bzw. indolente extrakutane Amyloidablagerungen vorlagen oder sich im Langzeit-follow-up (> 2 Jahre) entwickelten. Dementsprechend schwanken untersucherabhängig die Angaben über das Vorliegen einer monoklonalen Gammopathie mit u.U. Übergang zum multiplen Myelom erheblich von 50% (BROWNSTEIN und HELWIG 1970) bis unter 15% (RUBINOW et al. 1978, WIDMER et al. 1993). Lediglich anhand der Hauterscheinungen lässt sich weder die Amyloidklasse bestimmen noch kann ein systemischer von einem lokalen oder organlimitierten Befall unterschieden werden (CALKINS 1984).

2.2 Kutane Manifestation bei systemischen AL-Amyloidosen

Umgekehrt gibt es auch kaum Daten zur Häufigkeit von Hautmanifestationen bei systemischer AL-Amyloidose. Dies liegt u.a. daran, dass sich bei systemischer Amyloidose und richtiger Biopsietechnik nahezu immer Amyloidablagerungen in der Haut, vor allem perivaskulär, nachweisen lassen, was zur Amyloiddiagnostik genutzt wird (MASOUYE 1997). Der makroskopische Aspekt der Haut ist dabei meist unauffällig, gelegentlich zeigen sich Petechien und Purpura (durch Gefäßfragilität bei perivaskulären Deposits), selten auch Papeln, Knoten, Plaques, Alopezie, Blasenbildung oder sklerodermiforme Veränderungen (RUBINOW et al. 1978, RUZICKA et al. 1990).

Pathogenetisch und prognostisch ergibt sich nach Durchsicht der Literatur folgende rationale Einteilung kutaner AL-Amyloidablagerungen:

- (1) **solitäres Amyloidom** der Haut. Kennzeichen: Histologisch monoklonale Plasmazellen im Bereich der Amyloidablagerungen nachweisbar. Kein Hinweis auf sonstige kutane oder extrakutane monoklonale Plasmazellproliferation oder

Amyloidablagerung. Ursache: lokalisierte kutane monoklonale Plasmazellvermehrung (i.S. eines soliden extramedullären Plasmozytoms (Plasmozytoma simplex, vor einer Streuung im Organismus), vgl. Einleitung I.2.1.2) mit streng lokaler Amyloid-Deposition. Prognose: Durch Exzision kurabel, ohne chirurgische Therapie Übergang in (2) oder (3) denkbar.

- (2) **multiple kutane Amyloidknoten** des gesamten Integumentes oder flächenhafte Plaques (regional). Histologisch monoklonale **Plasmazellinfiltration multipler Hautstellen mit assoziierten Amyloidablagerungen**. Kein Hinweis auf extrakutane monoklonale Plasmazellproliferation oder Amyloidablagerung. Ursache: Streng auf die Haut beschränkte (dort aber multilokuläre) monoklonale Plasmazellvermehrung mit lokaler Deposition des Zellprodukts (i.S. eines „organlimitierten“ extramedullären Plasmozytoms). Durch Exzision lokal nicht kurabel (WIDMER et al. 1993), da potentiell das gesamte Integument befallen ist. Metastasierung der monoklonalen Plasmazellen in andere Organe mit Übergang in (3)-(4) denkbar.
- (3) **multiple kutane Amyloidknoten** oder flächenhafte Plaques. Histologisch keine monoklonale Plasmazellinfiltration im Bereich der Amyloidablagerungen. Kein Hinweis auf Amyloidablagerungen in anderen Organen, jedoch Hinweis auf **extrakutane monoklonale Plasmazellproliferation** (z.B. erhöhter Plasmazellanteil im KM). Ursache: „extrakutane“ monoklonale Gammopathie mit organotroper (dermatotroper) Amyloid-Ablagerung. Prognose quoad vitam ähnlich MGUS: Übergang in MM möglich, bzgl. Morbidität der Amyloidose ist die Prognose von der Pathogenität des Vorläuferproteins abhängig. Sie ist gut, falls kein weiterer Organbefall auftritt. Mischformen aus (2) und (3) sind denkbar.
- (4) **multiple kutane Amyloidknoten** oder flächenhafte Plaques im Vordergrund bei nachgewiesenen **systemischen Amyloidablagerungen**. Ursache: Monoklonale Gammopathie mit systemischer Ablagerung des Amyloids unter Einschluss oder gar Bevorzugung der Haut. Prognose quoad vitam: je nach Progredienz und Organbefall unterschiedlich, bei geringer Progredienz und geringem Organbefall gut.
- (5) **nebenbefundliche Hautmanifestationen** (insbesondere Purpura, Petechien i.S. perivaskulärer Amyloidablagerungen) **bei systemischen Amyloidablagerungen** v.a. in den inneren Organen. Systemische Amyloidose mit im Vordergrund stehender Organkompromittierung (z.B. Nierenversagen). Ursache: monoklonale Gammopathie mit systemischer Ablagerung von Amyloid unter Destruktion vor allem innerer Organe. Prognose wie bei (4).

2.3 Einordnung von AL κ (UNK)

Nach diesen Darlegungen lässt sich die hier beschriebene organlimitierte (nicht lokalisierte!) subkutane Amyloidose AL κ (UNK) zwanglos der Gruppe (2) zuordnen. Dazu sind folgende Kenntnisse passend:

- a) Die Unterhauttumore bestehen aus Amyloid monoklonaler κ -Ketten (Sequenzierung).
- b) Um die Amyloidablagerungen finden sich κ -positive Plasmazellen in nestartiger Anordnung (Abbildung VI-9), vereinbar mit einer lokalen monoklonalen Leichtkettenproduktion.
- c) Im Knochenmark ist der Plasmazellanteil mit 10% normal (bei allerdings mit 90% κ -positivem Zellen pathologischem κ : λ -Verhältnis (normal 0.5-5:1)).
- d) Das gesamte Integument ist betroffen (multiple subkutane Tumore).
- e) Es bilden sich immer wieder neue subkutane Knoten.
- f) MRT-befundlich sind die Amyloidome auf die Subkutis beschränkt, an einer Stelle Ausbreitung entlang der Bindegewebssepten in den Muskelraum.
- g) Ein Amyloidbefall innerer Organe konnte weder in der Bildgebung (MRT), noch histologisch (Rektum-, Knochenmarksbiopsie) oder klinisch (normales EKG, Herzecho, Nierenfunktion etc.) nachgewiesen werden.
- h) Die Krankheit zeigt einen benignen Verlauf über mittlerweile 10 Jahre (Auftreten erster Knoten bereits 1994, bis 2005 geht es der Patientin immer noch gut (keine Notwendigkeit medikamentöser Therapie oder Organersatztherapie)).

Eventuell wäre auch die Zuordnung zu (3) denkbar, da die κ / λ -Ratio der Plasmazellen im Knochenmark mit 9:1 deutlich zugunsten der κ -positiven Plasmazellen verschoben ist (Untersuchungen bezüglich Monoklonalität der Plasmazellen im Knochenmark wurden bei uns nicht durchgeführt). Einer weiterhin rein (sub-)kutanen Amyloiddeposition ist auch in diesem Fall möglich.

2.4 Überlegungen zur Pathogenese

Bei der Patientin UNK wurde die organlimitierte Deposition monoklonaler κ -Ketten in Form von multiplen subkutanen Amyloidomen zweifelsfrei diagnostiziert. Unsichere Hinweise auf eine systemische monoklonale Plasmazellvermehrung bestehen (9:1-ratio κ -positiver Plasmazellen im KM), ohne dass jedoch der Plasmazellgehalt im Knochenmark über die obere Normgrenze (10%) erhöht wäre. Ebenso gibt es Anhaltspunkte für eine subkutane monoklonale Plasmazellvermehrung (histologische Darstellung κ -positiver Plasmazellnester

in der Nähe der Amyloiddeposits), ohne dass jedoch auch hier die Monoklonalität gesichert wurde.

Für das Vorhandensein von Amyloidablagerungen außerhalb des Subkutangewebes gibt es weder klinische noch histologische Hinweise.

Zur Pathogenese kann daher folgendermaßen spekuliert werden:

- a) Es kam primär in der Haut zu einer monoklonale Plasmazellvermehrung (1). Von dort aus wurden die Plasmazellen in den Organismus ausgeschwemmt, konnten jedoch nur wieder in der Unterhaut Fuß fassen, so dass sich an multiplen Stellen des Integuments extraossäre Plasmazytome mit lokaler Amyloidproduktion zeigen (2).
- b) Die monoklonale Plasmazellvermehrung fand primär im Knochenmark statt (3). Von dort kam es zu einer Ausschwemmung der monoklonalen Plasmazellen in den Organismus. Diese konnten jedoch nur in der Unterhaut Fuß fassen und es kam dort zu lokaler Paraprotein-Produktion mit organlimitierter Amyloiddeposition.
- c) Die monoklonale Plasmazellvermehrung und Paraproteinproduktion findet im Knochenmark statt (3). Das produzierte Paraprotein zeigt eine besondere Affinität zum Unterhautgewebe, so dass nur hier eine Amyloiddeposition resultiert.

Es stellt sich die Frage, was bei der Patientin UNK zur bevorzugten Ablagerungen der leichten Ketten in die Unterhaut geführt hat. Im Falle einer ausschließlich subkutanen Plasmazellinfiltration spielen natürlich die räumliche Nähe zum Syntheseort sowie die hohe lokale Paraprotein-Konzentration eine wichtige Rolle. Unabhängig davon prädisponieren aber auch Milieufaktoren wie z.B. der hohe Glykosaminoglykan- und Proteoglykangehalt sowie der niedrige pH der Haut zur Fibrillogenese. Da in mehreren Berichten kutaner Amyloidosen ähnliche Hautpartien betroffen waren, nämlich bevorzugt die unteren Extremitäten, ist davon auszugehen, dass zusätzliche lokale Faktoren, wie z.B. erniedrigte Temperatur, bei der Fibrillogenese von Bedeutung sind. GOTTRON spricht hierbei von „vaskulären Faktoren“ (Durchblutungsstörungen) oder „früheren Kälteschädigungen“. Versuche zur Temperatur- und pH-abhängigen Fibrillogenese des Proteins UNK wären hierbei hilfreich.

LINKE konnte 1969 zeigen, dass die Injektion von Bence-Jones-Proteine von einem Patienten mit Amyloidose in die Maus zu einer Amyloidose der Maus führt. SOLOMON et al. (1992) konnten am Mausmodell zeigen, dass bei Injektion von amyloidogenen Leichtketten die Ablagerung präferentiell an den gleichen Orten geschah wie in dem Organismus, aus dem die Leichtketten stammten. BELLOTTI et al. (1996) fühlen sich durch die z.T. sehr rasche Ausbildung von Interaktionen zwischen manchen Leichtketten und bestimmten Geweben bei LCDD an eine Antigen-Antikörper-Bindung erinnert und schließen, wie auch JIANG et al.

(1997), daraus eine besondere Affinität amyloidogener Leichtketten zu bestimmten Gewebestrukturen wie Glykosaminoglykanen. Auch SOLOMON (1992) sah einen Zusammenhang von V-Region und Gewebe im Sinne einer Antigen-Antikörperreaktion. Auch die Tatsache, dass bei einer Dimerisierung von Bence-Jones-Protein-Monomeren die eine Kette Schwerekettenkonformation annimmt und die andere Leichtkettenkonformation, hat zur Annahme geführt, dass Leichtkettendimere Antikörperbindungseigenschaften haben. Diese können gegen bestimmte Organstrukturen gerichtet sein. Diese Antikörpertheorie wird von der Beobachtung unterstützt, dass vor allem λ -Leichtketten Dimere bilden und vor allem Amyloidosen auslösen ($\lambda \gg \kappa$).

Interessant wäre es, einen Zusammenhang zwischen Art, evtl. sogar Sequenz der produzierten Leichtketten und dem Organotropismus (isolierter Unterhautbefall) herstellen zu können (COMENZO et al. 2001). Da insgesamt jedoch überhaupt nur wenige Sequenzen amyloidogener κ -Ketten bekannt sind (s.o.) und keine Publikationen vollständiger Sequenzen bei primär (sub-)kutanen AL κ -Amyloidosen vorliegen, lässt sich derzeit noch kein Rückschluss auf sequenzspezifischen Organotropismus ziehen. Dies gilt erst recht für rein subkutane Amyloidosen: In der Literatur wurden bis 2001 (NGUYEN et al.) erst 6 rein subkutan lokalisierte Amyloidosen beschrieben, davon drei mal A β_2 M, einmal AL κ (PABLOS et al. 1993) einmal AL λ und einmal AA (die übrigens alle einen benignen Verlauf zeigten). Insofern ist auch die rein subkutane Manifestation der Amyloidablagerungen bei der Patientin UNK eine absolute Rarität. Bei AL κ (UNK) handelt es sich damit um die Erstbeschreibung einer rein subkutanen organlimitierten Amyloidose mit kompletter Aminosäuresequenzierung.

3. Diskussion der immunologischen Methoden

In dieser Arbeit wurde neben der Aminosäuresequenzierung auch mit immunologischen Methoden versucht, Aussagen über die Natur des Proteins AL κ (UNK) (Art des Proteins, Subklasse, Kontaminationen) zu treffen. Außerdem wurde ein gegen AL κ (UNK) gerichtetes Antiserum produziert und in der Routinediagnostik von AL κ -Amyloidosen eingesetzt. Vor dem Hintergrund, dass das initiale Scheitern der Klassifikation von AL κ (UNK), welches als methodischer (zu geringe Verdünnung) und nicht grundsätzlicher Fehler erkannt wurde, diese Arbeit initiiert hat, sollen die zu überwindenden Schwächen der immunologischen Methoden hier kurz diskutiert werden.

3.1 Verwendete Antikörper

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Antiseren handelt es sich um laboreigene monoklonale (Anti-AA) und polyklonale Antikörper (die anderen) gegen Proteine, die im wesentlichen aus menschlichem Gewebe bzw. Urin gewonnen wurden, oder um Antikörper gegen Peptide.

Diese Antiseren wurden nach theoretischen immunologischen Überlegungen hergestellt, in der Praxis auf ihre Güte getestet (vgl. Methodenteil) und die besten Antiseren (mit hoher Sensitivität und Spezifität) selektioniert und eingesetzt. Dies gilt sowohl für das hier hergestellte AL κ (UNK) wie auch für die übrigen verwendeten Antiseren, die z.T. schon Jahre zuvor produziert wurden und deren Güte sich während des jahrelangen Routineeinsatzes bestätigt hat. Es hat sich gezeigt, dass gegen Amyloid-Vorläuferproteine produzierte Antiseren für das korrespondierende Amyloid im allgemeinen eine erheblich geringere Sensitivität aufweisen als direkt gegen das Amyloid produzierte Antiseren. Am Beispiel von AL κ (UNK) wird dies deutlich an der Tatsache, dass Anti- κ BJP (MIX), eine Mischung aus gegen κ 1, κ 2, κ 3, und κ 4-BJP produzierten Antiseren, immunhistochemisch keine(!) Reaktion mit AL κ (UNK) zeigt. Da Antikörper bekanntermaßen nicht gegen die Primärstruktur eines Proteins, d.h. gegen die Aminosäuresequenz, gerichtet sind sondern gegen Besonderheiten der Sekundär- Tertiär- und Quartärstruktur, d.h. die Konformation, folgt, dass sich also die Konformation eines κ -Amyloids erheblich von der Konformation eines κ -BJP unterscheiden muss, d.h. im Verlauf der Amyloidentstehung eine Konformationsänderung eintritt. Andererseits scheint es Gemeinsamkeiten in der Konformation aller Amyloide einer Klasse (auch bei leicht unterschiedlicher Aminosäuresequenz) zu geben, da ein gegen ein Amyloid produziertes Antiserum andere Amyloide gleicher Klasse in den allermeisten Fällen ebenfalls erkennt. Es wurden in unserem Labor sogar Antiseren (Anti-AL λ (HAR), Anti-AA mc) produziert, welche Amyloide gleicher Klasse speziesübergreifend (auch bei Tieren) erkennen (PLATZ et al. 1997, GRUBER und LINKE 1996). O'NULLAIN und WETZEL gelang es 2002, einen gegen die Amyloidkonformation gerichteten Antikörper herzustellen, der Amyloide verschiedener Klassen detektiert. Damit sind zwangsläufig Versuche, Amyloid sicher mit Hilfe von Antiseren zu detektieren, die gegen Vorläuferproteine erzeugt wurden (die meisten kommerziell erwerbbaaren Antiseren) von vornherein zum Scheitern verurteilt. Dies können Arbeitsgruppen, die auf käufliche Antiseren angewiesen sind, bestätigen.

3.2 Spezifität eines Anti-AL κ -Antiserums im Besonderen

Im Fall eines Antiserums, das gegen eine in Amyloidkonformation vorliegenden Kappa-Kette als Vakzine gerichtet ist, ergeben sich folgende Besonderheiten:

Während die konstante (C-) Region nur an 1-3 Aminosäurepositionen (153, 177, 191) variabel ist, werden in der variablen Region der leichten Kette 4 Subklassen (Isotypen $\kappa 1$ - $\kappa 4$) unterschieden. Zudem sind die CDR-Regionen innerhalb eines Isotyps von Kappa-Kette zu Kappa-Kette verschieden (Idiotypen). Generell geht man davon aus, dass sich die Aminosäuresequenzen der variablen Region bei Proteinen verschiedener Subgruppe um bis zu 50% unterscheiden und selbst innerhalb einer Subgruppe bis zu 25% der Aminosäuren ausgetauscht sind (WATANABE und HILSCHMANN 1970).

Im Sonderfall der Amyloidkonformation können außerdem Amyloid-spezifische Oberflächenstrukturen bzw. akzessorische Proteine vorhanden sein, die eine native Kappa-Kette nicht besitzt (LINKE et al. 1973). Dies gilt auch für die gefundenen unterschiedlich langen κ -Fragmente, die wahrscheinlich eine jeweils unterschiedliche Tertiärstruktur besitzen. Ferner muss mit dem Vorhandensein Amyloid-spezifischer akzessorischer Moleküle (Zucker, Amyloid-P-Komponente) gerechnet werden. So produziert ein Kaninchen, das mit der aus dem Gewebe extrahierten, in Amyloidkonformation vorliegenden Kappa-Leichtkette immunisiert wurde, neben anderen folgende spezifisch gegen Epitope der κ -Kette gerichteten Antikörper:

1. Antikörper gegen Epitope der nativen V- und C-Region
2. Antikörper gegen Epitope der V- und C-Region, die nur bei Amyloid auftreten
3. Subklassen-spezifische Antikörper (die nur $\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$ oder $\kappa 4$ erkennen, oder $\kappa 1$ und $\kappa 3$, nicht aber $\kappa 2$ und $\kappa 4$ u.s.w.; ihre tatsächliche Existenz ist bisher in der Praxis für κ -Amyloid nicht nachgewiesen, auch SOLOMON konnte kein subklassenspezifisches Antiserum gegen AL-Amyloid erzeugen (LINKE, persönliche Mitteilung).)
4. a, Anti-idiotypische Antikörper gegen den nativen Idiotyp
b, Anti-idiotypische Antikörper gegen den verborgenen Idiotyp
5. Antikörper gegen Amyloid-assoziierte „Verunreinigungen“ wie die Amyloid-P-Komponente (in unserem Fall wurde durch Verwendung von PBS bei der Extraktion die über Calcium-Bindung gebundene P-Komponente ausgeschlossen).

Die genaue Zusammensetzung aus o.g. Spezifitäten lässt sich nur begrenzt planen und hängt ab von Antigen und Tierindividuum /-spezies, in dem der Antikörper hergestellt wird. So kommt es vor, dass das Antiserum eines Tieres mehr gegen die „nativen“ Teile des Amyloids gerichtet sind und damit auch Vorläuferproteine erkennt, oder überwiegend gegen die

Amyloid-spezifischen Epitope. Andere Antiseren erkennen hauptsächlich die C-Region und damit κ -Ketten aller Subgruppen (LINKE 1985 über Anti-AL κ (SIN)), manche sind gegen subgruppenspezifische Teile der V-Region gerichtet mit Nachweis nur der subgruppen-identischen κ -Ketten, wieder andere reagieren nur mit idiotypischen Teilen des Antigens (LINKE 1985 über Anti-AL κ (ACK)) und erkennen damit nur die zur Immunisierung verwendete κ -Kette, nicht aber κ -Ketten aus anderen Patienten. Von manchen Antiseren werden hauptsächlich Verunreinigungen und Zuckerstrukturen erkannt, sie sind daher eher „unspezifisch“. Auch ist es möglich, dass ein Tier nur eine schwache Immunantwort zeigt und das Antiserum daher hoch konzentriert verwendet werden muss. Es lassen sich jedoch durch Austestung und Absorption (z.B. mit NHS oder Gewebepulver) in den allermeisten Fällen Antikörper mit den erwünschten Spezifitäten finden, so dass bei einer Verdünnung des Antiserums auf 1:300 - 1: 10.000 eine gute Sensitivität und Spezifität resultiert. In dieser Weise ausgetestete Antiseren sind experimentell nutzbar und kommerziell bisher nicht verfügbar.

3.3 Antigene

Zu den Antigenen, die als Kontrollen verwendet wurden, soll Folgendes bemerkt werden: Auch sie stammen ausnahmslos aus menschlichen Geweben bzw. Serum oder Urin. Wie in AL κ (UNK) in (im Vergleich zum Amyloidanteil) geringe Mengen anderer Serum-/Gewebeproteine nachgewiesen wurden, sind auch in Kontrollproteinen geringe Mengen an Verunreinigungen nicht auszuschließen. „Unspezifische“ Reaktionen treten insbesondere dann auf, wenn das Antigen nicht z.B. elektrophoretisch separiert wurde (Western Blot), sondern als Gewebeextrakt (Ouchterlony) oder noch im Gewebeverbund (Immunhistochemie) vorliegt. Insbesondere beim Gewebeschnitt finden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum gesuchten Antigen (z.B. einem Amyloid vom A β_2 M-Typ) unzählige weitere Struktur- und Serumproteine wie Antikörper und SAA, vor allem wenn eine entzündliche Reaktion des betreffenden Gewebes vorliegt. Gegen einen solchen Gewebeschnitt können demnach Antikörper gegen AL-, AA-, A β_2 M u.a. reagieren (LINKE 1985). Die Differenzierung gelingt dann aber i.d.R. aufgrund der Reaktionsintensität bzw. durch Vergleich des Orts der Farbreaktion mit dem der Amyloiddeposits (Kongorotfärbung). Beim Einsatz von Kontrollantigenen im Ouchterlony muss die Anwesenheit unerwünschter Kontaminanten erst ausgeschlossen werden. Daher wurde z.B. bei der Frage, ob AL κ (UNK) gegen z.B. AA reagiert, im gleichen Ansatz ein Anti-AA-Antikörper sowie ein weiterer Anti- κ -Antikörper

mit Kontroll- κ -Antigen eingesetzt um festzustellen, ob in AA die κ -Kette vorhanden ist und der Kontroll-Anti- κ -Antikörper dies auch erkennen würde.

3.4 Konkrete Auswirkungen auf diese Arbeit

3.4.1 Immunhistochemische Kreuzreaktionen

Amyloid ist im Gewebe keine Reinsubstanz, sondern in Amyloid-Gewebedeposits sind fast immer auch Serumproteine zu finden. Dies steht mit der Beobachtung im Einklang, dass in der routinemäßig durchgeführten immunhistochemischen Amyloiddiagnostik beim Nachweis von AL κ auch ein gegen AL λ gerichteter Antikörper fast regelmäßig leicht bis stark positiv (0-+,0-++) reagiert. Dabei handelt es sich aber, wie hier im Western Blot demonstriert werden konnte, keinesfalls um eine mangelnde Spezifität des zur Detektion von AL λ eingesetzten Antikörpers, sondern im Gegenteil um ein Zeichen hoher Sensitivität. Während man bei AL κ geradezu regelhaft auch λ -Ketten und γ -Ketten in den Deposits bzw. (lichtmikroskopisch nicht unterscheidbar) in unmittelbarer Nähe davon immunhistochemisch nachweisen kann, ist dies bei anderen Amyloiddeposits wie ATTR, A β_2 M, AA nicht so häufig der Fall, kommt aber vor (STREGE et al. 1998). Diese geringen Reaktivität ist jedoch in fast allen Fällen inkonsistent (vgl. VI.5.7) und kann daher als unspezifisch erkannt werden.

3.4.2 Fehlende immunchemische Subgruppenzuordnung

In dieser Arbeit wurde versucht, mithilfe von Antiseren, die gegen κ BJP bekannter Subklasse (1-4) produziert worden waren, durch geeignete Absorption immunchemisch die Subklasse von AL κ (UNK) herauszufinden. Dabei war es trotz intensiver Bemühungen nicht möglich, die Subgruppe zu bestimmen. Im Nachhinein muss festgestellt werden, dass es auch der Arbeitsgruppe von SOLOMON (LINKE, persönliche Mitteilung) nicht gelungen ist, auf diese Weise an Amyloidproteinen, die von unserem Labor isoliert worden sind, eine Subgruppenbestimmung durchzuführen. Vermutlich liegt dies an der doch zu unterschiedlichen Konformation von κ -BJP und κ -Amyloid. Möglicherweise wäre eine Subgruppenbestimmung durch entsprechende Absorption von gegen AL κ_{1-4} gerichteten Antiseren von mehr Erfolg gekrönt gewesen, jedoch standen entsprechende Antigene mit Antiseren nicht zur Verfügung (die Subklasse der Anti- κ -Amyloid-Antiseren war in den meisten Fällen nicht gesichert bzw. nicht für jede Subklasse ein definiertes Antiserum vorhanden).

3.4.3 Initiales Versagen von Anti-AL κ (SIN) bei der Detektion von AL κ (UNK)

Initial war es nicht möglich, die Identität des von AL κ (UNK) immunchemisch festzustellen (vgl. VI.1). Dies lag zum einen daran, dass Antiseren gegen κ BJP (Anti- κ BJP (MIX)) verwendet wurden, die also gegen native Kappa-Ketten hergestellt worden waren. Da bei der Umfaltung in Amyloid jedoch andere Epitope exponiert werden als im nativen Vorläuferprotein (LINKE 1973), weisen derartige Antiseren für Amyloid bekanntermaßen eine wesentlich geringere Spezifität auf als direkt gegen Amyloid produzierte Antiseren (vgl. VII.3.1). Andererseits war auch die Reaktion mit Anti-AL κ (SIN) nur schwach positiv und wurde damit als diagnostisch nicht verwertbar eingestuft, wobei rückblickend die damals noch zu hohe Antikörperverdünnung (vgl. Tabelle VI-12) und das Fehlen einer Positivkontrolle für das Scheitern der Initialen Klassifikation verantwortlich gemacht werden müssen. In der nachträglich durchgeführten digitalen Bildbearbeitung einer Fotografie des mit Anti-AL κ (SIN) gefärbten Amyloids AL κ (UNK), in der alle Rottöne soweit verstärkt wurden, bis die Rotfärbung des (κ -haltigen) Serums der Rotfärbung der Kontrollschnitte entsprach (Abb. VI-7), zeigte sich im Vergleich mit einer Fotografie des gleichen Gewebsausschnitts in einer Färbung mit Anti- κ BJP (MIX) nach gleicher Verstärkung der Rottöne, dass tatsächlich in mit Anti- κ BJP (MIX) gefärbten Gewebsschnitten Amyloid nicht im geringsten markiert wurde, in mit Anti-AL κ (SIN) untersuchten Schnitten nun jedoch Amyloid zweifellos positiv, wenn auch schwach (vgl. Abb. VI-7) angefärbt war. Konsequenterweise wurde in der nachfolgenden Routinediagnostik die Antikörperverdünnung von Anti-AL κ (SIN) von 1:4000 auf 1:1000 reduziert. Um weiteren fehlerhaften Ergebnissen vorzubeugen wurden in der Folge außerdem routinemäßig definierte Kontrollschnitte mitgeführt. Die positive Reaktion von Anti-AL κ (SIN) gegen Anti-AL κ (UNK) konnte später auch im Western Blot und im Ouchterlony-Test bestätigt werden.

Seit seiner Herstellung wird Anti-AL κ (UNK) zusammen mit Anti-AL κ (KRA) sehr erfolgreich in der Immunhistochemie eingesetzt, wobei das weiterhin verwendete Anti-AL κ (SIN) zugleich eine Kontrolle darstellt. Es hat sich herausgestellt, dass einzelne Anti-AL κ -Antiseren (jede 15. Reaktion, LINKE, persönliche Mitteilung, vgl. dazu Tabelle VI-12) auch inkonsistent reagieren können; setzt man jedoch drei (heute vier) Anti-AL κ -Antiseren ein, wird diese Inkonsistenz in allen Fällen ausgeglichen, so dass alle Reaktionen konsistent sind. Durch zusätzliche Einführung von Anti-AL κ (KRA-UNK) in die Routinediagnostik konnte somit die Sensitivität der Immunhistochemie für AL κ weiter gesteigert werden. Da jedoch immer noch ein Prozentsatz von ca. 6.5% (17 von 260, vgl. VI.5.6, fallende Tendenz durch

ständige Erzeugung und Austestung neuer Antiseren) der amyloidhaltigen Routine-Gewebeschnitte nicht mit den verfügbaren Antikörpern sicher identifiziert werden konnte, lässt sich auch nicht sicher beweisen, dass Anti-AL κ (KRA-UNK) alle AL κ mit 100%-iger Sensitivität detektiert. Geht man von 47 detektierten κ -Amyloidosen und 3 A κ /A λ bzw. 1 A κ /ATTR-Doppelamyloidose bei 17 nicht einordbaren (möglichen κ -)Amyloidosen aus, konnten jedoch mindestens 51 (47 + 3 + 1) von 68 (51 + 17) = 75% aller κ -Amyloidosen von AL κ (SIN) + AL κ (KRA-UNK) detektiert werden. Geht man davon aus, dass die κ -Amyloidosen in den 17 nichtidentifizierten Fällen den gleichen Anteil wie am identifizierten Gut haben (47 bzw. 51 von 260 = 18.1 - 19.6 %), d.h. 3 Fälle von 17, so liegt der Anteil der detektierten AL κ -Amyloidosen bei 51 von 54 = 94%. Da jedoch in der Zwischenzeit die Herstellung von Antikörpern gegen AFis, AApoAI, AApoAII, ALys und ACys gelang, durch die nun viele der bislang unklassifizierbaren Amyloidosen eingeordnet werden können, ist der Anteil von AL κ an den damals noch nicht identifizierten Antigenen deutlich geringer anzunehmen als im obigen Rechenbeispiel. Da zudem laufend neue Antiseren gegen die häufigen Amyloidosen (wie AL λ , AL κ , ATTR) hergestellt werden, die die Sensitivität und Spezifität des verfügbaren Antikörperspektrums kontinuierlich erweitern, können heute weit über 94% (nach neuesten laboreigenen Testungen 98%) der AL κ -Amyloidosen in unserem Labor auf Anhieb und sicher detektiert werden.

4. Krankheitsverlauf und Prognose der Patientin UNK, Therapieoptionen, Ausblick

Zusammengefasst handelt es sich bei der Patientin UNK um die sehr seltene Form einer organlimitierten nodulären Amyloidose des Subkutangewebes vom Typ AL κ : es finden sich multiple subkutan lokalisierte Amyloidome ohne Hinweise auf Amyloidablagerungen außerhalb des Integuments. Jedoch kann der Nachweis einer zugunsten κ verschobenen κ/λ - Ratio im Knochenmark (normal 0.5-5, hier 9) bei normalem Gehalt an Plasmazellen als einziger Hinweis auf eine möglicherweise auch systemische monoklonale Plasmazellvermehrung gewertet werden, wobei das Produkt (κ -Kette) streng organlimitiert (dermatotrop) abgelagert wird.

Für eine im Subkutangewebe lokalisierte monoklonale Plasmazellvermehrung spricht dagegen der histologische Befund von perivaskulären, lympho-plasmazellulären Aggregaten mit z.T. follikelartiger Anordnung in unmittelbarer Nähe zu den Amyloiddeposits. Beweisen könnte man diese Annahme nur durch Untersuchung der beschriebenen Plasmazellen auf

Monoklonalität bzw. Art des synthetisierten Immunglobulins. In der von uns durchgeführten immunhistochemischen Färbung scheinen zwar κ -positive Plasmazellnester in unmittelbarer Umgebung der Amyloiddeposits zu überwiegen, die Klonalität ist jedoch nicht gesichert.

Des Weiteren wurde bei der Patientin eine solitäre, nicht Kontrastmittel anreichernde zerebrale Raumforderung i.S. einer multiplen Sklerose entdeckt, die differentialdiagnostisch von einem zerebralen Amyloidom (LINKE et al. 1992) abgegrenzt werden muss. Im letzteren Falle wäre ein intrazerebraler Klon κ -produzierender Plasmazellen zu fordern, da extrazerebral produzierte Leichtketten die Blut-Hirnschranke nicht überwinden und daher nur perivaskulär oder in neurohämalen Regionen (SCHRÖDER UND LINKE 1999) als Amyloid abgelagert werden könnten. Ferner unterscheiden sich die Milieufaktoren (pH, Temperatur, Strukturproteine) in Haut und Gehirn erheblich, so dass eine systemische (medulläre) Paraproteinproduktion mit Organotropismus für zugleich Haut und Gehirn unwahrscheinlich ist.

Der Krankheitsverlauf kann als benigne bezeichnet werden in Übereinstimmung mit anderen Fallberichten primär lokalisierter (sub-)kutaner Amyloidosen und solitärer zerebraler Amyloidome: Über 10 Jahre war lediglich eine symptomatische Therapie im Sinne lokaler Tumor-Exzisionen aus kosmetischen und diagnostischen Gründen erforderlich, die jedoch nicht zur Heilung führte. Die regelmäßig durchgeführten Untersuchungen der inneren Organe (Funktionsparameter, Bildgebung) erbrachten keinen Hinweis auf systemische Amyloidablagerungen. Ebenso konnte mit den üblichen Methoden kein monoklonales Paraprotein in Serum oder Urin nachgewiesen werden. Eine Rektumbiopsie zeigte keine Amyloidinfiltration.

Die lediglich kosmetisch störenden Hautknoten wurde nicht als Indikation zu einer möglicherweise nebenwirkungsreichen systemischen Therapie gesehen.

In Kenntnis der Literatur (NGUYEN et al. 2001) stellt diese Art der organlimitierten subkutanen Manifestation einer AL-Amyloidose eine sehr seltene Situation dar.

Der benigne Verlauf wird möglicherweise dadurch stabilisiert, dass derzeit ein Gleichgewicht herrscht zwischen der Produktion monoklonaler Leichtketten und ihrer Adsorption an bestehende subkutane Nidi, die zirkulierende Leichtketten quasi „aufsaugen“ und so den Körper vor systemischer Amyloidose schützen.

Insgesamt erscheint bei weiterhin fehlendem Hinweis auf systemischen Amyloidablagerungen und fehlender Progression der MGUS eine abwartende Haltung bzw. lediglich symptomatische Therapie der Hautamyloidome gerechtfertigt. Es muss jedoch damit gerechnet werden, dass der Plasmazellklon weiter streut, unter Umständen in bisher nicht befallene Organe (z.B. durch Expression veränderter Proteine an der Plasmazelloberfläche),

dass sich im Rahmen von Mutationen seine Wachstumsdynamik akzeleriert und Alterationen bezüglich der Aminosäuresequenz der produzierten Leichtketten (vgl. Mutation D/E Pos. 82) und damit auch ein veränderter Organotropismus der Amyloidablagerungen möglich sind.

Falls weiterhin Organmanifestationen durch Amyloidablagerungen ausbleiben, ist keine Therapie erforderlich. Im Falle der Progression (z.B. Multiples Myelom) kann sich die Therapie an den entsprechenden Therapieleitlinien orientieren (Chemotherapie, Radiatio, autologe Stammzelltransplantation, supportive Maßnahmen), bei Organkompromittierung durch systemische Amyloidablagerungen sind zusätzlich Organersatzverfahren bzw. die Organtransplantation und symptomatische medikamentöse Therapieschemata angebracht.

Als Ausblick sind folgende Fragen im weiteren Verlauf von besonderem Interesse:

1. Welchen Verlauf nimmt die Erkrankung der Patientin hinsichtlich Zahl, Größe und Lokalisation der Amyloiddeposits (organlimitiert/systemisch)?
2. Von welchen Faktoren ist die Dynamik der Erkrankung abhängig (Änderung der Paraproteinkonzentration, Übergang zum multiplen Myelom, Mutation in der Aminosäuresequenz, Ort der Paraproteinproduktion)?
3. Wie entwickelt sich die diagnostizierte Multiple Sklerose weiter bzw. zeigt sich ein Zusammenhang mit der Amyloidose?

VIII. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine in der klinischen Manifestation sehr ungewöhnliche Amyloidose untersucht:

- (1) Es handelt sich um eine organlimitierte, subkutane noduläre Manifestation ohne Hinweis auf eine systemische Beteiligung.
- (2) Der Verlauf ist benigne mit seit 10 Jahren im wesentlichen stationärem Verlauf ohne Anhalt für Progression.
- (3) Abgesehen von einem hochnormalen Plasmazellgehalt im Knochenmark mit erhöhtem κ -Anteil fehlen Hinweise auf eine systemische Paraprotein-Produktion.
- (4) Bei der Patientin liegt klinisch eine Multiple Sklerose mit einem einzigen Entmarkungsherd zerebral vor, wobei auch hier der Verlauf benigne und ohne wesentliche Progression ist. Differentialdiagnostisch ist das Vorliegen eines zerebralen Amyloidoms nicht sicher auszuschließen.

Durch Isolation des Amyloidproteins aus dem Gewebe und Aminosäuresequenzierung konnte als thesauriertes Protein eine monoklonale Kappa-Kette der Subklasse 1 identifiziert werden.

Die vollständige Aminosäuresequenz der variablen Region sowie wesentlicher Teile der konstanten Region (bis AS 207) konnte durch die Kombination von Sequenzanalyse und Massenspektrometrie ermittelt werden (VI.11.4). AL κ (UNK) zeigt 7 bisher nicht- und etwa ebenso viele bisher nur selten beschriebene Aminosäureaustausche (VII.1.1.2).

Bemerkenswert ist ferner eine starke Fragmentierung des Proteins, ein „staggering“ der AS sowie eine Biklonalität (D/E) an Pos. 82. Eine mögliche Glycosylierungsstelle an Pos. 70-72 wurde identifiziert.

Der Vergleich der Aminosäurestruktur von AL κ (UNK) mit bereits bekannten Sequenzen amyloidogener und nicht-amyloidogener κ -Ketten ergab folgende Resultate:

- (1) AL κ (UNK) weist nur sehr wenige der bislang typischerweise mit erhöhter Amyloidogenität in Verbindung gebrachten Mutationen auf, so dass aus der Aminosäureabfolge an sich kein Rückschluss auf die Amyloidogenität des Proteins möglich ist (VII.1.2.5).

- (2) Die Hypothese, dass erhöhte Hydrophobizität die Amyloidogenität erhöht, wird durch die Sequenz von AL κ (UNK) bestätigt, indem die in AL κ (UNK) neu aufgetretenen Aminosäureaustausche die Hydrophobizität des Proteins deutlich steigern (VII.1.2.3).

Eine Biklonalität von Amyloidablagerungen, wie hier an Pos. 82 der Fall, ist sehr ungewöhnlich und wurde für κ -Amyloidosen bislang nicht beschrieben. Es gibt jedoch Berichte über biklonale Paraproteinämien, die im Rahmen einer somatischen Hypermutation auftreten können. Dies wäre für AL κ (UNK) ebenfalls denkbar, da sich die Basentriplets für D und E jeweils nur in einem Basenpaar unterscheiden.

Die hier auffallende starke Fragmentierung der κ -Kette ist für Amyloidablagerungen typisch. Ob sie bereits vor oder erst während der Amyloiddeposition stattgefunden hat oder aber durch den Extraktionsvorgang bedingt ist, konnte für AL κ (UNK) nicht geklärt werden. Für eine Fragmentierung bereits vor der Ablagerung spricht der Nachweis von niedermolekularen κ -positiven Banden im Western-Blot der Urinauftrennung (VI.9.4). Das Staggering an Pos. 63-69 sowie das Vorkommen unterschiedlicher Fragmentanfänge bei gleichzeitig anderen, diese Fragmentanfänge überlappenden Fragmenten, spricht eher für eine Fragmentierung der Fibrillen nach der Ablagerung. Auch wenn durch entsprechende Kühlung des Proteins bei der Extraktion eine Fragmentierung enzymatischer Verdau nahezu ausgeschlossen werden kann, wäre dennoch eine extraktionsbedingte Fragmentierung durch die Interaktion von Fibrille und Matrix denkbar (VII.1.4).

Das thesaurierte Protein wurde außerdem mit immunchemischen Methoden charakterisiert.

Es konnte ein gegen κ -Amyloid gerichtetes polyklonales Antiserum aus dem Kaninchen hergestellt werden, welches sich im Routineinsatz zur Amyloidklassifikation bestens bewährt hat (VI.5). Die Ursachen dafür, dass AL κ (UNK) initial nicht immunchemisch klassifiziert werden konnte wurden näher untersucht mit folgendem Ergebnis:

Die Antikörperverdünnung für den anfangs zur Detektion von AL κ eingesetzten Antikörper Anti-AL κ (SIN) lag mit 1:4000 zu hoch und wurde auf 1:1000 korrigiert.

Es fehlten Kontrollschnitte, die seitdem mitgeführt werden.

Durch diese Maßnahmen konnte die routinemäßige Amyloidklassifikation im Labor deutlich verbessert werden.

Interessant war außerdem die Feststellung, dass ein Mix aus gegen κ BJP erzeugten Antiseren keine Reaktivität gegenüber AL κ (UNK) aufwies (VI.5.8). Dies steht in Einklang mit bereits früher gemachten Erfahrungen, dass die Sensitivität von gegen Amyloidvorläuferproteine

produzierten Antiseren gegen Amyloid gering ist und unterstützt die Annahme, dass es bei der Amyloidfibrillenbildung zu einer erheblichen Veränderung der Oberflächenstruktur und damit der antigenen Determinanten kommt. Anti- κ BJP (MIX) wird seither zur Routine-Amyloidklassifikation nicht mehr im Labor eingesetzt.

AL κ (UNK) konnte immunchemisch eindeutig als AL κ klassifiziert und gleichzeitig das Vorliegen anderer Amyloidklassen ausgeschlossen werden (VI.10.1), was den hohen Stellenwert und die Leistungsfähigkeit der Immunchemie bei der Amyloiddiagnostik unterstreicht. Ferner wurde der Geweberohextrakt bezüglich des Gehaltes an anderen Proteinen untersucht. Es konnten u.a. unfragmentierte λ - und γ -Ketten nachgewiesen werden, ferner ist vom Vorhandensein noch weiterer ubiquitärer höhermolekularer Proteine wie Albumin in gegenüber dem Amyloidgehalt vergleichsweise geringer Menge auszugehen (VI.9.4).

Die Subklassenzuordnung gelang immunchemisch nicht. Als Ursachen dafür spielen ungeeignete Antiseren (gegen κ BJP gerichtete) sowie die hohe Strukturvariabilität der κ -Ketten auch innerhalb einer Subklasse eine Rolle. Dieser Misserfolg wurde auch zu einer kurzen theoretischen Überlegung bzgl. der in einem polyklonalen Antiserum enthaltenen Spezifitäten zum Anlass genommen (VII.3).

Die besondere klinische Manifestation von AL κ (UNK) wurde mit anderen subkutanen und kutanen Amyloidosen verglichen und prognostisch eingeordnet. Aufgrund des derzeit benignen Krankheitsverlaufes erscheint bei der Patientin derzeit ein abwartendes Verhalten gerechtfertigt, im Falle der Progression wurde das Spektrum möglicher Therapieoptionen dargestellt (I.2.2, VII.4).

IX. Anhang

Adressen

Campus Virchow Klinikum
Medizinische Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. B Dörken
Hämatologisch-Onkologische Ambulanz
Dr. med. Lars Meyer
Augustenburger Platz 1
13344 Berlin
Tel: ++49 30 450 53219
Fax: ++49 30 450 53930

Institut für Pathologie (Rectum-Biopsie H-Nr.: 4650/99 und Beckenkammstanze H-Nr.: 10512/99)
Direktor: Prof. Dr. med. M. Dietel
Tel: (030) 450-56002
Fax: (030) 450-56900

Institut für Pathologie (E-Nr: 1756/98)
Dr. med. E. van Almsick
Dr. med M. Beiswenger
Großgörschenstr. 6
10827 Berlin
Tel: (030) 7820506
Fax: (030) 7820649

Hausärztin
Frau Brigitte Gerstenmaier
Rubensstraße 116
12157 Berlin
Tel: (030) 8555201

Dr. med. Jörg Braun
Arzt für Neurologie und Psychiatrie
Bahnhofstr. 12
12305 Berlin
Tel: (030) 7447267

Dr. phil. Dr. med. habil. Friedrich Lottspeich
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18a
D-82152 Martinsried bei München
Tel: (089) 8578-3964

Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Reinhold P Linke
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18a
D-82152 Martinsried bei München
Tel: (089) 8578-2546/-2460

Aminosäuren

Glycin Gly G	Alanin Ala A	Valin Val V	Leucin Leu L	Isoleucin Ile I
Prolin Pro P	Serin Ser S	Threonin Thr T	Cystein Cys C	Methionin Met M
Asparagin Asn N	Glutamin Gln Q	Lysin Lys K	Arginin Arg R	Aspartat Asp D
Glutamat Glu E	Phenylalanin Phe F	Tyrosin Tyr Y	Tryptophan Trp W	Histidin His H

Ab- kürzung	voller Name	hydrop hob	pos.	neg.	polar	gela- den	klein	aro mat.	ali phat.	IP	Masse
A	Ala	Alanin	X				X		(X)	6.11	89.09
C	Cys	Cystein	(X)							5.05	121.16
D	Asp	Asparaginsäure		X	X	X				2.85	133.10
E	Glu	Glutaminsäure		X	X	X				3.15	147.13
F	Phe	Phenylalanin	X					X		5.49	165.19
G	Gly	Glycin	((X))				X		(X)	6.06	75.07
H	His	Histidin	((X))	X		X	X			7.60	155.16
I	Ile	Isoleucin	X						X	6.05	131.17
K	Lys	Lysin	((X))	X		X				9.60	146.19
L	Leu	Leucin	X						X	6.01	131.17
M	Met	Methionin	X							5.74	149.21
N	Asn	Asparagin			X					5.41	132.12
P	Pro	Prolin	X							6.30	115.13
Q	Gln	Glutamin			X					5.65	146.15
R	Arg	Arginin		X	X	X				10.76	174.20
S	Ser	Serin			X		X			5.68	105.09
T	Thr	Threonin	((X))		X					5.60	119.12
V	Val	Valin	X						X	6.00	117.15
W	Trp	Tryptophan	X		X			X		5.89	204.23
Y	Tyr	Tyrosin	((X))		X			X		5.64	181.19

X. Literaturverzeichnis

1. Adams D. Hereditary and acquired amyloid neuropathies. *J Neurol* (2001) 248: 647-657
2. Alim MA, Yamadi S, Hossain S, Takeda K, Kozima M, Izumi T, Takashi I, Shinoda T. Structural relationship of κ -type light chains with AL amyloidosis: multiple deletions found in a V κ IV protein. *Clin Exp Immunol* (1999) 118: 344-348
3. Alloni A, Pellegrini C, Ragni T, Goggi C, D'Armini AM, Rinaldi M, Vigano M. Heart transplantation in patients with amyloidosis: single-center experience. *Transplant Proc* (2004) 36: 643-644
4. Andersson K, Olofsson A, Nielsen EH, Svehag SE, Lundgren E. Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 294: 309-314
5. Aprile C, Marinone G, Saponaro R, Bonino C, Merlini G. Cardiac and pleuropulmonary AL amyloid imaging with technetium-99m labelled aprotinin. *Eur J Nucl Med* (1995) 22: 1393-1401
6. Argiles A, Garcia Garcia M, Mourad G. Phagocytosis of dialysis-related amyloid deposits by macrophages. *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17: 1136-1138
7. Bellotti V, Mangione P, Merlini G. Review: Immunoglobulin light chain amyloidosis – the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol* (2000) 130: 280-289
8. Bellotti V, Stoppini M, Mangione PP, Fornasieri A, Min L, Merlini G, Ferri F. Structural and functional characterization of three human immunoglobulin k light chains with different pathological implications. *Biochim Biophys Acta* (1996) 1317: 161-167
9. Benditt EP, Eriksen N, Berglund C. Congo red dichroism with dispersed amyloid fibrils, an extrinsic cotton effect. *Proc Natl Acad Sci USA* (1970) 66: 1044-1051
10. Benditt EP, Eriksen N. Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74: 4025-4028
11. Benson MD, Liepnieks JJ, Yazaki M, Yamashita T, Hamidi Asl K, Guenther B, Kluge-Beckerman B. A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics* (2001) 72: 272-277
12. Benson MD, Liepnieks J, Uemichi T, Wheeler G, Correa R. Hereditary renal amyloidosis associated with a mutant fibrinogen alpha-chain. *Nat Genet* (1993) 3: 252-255
13. Benson MD, Skinner M, Lian J, Cohen AS. „A“ protein of amyloidosis. Isolation of a cross-reacting component from serum by affinity chromatography. *Arthritis Rheum* (1975) 18: 315-322
14. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* (2001) 166: 6735-6741
15. Bohl J, Steinmetz H, Storkel S. Age-related accumulation of congophilic fibrillar inclusions in endocrine cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (1991) 419: 51-58
16. Brownstein MH, Helwig EB. The cutaneous amyloidosis I. Localized forms. *Arch Dermatol* (1970) 102: 8-19
17. Buxbaum J, Gallo G. Nonamyloidotic monoclonal immunoglobulin deposition disease. Light-chain, heavy-chain, and light- and heavy-chain deposition diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* (1999) 13: 1235-1248
18. Buxbaum JN, Genega EM, Lazowski P, Kumar A, Tunick PA, Kronzon I, Gallo GR. Infiltrative nonamyloidotic monoclonal immunoglobulin light chain cardiomyopathy: an underappreciated manifestation of plasma cell dyscrasias. *Cardiology* (2000) 93: 2290-2298

19. Buxbaum JN, Tagoe CE. The genetics of the amyloidoses. *Ann Rev Med* (2000) 51: 543-569
20. Buxbaum JN. Abnormal immunoglobulin synthesis in monoclonal immunoglobulin light chain and light and heavy chain deposition disease. *Amyloid* (2001) 8: 84-93
21. Buxbaum JN. The systemic amyloidoses. *Curr Opin Rheumatol* (2004) 16: 67-75
22. Calkins E. Amyloidosis of the skin. In: Fitzpatrick TB (ed) *Dermatology in general medicine*, McGraw-Hill, New York (1970) 1655-1666
23. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* (1997) 350: 134-138
24. Cattoretti G, Orazi A, Gerdes J. Proliferating normal bone marrow cells do stain for Ki-67 antigen. *Br J Haematol* (1993) 85: 835-836
25. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas type 2 diabetes. *Diabetes Res* (1988) 9: 151-159
26. Cohen AS, Calkins E. Electron microscope observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* (1959) 183: 1202-1203
27. Cohen AS, Calkins E. The isolation of amyloid fibrils and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. *J Cell Biol* (1964) 21:481-486
28. Cohen AS, Connors LH. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* (1987) 151:1-10
29. Cohen DH, Feiner H, Jensson O, Frangione B. Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein, gamma trace. *J Exp Med* (1983) 158: 623-628
30. Comenzo LR, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V_L germ line use and clonal plasma cell burden. *Blood* (2001) 98: 714-720
31. Comenzo RL, Gertz MA. Autologous stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis. *Blood* (2002) 99: 4276-4282
32. Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, Sanchowala V, Reisinger J, Dubrey S, Dember LM, Berk JL, Akpek G, LaValley M, O'hara C, Arkin CF, Wright DG, Skinner M. Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL (amyloid light-chain) amyloidosis: survival and response in 25 patients. *Blood* (1998) 91: 3662-3670
33. Cooper JH. Selective amyloid staining as a function of amyloid composition and structure. Histochemical analysis of the alkaline Congo red, standardized toulidine blue, and iodine methods. *Lab Invest* (1974) 31: 232-238
34. Costa PP, Cigueira AS, Bravo FR. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* (1978) 75: 4499-4503
35. Cotman SL, Halfter W, Cole GJ. Agrin binds to beta-amyloid (Abeta), accelerates abeta fibril formation, and is localized to Abeta deposits in Alzheimer's disease brain. *Mol Cell Neurosci* (2000) 15: 183-198
36. Crawford F, Soto C, Suo Z, Fang C, Parker T, Sawar A, Frangione B, Mullan M. Alzheimer's beta-amyloid vasoactivity: identification of a novel beta-amyloid conformational intermediate. *FEBS Lett* (1998) 436: 445-448
37. Czerny A. Zur Kenntnis der glykogenen und amyloiden Entartung. *Naunyn-Schmiedbergs Arch Exp Path Pharmak* (1893) 31: 190
38. Dezutter NA, Landman WJ, Jager PL, de Groot TJ, Dupont PJ, Tooten PC, Zekarias B, Gruys E, Verbruggen A. Evaluation of 99mTc-MAMA-chrysamine G as an in vivo probe for amyloidosis. *Amyloid* (2001) 8: 202-214
39. Diringier H, Gelderblom H, Hilmert H, Ozel M, Edelbluth C, Kimberlin RH. Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* (1983) 306: 476-478

40. Dische FE, Wernstedt C, Westermark GT, Westermark P, Pepys MB, Rennie JA, Gilbey SG, Watkins PJ. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologica* (1988) 31: 158-161
41. Dispenzieri A, Kyle RA, Lacy MQ, Therneau TM, Larson DR, Plevak MF, Rajkumar SV, Fonseca R, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA, Zeldenrust SR, Snow DS, Haymann SR, Litzow MR, Gastineau DA, Tefferi A, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Porrata LF, Elliot MA, Gertz MA. Superior survival in primary systemic amyloidosis in patients undergoing peripheral blood stem cell transplantation: a case-control study. *Blood* (2004) 103: 3960-3963
42. Divry P, Florquin M. Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C R Soc Biol* (1927) 97 : 1808-1810
43. Domagk G. Untersuchungen des RES für die Vernichtung von Infektionserregern und für die Entstehung von Amyloid. *Virchows Arch Pathol Anat* (1924) 253: 595
44. Drüecke TB. Beta2-microglobulin and amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* (2000) 1: 17-24
45. Eanes ED, Glenner GG. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* (1968) 16: 673-677
46. Eckerskorn C, Lottspeich F: Combination of two-dimensional gel electrophoresis with microsequencing and amino acid composition analysis: Improvement of speed and sensitivity in protein characterization. *Electrophoresis* (1990) 11: 554-661
47. Engvig JP, Olsen KE, Gislefoss RE, Sletten K, Wahlstrom O, Westermark P. Constant region of a kappa III immunoglobulin light chain as a major AL-amyloid protein. *Scand J Immunol* (1998) 48: 92-98
48. Ericzon BG, Suhr O, Broome U, Holmgren G, Duraj F, Eleborg L, Wikstrom L, Norden G, Friman S, Groth CG. Liver transplantation halts the progress of familial amyloidotic polyneuropathy. *Transplant Proc* (1995) 27: 1233
49. Eriksson L, Westermark P. Age-related accumulation of amyloid inclusions in adrenal cortical cells. *Am J Pathol* (1990) 136: 461-466
50. Eulitz M, Linke RP. Amyloid fibrils derived from V-region together with C-region fragments from a lambda-immunoglobulin light chain (HAR). *Biol Chem Hoppe Seyler* (1985) 336: 907-915
51. Eulitz M, Linke RP. The precursor molecule of a V lamda II-immunoglobulin light chain-derived amyloid fibril protein circulates precleaved. *Biochem Biophys Res Commun* (1993) 194: 1427-1434
52. Eulitz M, Linke RP: An unusual insertion in the third hypervariable region of a human bence-jones protein (Mev.). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* (1982) 363: 1347-1358
53. Eulitz M, Weiss DT, Solomon A. Immunoglobulin heavy-chain-associated amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 6542-6546
54. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* (1997) 337: 898-909
55. Floege J, Schaffer J, Koch KM. Scintigraphic methods to detect beta2-microglobulin associated amyloidosis (Abeta2-microglobulin amyloidosis). *Nephrol Dial Transplant* (2001) 16 Suppl: 12-16
56. Foss GS, Nilsen R, Cornwell III GG, Husby G, Sletten K. A glycosylated bence jones protein and its autologous amyloid light chain containing potentially amyloidogenic residues. *Scan J Immunol* (1998) 47: 348-354
57. Friedreich N, Kekulé A. Zur Amyloidfrage. *Virch Arch Pathol Anat Physiol* (1859) 16:50
58. Fujimoto N, Yajima M, Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A, Hata Y, Enomoto U, Konohana I, Wachi H, Seyama Y. Advanced glycation end product-modified beta2-

- microglobulin is a component of amyloid fibrils of primary localized cutaneous nodular amyloidosis. *J Invest Dermatol* (2002) 118: 479-484
59. Furumoto H, Shimizu T, Asagami C, Muto M, Takahashi M, Hoshii Y, Ishihara T, Nakamura K. Apolipoprotein E is present in primary localized cutaneous amyloidosis. *J Invest Dermatol* (1998) 111: 417-421
 60. Gallo GR, Feiner HD, Katz LA, Feldman GM, Correa EB, Chuba JV, Buxbaum JN. Nodular glomerulopathy associated with nonamyloidotic kappa light chain deposits and excess immunoglobulin light chain synthesis. *Am J Pathol* (1980) 99: 621-644
 61. Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura NH, Ghiso J, Frangione B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am J Pathol* (1994) 145: 526-530
 62. Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunitomo T, Kataoka H, Suzuki M, Hirasawa Y, Shirahama T et al. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* (1985) 129: 701-706
 63. Gellermann GP, Appel TR, Tannert A, Radestock A, Hortschansky P, Schroeckh V, Leisner C, Lütkepohl T, Shtrasburg S, Röcken C, Pras M, Linke RP, Diekmann S, Fändrich M. Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci* (2005) 102: 6297-6302
 64. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Amyloidosis. *Hematol Oncol Clin North Am* (1999) 13: 1211-1233, ix. Review.
 65. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Amyloidosis: recognition, confirmation, prognosis, and therapy. *Mayo Clin Proc* (1999) 74: 490-494
 66. Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Greipp PR, Witzig TE, Kyle RA. Prospective randomized trial of melphalan and prednisone versus vincristine, carmustine, melphalan, cyclophosphamide, and prednisone in the treatment of primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* (1999) 17: 262-267
 67. Gertz MA, Li CY, Shirahama T, Kyle RA. Utility of subcutaneous fat aspiration for the diagnosis of systemic amyloidosis (immunoglobulin light chains). *Arch Intern Med* (1988) 148: 929-933
 68. Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases (1986) 136: 548-554
 69. Ghiso JA, Holton J, Miravalle L, Calero M, Lashley T, Vidal R, Houlden H, Wood N, Neubert TA, Rostagno A, Plant G, Revesz T, Frangione B. Systemic amyloid deposits in familial British dementia. *J Biol Chem* (2001) 276: 43909-43914
 70. Gillmore JD, Davies J, Iqbal A, Madhoo S, Russell NH, Hawkins PN. Allogenic bone marrow transplantation for systemic AL amyloidosis. *Br J Haematol* (1998) 100: 226-228
 71. Glenner G, Harada M, Isersky C, Cuatrecasas P, Page D, Keiser H. Human amyloid protein: diversity and uniformity. *Biochem Biophys Res Commun* (1970) 41: 1013-1019
 72. Glenner GG, Eanes ED, Bladen HA, Linke RP, Termine JD. Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J Histochem Cytochem* (1974) 22: 1141-1158
 73. Glenner GG, Ein D, Eanes ED, Bladen HA, Terry W, Page DL. Creation of „amyloid“ fibrils from Bence Jones proteins in vitro. *Science* (1971) 174: 712-714
 74. Glenner GG, Harbaugh J, Ohma JI, Harada M, Cuatrecasas P. An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *Biochem Biophys Res Commun* (1970) 41: 1287-1289
 75. Glenner GG, Terry W, Harada M, Isersky C, Page D. Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science* (1971) 172: 1150-1151

76. Glenner GG, Wong CW, Quarantana V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* (1984) 2: 357-369
77. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) 120: 885-890
78. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med* (1980) 302: 1333-43
79. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med* (1980) 302: 1283-92
80. Goni F, Chuba J, Buxbaum J, Frangione B. A double monoclonal IgG1 kappa and IgG2 kappa in a single myeloma patient. Variation in clonal products and therapeutic responses. *J Immunol* (1988) 140: 551-557
81. Gono T, Matsuda M, Shimojima Y, Ishii W, Koyama J, Sakashita K, Koike K, Hoshii Y, Ikeda SI. VAD with or without subsequent high-dose melphalan followed by autologous stem cell support in AL amyloidosis: Japanese experience and criteria for patient selection. *Amyloid: J Prot Fold Disord* (2004) 11: 245-256
82. Gottron HA: Amyloidosis cutis nodularis atrophicans diabetica. *DMW* (1950) 75: 19-24
83. Gruber AD, Linke RP. Generalised AA-amyloidosis in a bat (*Pipistrellus pipistrellus*). *Vet Pathol* (1996) 33: 428-430
84. Haggqvist B, Naslund J, Sletten K, Westermark GT, Mucchiano G, Tjernberg LO, Nordstedt C, Engstrom U, Westermark P. Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 8669-8674
85. Haltia M, Prelli F, Ghiso J, Kiuru S, Somer H, Palo J, Frangione B. Amyloid protein in familial amyloidosis (Finnish type) is homologous to gelsolin, an actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1990) 167: 927-932
86. Hamilton JA, Steinrauf LK, Liepnieks J, Benson MD, Holmgren G, Sandgren O, Steen L. Alteration in molecular structure which results in disease: the Met-30 variant of human plasma transthyretin. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1139(1-2): 9-16
87. Hammarstrom P, Jiang X, Hurshman AR, Powers ET, Kelly JW. Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99 Suppl 4: 16427-16432
88. Harper JD, Lansbury PT Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* (1997) 66: 385-407
89. Hawkins PN. Diagnosing and monitoring of amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol* (1994) 8: 635-659
90. Hawkins PN. Studies with radiolabelled serum amyloid p component provide evidence for turnover and regression of amyloid deposits in vivo. *Clin Sci (Lond)* (1994) 87: 289-295
91. Hazenberg BP, van Rijswijk MH. Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol* (1994) 8: 661-690
92. Herbert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* (2003) 60: 1119-1122
93. Higuchi K, Yonezu T, Kogishi K, Matsumura A, Takeshita S, Higuchi K, Kohno A, Matsushita M, Hosokawa M, Takeda T. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apoSASSAM) from mouse serum. apoSASSAM is an apoA-II apolipoprotein of mouse high density lipoproteins. *J Biol Chem* (1986) 261: 12834-12840

94. Higuchi K, Yonezu T, Tsunasawa S, Sakiyama F, Takeda T. The single proline-glutamine substitution at position 5 enhances the potency of amyloid fibril formation of murine apo A-II. *FEBS Lett* (1986) 207: 23-27
95. Hilschmann N, Craig LC. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* (1965) 53: 1403-1409
96. Hinton DR, Polk RK, Linse KD, Weiss MH, Kovacs K, Garner JA. Characterization of spherical amyloid protein from a prolactin-producing pituitary adenoma. *Acta Neuropathol (Berl)* (1997) 93: 43-49
97. Holck M, Husby G, Sletten K, Natvig JB. The amyloid P-component (protein AP): an integral part of the amyloid substance? *Scand J Immunol* (1979) 10: 55-60
98. Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN et al. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* (1993) 341: 1113-1116
99. Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91: 5446-5450
100. Husby G, Sletten K. Chemical and clinical classification of amyloidosis 1985. *Scand J Immunol* (1986) 23: 253-265
101. Husby G, Stenstad T, Magnus JH, Sletten K, Nordvag BY, Marhaug G: Interaction between circulating amyloid fibril protein precursors and extracellular tissue matrix components in the pathogenesis of systemic amyloidosis. *Clin Immunol Immunopathol* (1994) 70: 2-9
102. Husby G. A chemical classification of amyloid. Correlation with different clinical types of amyloidosis. *Scand J Rheumatol* (1980) 1: 60-64
103. Hyman BT: Down syndrome and Alzheimer disease. *Prog Clin Biol Res* (1992) 379: 123-142
104. Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. *Neurology* (2002) 58: 1001-1007
105. Inoue S, Kisilevsky R. A high resolution ultrastructural study of experimental murine AA amyloid. *Lab Invest* (1996) 74: 670-683
106. Inoue S, Kuroiwa M, Ohashi K, Hara M, Kisilevsky R. Ultrastructural organization of hemodialysis-associated beta(2)-microglobulin amyloid fibrils. *Kidney Int* (1997) 52: 1543-1549
107. Inoue S, Kuroiwa M, Saraiva MJ, Guimaraes A, Kisilevsky R. Ultrastructure of familial amyloid polyneuropathy amyloid fibrils: Examination with high-resolution electron microscopy. *J Struct Biol* (1998) 124: 1-12
108. Janeway CA, Travers P. *Immunologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1997) Abschnitt 3.11, S. 97
109. Jiang X, Myatt E, Lycos P, Stevens FJ. Interaction between glycosaminoglycans and immunoglobulin light chains. *Biochemistry* (1997) 36: 13187-13198
110. Johansson B, Wernstedt C, Westermark P. Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* (1987) 148: 1987-1992
111. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottman KS, Foeller C. *Sequences of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda), 5th Ed. (1991)
112. Kakani RS, Goldstein AE, Meisher I, Hoffman C. Nodular amyloidosis: case report and literature review. *J Cutan Med Surg* (2001) 5: 101-104
113. Kaplan B, Murphy LM, Ratner V, Pras M, Weiss DT, Solomon A. Micro-method to isolate and purify amyloid proteins for chemical characterization. *Amyloid: J Protein Folding Disord* (2001) 8: 22-29

114. Kedar I, Ravid M, Sohar E. In vitro synthesis of “amyloid” fibrils from insulin, calcitonin and parathormone. *Isr J Med Sci* (1976) 12: 1137-1140
115. Kirkitadze MD, Condron MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *J Mol Biol* (2001) 312: 1103-1119
116. Kisilevsky R, Lemieux L, Boudreau L, Yang DS, Fraser P. New clothes for amyloid enhancing factor (AEF): silk as AEF. *Amyloid* (1999) 6: 98-106
117. Kisilevsky R. Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor and amyloid deposition. *J Int Med* (1992) 232: 515-516
118. Kisilevsky R. Review: amyloidogenesis – unquestioned answers and unanswered questions. *J Struct Biol* (2000) 130: 99-108
119. Klein R, Jaenichen R, Zachau HG. Expressed human immunoglobulin k genes and their hypermutation. *Eur J Immunol* (1993) 23: 3248-3271
120. Klintworth GK, Valnickova Z, Kielar RA, Baratz KH, Campbell RJ, Enghild JJ. Familial subepithelial corneal amyloidosis - a lactoferrin-related amyloidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1997) 38: 2756-2763
121. Kluve-Beckerman B, Manaloor J, Liepnieks JJ. Binding, trafficking and accumulation of serum amyloid A in peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* (2001) 53: 393-400
122. Kobayashi H, Hashimoto K. Amyloidogenesis on organ-limited cutaneous amyloidosis: an antigenic identity between epidermal keratin and skin amyloid. *J Invest Dermatol* (1983) 80: 66
123. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975) 256: 495-497
124. Korvatska E, Henry H, Mashima Y, Yamada M, Bachmann C, Munier FL, Schorderet DF. Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato-epithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein. *J Biol Chem* (2000) 275: 11465-11469
125. Krüger M, Altland K, Linke RP, Maschek H, Ringe B, Oehler G, Pichlmayr R, Manns MP. Liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy. Case report and review of the literature. *Internist (Berl.)* (1997) 38: 692-700
126. Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* (2002) 122: 2026-2031
127. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Skovronsky DM, Zhang B, Gur TL, Trojanowski JQ, Lee VM, Kung HF. Radioiodinated styrylbenzene derivatives as potential SPECT imaging agents for amyloid plaque detection in Alzheimer’s disease. *J Mol Neurosci* (2002) 19: 7-10
128. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Zhang B, Skovronsky D, Trojanowski JQ, Lee VM, Kung HF. IMPY: an improved thoflavin-T derivative for in vivo labeling of beta-amyloid plaques. *Brain Res* (2002) 956: 202-210
129. Kunisada T, Higuchi K, Aota S, Takeda T, Yamagishi H. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for murine senile amyloid protein: nucleotide substitutions found in apolipoprotein A-II cDNA of senescence accelerated mouse (SAM). *Nucleic Acids Res* (1986) 14: 5729-5740
130. Kyle RA, Bayrd ED. Amyloidosis: review of 236 cases. *Medicine (Baltimore)* (1975) 54: 271-299
131. Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA, Lacy MO, Therneau TM. A trial of three regimens for primary amyloidosis: colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone and colchicine. *N Engl J Med* (1997) 336: 1202-1207

132. Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Therneau TM. Long-term survival (10 years or more) in 30 patients with primary amyloidosis. *Blood* (1999) 93: 1062-1066
133. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* (1995) 32: 45-59
134. Kyle RA, Gertz MA. Systemic amyloidosis. *Crit Rev Oncol Hematol* (1990) 10: 49-87
135. Kyle RA, Greipp PR. Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases. *Mayo Clin Proc* (1983) 58: 665-683
136. Kyle RA, Linos A, Beard CM, Linke RP, Gertz MA, O'Fallon WM, Kurland LT. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood* (1992) 79: 1817-1822.
137. Kyle RA, Lust JA. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Semin Hematol* (1989) 26: 176-200
138. Kyle RA. Amyloidosis. *Circulation* (1995) 91: 1269-1271
139. Kyle RA. Benign monoclonal gammopathy -- after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* (1993) 68: 26-36
140. Ladewig P. Double-refringence of the amyloid-congo-red-complex. *Nature* (1945) 156: 81-82
141. Laemmli LK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227: 680-685
142. Lansbury PT Jr. Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 3342-3344
143. Lashuel HA, Lai Z, Kelly JW. Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry* (1998) 37: 17851-17864
144. Le PT, Muller MT, Mortensen RF. Acute phase reactants of mice. I. Isolation of serum amyloid P-component (SAP) and induction by a monokine. *J Immunol* (1982) 129: 665-672
145. Lee VW, Calderone A, Falk RH, Rubinow A, Cohen AS. Comparison of Tc 99m pyrophosphate and methylene diphosphate for detection of soft tissue amyloidosis. *Radiology* (1983) 148: 239-242
146. Lee VW, Ngai S, Skinner M, Cohen AS. Renal amyloidosis: evaluation using gallium scan. *Clin Nuclear Med* (1986) 11: 642-646
147. Lefranc MP. IGK (Immunoglobulin Kappa). IGL (Immunoglobulin Lambda). IGH (Immunoglobulin Heavy). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. July 2002. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/IgKID17.html>
<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/IgLID54.html>
<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/IgHID40.html>
148. Levin M, Franklin EC, Frangione B, Pras M. The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J Clin Invest* (1972) 51: 2773-2776
149. Lie JT, Hammond PI. Pathology of the senescent heart: anatomic observations on 237 autopsy studies of patients 90 to 105 years old. *Mayo Clin Proc* (1988) 63: 552-564
150. Liepnieks JJ, Benson MD, Dwulet FE. In: *Amyloid and Amyloidosis*. Natvig JB (ed). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands (1990) pp. 153-156
151. Lim A, Makhov AM, Bond J, Inouye H, Connors LH, Griffith JD, Erickson BW, Kirschner DA, Costello CE. Betabellins 15D and 16D, de Novo designed beta-sandwich proteins that have amyloidogenic properties. *J Struct Biol* (2000) 130: 363-370
152. Lin J, Markowitz GS, Valeri AM, Kambham N, Sherman WH, Appel GB, D'Agati VD. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum. *J Am Soc Nephrol* (2001) 1482-1492

153. Linke RP, Gärtner HV, Michels H. High sensitivity diagnosis of AA-amyloidosis using Congo red and immunohistochemistry detects missed amyloid deposits. *J Histochem Cytochem* (1995) 43: 863-869
154. Linke RP, Gerhard L, Lottspeich F. Brain-restricted amyloidoma of immunoglobulin lambda-light chain origin clinically resembling multiple sclerosis. *Biol Chem Hoppe Seyler* (1992) 373: 1201-1209
155. Linke RP, Hampl H, Lobeck H, Ritz E, Bommer J, Waldherr R, Eulitz M. Lysine-specific cleavage of β_2 -microglobulin in amyloid deposits associated with hemodialysis. *Kidney Int* (1989) 36: 675-681
156. Linke RP, Heilmann KL, Nathrath WBJ, Eulitz M. Identification of amyloid-A protein in a sporadic Muckle-Wells syndrome. N-terminal amino acid sequence analysis after isolation from formalin-fixed tissue. *Lab Invest* (1983) 48: 698-704
157. Linke RP, Hus R. Hydrophobic properties of an amyloidogenic Bence Jones protein fragment in charge shift electrophoresis. *Biol Chem Hoppe Seyler* (1992) 373: 635-640
158. Linke RP, Joswig R, Murphy CL, Wang S, Zhou H, Gross U, Rocken C, Westermark P, Weiss DT, Solomon A. Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I. *J Lab Clin Med* (2005) 145: 187-193
159. Linke RP, Nathrath WBJ, Eulitz M. Classification of amyloid syndromes from tissue sections using antibodies against various amyloid fibril proteins: Report of 142 cases. In: *Amyloidosis*. Glenner GG, Osserman EF, Benditt EP, Calkins E, Cohen AS, Zucker-Franklin D (eds). Plenum, New York (1986) pp 599-605
160. Linke RP, Oos R, Wiegel NM, Nathrath WBJ. Classification of amyloidosis: Misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it. *Acta histochemica* (2006) 108: 197-208
161. Linke RP, Schaeffer J, Gielow P, Lindner P, Lottspeich F, Plückthun A, Weiss EH. Production of recombinant beta2-microglobulin for the scintigraphic diagnosis of amyloidosis in uremia and hemodialysis. *Eur J Biochem* (2000) 267: 627-633
162. Linke RP, Sipe JD, Pollock PS, Ignaczak TF, Glenner GG. Isolation of a low-molecular-weight serum component antigenically related to an amyloid fibril protein of unknown origin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72: 1473-1476
163. Linke RP, Tischendorf FW, Zucker-Franklin D, Franklin EC. The formation of amyloid-like fibrils in vitro from Bence Jones Proteins of the Vlamdal subclass. *J Immunol* (1973) 111: 24-26
164. Linke RP, Voigt C, Storkel FS, Eulitz M. N-terminal amino acid sequence analysis indicates that isolated atrial amyloid is derived from atrial natriuretic peptide. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* (1988) 55: 125-127
165. Linke RP, Zucker-Franklin D, Franklin ED. Morphologic, chemical, and immunologic studies of amyloid-like fibrils formed from Bence Jones Proteins by proteolysis. *J Immunol* (1973) 111: 10-23
166. Linke RP. Amphiphilic properties of the low molecular weight component of serum amyloid-A protein shown by charge-shift electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* (1981) 668: 388-396
167. Linke RP. Amyloidosen. In: „Klinische Immunologie“. Peter HH und Pichler WJ (eds). Urban & Schwarzenberg, Munich, Vienna, Baltimore (1996) pp 822-833
168. Linke RP. Amyloidosen, insbesondere Amyloidosen bei monoklonaler Gammopathie. In: *Empfehlungen zur Diagnostik Therapie und Nachsorge Multiples Myelom*. Schriftenreihe des Tumorzentrums München (1998) 321-336
169. Linke RP. Die Amyloidosen. Pathogenetisch exakte Klassifizierung und Möglichkeit einer Amyloid-spezifischen Therapie. *Nieren-Hochdruckkrh* (1987) 16: 144-152
170. Linke RP. Die experimentelle Erzeugung einer Amyloidose. *Z Ges Exp Med* (1969) 150: 150-160

171. Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch* (2000) 436: 439-448
172. Linke RP. Immunchemical investigation on serum amyloid A (SAA). Temperature-induced changes of its quaternary structure. In: *Amyloid and Amyloidosis*. Glenner GG et al. (eds). Amsterdam (1980) pp. 313-319
173. Linke RP. Immunochemical typing of amyloid deposits after microextraction from biopsies. *Appl Pathol* (1985) 3: 18-28
174. Linke RP. Immunohistochemical identification and cross reactions of amyloid fibril proteins in senile heart and amyloid in familial polyneuropathy. *Clin Neuropathol* (1982) 1: 172-182
175. Linke RP. Immunologische Techniken. In: *Bioanalytik*. Lottspeich F, Zorbas H (eds). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Berlin 1. Auflage (1998) pp 67-102
176. Linke RP. Monoclonal antibodies against amyloid fibril protein AA. Production, specificity and use for immunohistochemical localization and classification of AA-type amyloidosis. *J Histochem Cytochem.* (1984) 32: 322-328
177. Linke RP. Severe problems in diagnosing amyloid disease. *Acta Histochem* (2003) 105: 373-375
178. Linke RP. Therapy of amyloid diseases. *Ren Fail* (1993) 15: 395-400
179. Lottspeich F. Proteinsequenzanalyse. In: *Bioanalytik*. Lottspeich F, Zorbas H (eds) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Berlin 1. Auflage (1998) pp 297-322
180. Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99: 6979-6984
181. Magnus JH, Stenstad T, Husby G, Kolset SO. Isolation and partial characterization of heparan sulphate proteoglycans from human hepatic amyloid. *Biochem J* (1992) 288: 225-231
182. Mambule C, Ando Y, Anan I, Holmgren G, Sandgren O, Stigbrandt T, Tashima K, Suhr OB. Enhancement of AA-amyloid formation in mice by transthyretin amyloid fragments and polyethylene glycol. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1474: 331-336
183. Masouye I. Diagnostic screening of systemic amyloidosis by abdominal fat aspiration: an analysis of 100 cases. *Am J Dermatopathol* (1997) 19: 41-45
184. Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* (1985) 4: 2757-2763
185. Masters CL, Simms G, Weinmann NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82: 4245-4249
186. Maury CP, Alli K, Baumann M. Finnish hereditary amyloidosis. Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsoline. *FEBS Lett* (1990) 167: 927-932
187. Meeker T, Lowder J, Cleary ML, Stewart S, Warnke R, Sklar J, Levy R. Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotypic antibodies. *N Engl J Med* (1985) 312: 1658-1665
188. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE. Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* (1983) 306: 474-476
189. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol (Berl)* (1981) 54: 63-74
190. Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. *J Biol Chem* (2002) 277: 19213-19219

191. Michels H, Donini U, Linke RP. Resolution of AA amyloidosis in juvenile rheumatoid arthritis (JRA) as shown with computer-aided quantitation of amyloid. In: Amyloid and Amyloidosis. Kisilevsky R, Benson M, Frangione B, Gauldie J, Muckle T, Young I (eds). The Parthenon Publishing Group Ltd. Casterton Hall (1993) pp. 694-696.
192. Michels H, Linke RP. Clinical benefit of diagnosing incipient AA-amyloidosis in pediatric rheumatic diseases as estimated from a retrospective study. *Amyloid. Int J Exp Clin Invest* (1998) 5: 200-207
193. Missmahl HP, Hartwig H. Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloids substanz. *Virchows Arch, Path Anat* (1953) 324: 489-508
194. Mochizuki H, Kamakura K, Masaki T, Hirata A, Tokda T, Yazai M, Motoyoshi K, Ikeda S. Nodular cutaneous amyloidosis and carpal tunnel syndrome due to the amyloidogenic transthyretin His 114 variant. *Amyloid* (2001) 8: 105-110
195. Moon AO, Calamia KT, Walsh JS. Nodular amyloidosis: review and long-term follow-up of 16 cases. *Arch Dermatol* (2003) 139: 1157-1159
196. Murphy CL, Hrcic R, Williams TK, Weiss DT, Solomon A. A novel amyloid protein in a calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor. In: Amyloid and Amyloidosis. Bély M, Apáthy À (eds). Budapest: D. Apathy (2001) pp 422-423
197. Nelson SR, Hawkins PN, Richardson S, Lavender JP, Sethi D, Glower PE, Pugh CW. Imaging of hemodialysis-associated amyloidosis with I-123 serum amyloid P component. *Lancet* (1991) 338: 335-339
198. Nguyen TU, Oghalai JS, McGregor DK, Janssen NM, Huston DP. Subcutaneous nodular amyloidosis: a case report and review of the literature. *Hum Pathol* (2001) 32: 346-348
199. Nichols WC, Dwulet FE, Liepnieks J, Benson MD. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 156: 762-768
200. Niewold TA, Hol PR, van Andel AC, Lutz ET, Gruys E. Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest* (1987) 56: 544-549
201. Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. Heinz Höfler und Klaus-Michael Müller (eds). U&Fischer, München, Jena 1. Auflage (2000)
202. Odani S, Komori Y, Gejyo F. Structural analysis of the amyloidogenic kappa Bence Jones protein (FUR). *Amyloid* (1999) 6: 77-88
203. Ohashi K, Kisilevsky R, Yanagishita M. Affinity binding of glycosaminoglycans with beta(2)-microglobulin. *Nephron* (2002) 90: 158-168
204. Okazaki K, Moriyasu F, Shiomura T, Yamamoto T, Suzaki T, Kanematsu Y, Akasaka S, Kobashi Y. Spontaneous rupture of the spleen and liver in amyloidosis - a case report and review of the literature. *Gastroenterol Jpn* (1986) 21: 518-524
205. Olsen KE, Sletten K, Westermark P. Fragments of the constant region of immunoglobulin light chains are constituents of AL-amyloid proteins. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 251: 642-647
206. O'Nullain B, Wetzel R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *PNAS* (2002) 99: 1485-1490
207. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology, Vol.1: Immunochemistry. Weir DM (ed). 3rd ed. (1978) 19: 1
208. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog in Allergy* (1958) 5: 1-78
209. Pablos JL, Cogolludo V, Pinedo F, Carreira PE. Subcutaneous nodular amyloidosis in Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* (1993) 22: 250-251
210. Pace F, Gubitosi G, Giorgi A, Pulsoni A, Vaccaro F, Muscaritoli M, Cossi Fanelli F. Idiopathic AL amyloidosis and biclonal paraproteinemia: a case report and review of the literature. *Amyloid* (2001) 8: 215-219

211. Pascali E. Diagnosis and treatment of primary amyloidosis. *Crit Rev Oncol Hematol* (1995) 19: 149-181
212. Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL, Gallimore JR, Collins PM, Hohenester E. Amyloid P component: a critical review. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* (1997) 4: 274-295
213. Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty N, Nguyen O, Blake CC, Terry CJ, et al. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* (1993) 362: 553-557
214. Perfetti V, Ubbiali P, Vignarelli MC, Diegoli M, Fasani R, Stoppini M, Lisa A, Mangione P, Obici L, Arbustini E, Merlini G. Evidence that amyloidogenic light chains undergo antigen-driven selection. *Blood* (1998) 91: 2948-2954
215. Perz J, Schönland SO, Hundemer M, Linke RP, Zeier M, Ho AD, Goldschmidt H. High-dose melphalan with autologous stem cell transplantation after VAD induction chemotherapy for treatment of AL amyloidosis: a single centre prospective phase II study. *Brit J Haematol* (2004) 127: 543-551
216. Platz SJ, Breuer W, Geisel O, Linke RP, Hermanns W. Identification of λ light chain amyloid in eight canine and two feline extramedullary plasmocytomas. *J Comp Path* (1997) 116: 45-54
217. Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, Rimon A, Franklin EC. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest* (1968) 47: 924-933
218. Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* (1982) 21: 6942-6950
219. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles causes scrapie. *Science* (1982) 216 : 136-144
220. Puchtler H, Sweat F, Levine M. On the binding of congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem* (1962) 10: 355-364
221. Puille M, Altland K, Linke RP, Steen-Muller MK, Kielt R, Steiner D, Bauer R. ^{99m}Tc -DPD scintigraphy in transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2002) 29: 376-379
222. Ramstad HM, Sletten K, Husby G. The amino acid sequence and carbohydrate composition of an immunoglobulin kappa light chain amyloid fibril protein (AL) of variable subgroup I. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* (1995) 2: 223-228
223. Reimann HA, Koucky RF, Eklund CM. Primary amyloidosis limited to tissue of mesodermal origin. *Am J Pathol* (1935) 11: 977-988
224. Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic specimen in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101: 2817-2822
225. Rocken C, Saeger W, Linke RP. Several different types of amyloid in a 93-year-old female patient: case report of an autopsy case. *Pathologe* (1993) 14: 42-46
226. Rocken C, Schwotzer EB, Linke RP, Saeger W. The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice. *Histopathology* (1996) 29: 325-335
227. Roitt IM. Leitfaden der Immunologie. Blackwell. Berlin, 4. Auflage (1993) p 44
228. Romhanyi G. Selektive Darstellung sowie methodologische Möglichkeiten der Analyse ultrastruktureller Unterschiede von Amyloidablagerungen. *Zentralbl Allg Pathol* (1979) 123: 9-16
229. Rubinow A, Cohen AS. Skin Involvement in Generalized Amyloidosis. A Study of Clinically Involved and Uninvolved Skin in 50 Patients with Primary and Secondary Amyloidosis. *Ann Int Med* (1978) 88: 781-785
230. Ruzicka T, Donhauser G, Linke RP, Landthaler M, Bieber T. Cutaneous amyloidoses. *Hautarzt* (1990) 41: 245-255

231. Sadqi M, Hernandez F, Pan U, Perez M, Schaeberle MD, Avila J, Munoz V. Alpha-helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau-protein. *Biochemistry* (2002) 41: 7150-7155
232. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* (1996) 87: 746-755
233. Samdal IA, Sletten K, Olsen KE, Westermark P. AL 336 - a glycosylated protein of kappa 1b origin in a patient with systemic amyloidosis of predominantly non-parenchymatous distribution. *Amyloid: J Protein Folding Disord* (2001) 8: 111-114
234. Sanchorawala V, Wright DG, Seldin DC, Dember LM, Finn K, Falk RH, Berk J, Quillen K, Skinner M. An overview of the use of high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation for the treatment of AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant* (2001) 28: 637-642
235. Saraiva MJ, Costa PP, Goodman DS. Studies on plasma transthyretin (prealbumin) in familial amyloidotic polyneuropathy, Portugese type. *J Lab Clin Med* (1983) 102: 590-603
236. Schachter H. Glycoproteins: their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clin Biochem* (1984) 17: 3-14
237. Schiffer M. Molecular anatomy and the pathological expression of antibody light chains. *Am J Pathol* (1996) 148: 1339-1344
238. Schormann N, Murrell JR, Liepnieks JJ, Benson MD. Tertiary structure of an amyloid immunoglobulin light chain protein: A proposed model for amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 9490-9494
239. Schröder R, Linke RP, Voges J, Heindel W, Sturm V. Intracerebral A lambda amyloidoma diagnosed by stereotactic biopsy. *Clin Neuropathol* (1995) 14: 347-350
240. Schröder R, Linke RP. Cerebrovascular involvement in systemic AA and AL amyloidosis: a clear haematogenic pattern. *Virchows Arch* (1999) 434: 551-560
241. Schröder R, Nennesmo I, Linke RP. Amyloid in a multiple sclerosis lesion is clearly of AL λ type. *Acta Neuropathol* (2000) 100: 709-711
242. Sepp N, Grünwald K, Soyer H-P, Kerl H, Breathnach SM, Fritsch P, Hintner H. Typisierung von Infiltratzellen bei primärer, lokalisierter, nodulärer, kutaner Amyloidose. *Hautarzt* (1992) 43: 210-214
243. Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97: 4897-4902
244. Shirahama T, Cohen AS. Intralysosomal formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol* (1975) 81: 101-116
245. Sipe JD, Cohen AS. Amyloidosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Fauci AS, Braunwald E et al. (eds). 14th edition. McGraw-Hill. New York (1998) pp 1856-1860
246. Sipe JD, Ignaczak TF, Pollock PS, Glenner GG. Amyloid fibril protein AA: purification and properties of the antigenically related serum component. *J Immunol* (1976) 116: 1151-1156
247. Skinner M, Cohen AS, Shirahama T, Cathcart ES. P-component (pentagonal unit) of amyloid: isolation, characterization, and sequence analysis. *J Lab Clin Med* (1974) 84: 604-614
248. Sletten K, Westermark P, Husby G. Structural studies of the variable region of immunoglobulin light-chain type amyloid fibril protein. In: Amyloidosis. Glenner GG, Osseman EFR, Benditt EP, Calkins E, Cohen AS, Zucker-Franklin D (eds). New York: Plenum Press (1986) pp 463-465
249. Sletten K, Westermark P, Natvig JB. Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J Exp Med* (1976) 143: 993-998

250. Sletten K, Westermark P, Natvig JB. Senile cardiac amyloid is related to prealbumin. *Scand J Immunol* (1980) 12: 503-506
251. Snow AD, Wight TN. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol Aging* (1989) 10: 481-497
252. Solomon A, Weiss DT, Murphy CL, Hrincic R, Wall JS, Schell M. Light chain-associated amyloid deposits comprised of a novel k constant domain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95: 9547-9551
253. Solomon A, Weiss DT, Pepys MB. Induction in mice of human light-chain-associated amyloidosis. *Am J Pathol* (1992) 140: 629-637
254. Sox HJ, Hood L. Attachment of carbohydrate to the variable region of myeloma immunoglobulin light chains. *Proc Natl Acad Sci USA* (1970) 66: 975-82
255. Steinberg AG, Milstein CP, McLaughlin CL, Solomon A. Immunogenetics (1974) 1: 108-117
256. Steinrauf LK, Chiang MY, Shiuan D. Molecular structure of the amyloid-forming protein kappa I Bre. *J Biochem* (1999) 125: 422-429
257. Sternberger LA. The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: *Immunocytochemistry*. Sternberger LA (ed). 2nd edition. Wiley, New York, (1979) pp 90-209
258. Stevens FJ, Myatt EA, Chang CH, Westholm FA, Eulitz M, Weiss DT, Murphy C, Solomon A, Schiffer M. A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains. *Biochemistry* (1995) 34: 10697-10702
259. Stevens FJ. Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* (2000) 7: 200-211
260. Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* (2003) 278: 11612-11622
261. Strege RJ, Saeger W, Linke RP. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidoses. Report of 43 cases in an unselected autopsy series. *Virchows Arch* (1998) 433: 19-27
262. Sub-Committee W-IN. Nomenclature of amyloid and amyloidosis. *Bull World Health Organ* (1993) 71: 105-112
263. Suess K, Moch H, Epper R, Koller A, Durmuller U, Mihatsch MJ. Heterogeneity of seminal vesicle amyloid. Immunohistochemical detection of lactoferrin and amyloid of the prealbumin-transthyretin type. *Pathologe* (1988) 19: 115-119
264. Tan SY, Pepys MB, Hawkins PN. Treatment of amyloidosis. *Am J Kidney Dis* (1995) 26: 267-285
265. Taniguchi Y, Yorioka N, Yamashita K, Oda H, Nie LF, Ye Yeu XF, Okushin S, Nishida Y, Kushihata S, Yamakido M. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in renal amyloidosis. *Hiroshima J Med Sci* (1996) 45: 11-14
266. Termine JD, Eanes ED, Ein D, Glenner GG. Infrared spectroscopy of human amyloid fibrils and immunoglobulin proteins. *Biopolymers* (1972) 11: 1103-1113
267. Terry WD, Page DL, Kimura S, Isobe T, Osserman EF, Glenner GG. Structural identity of Bence Jones and amyloid fibril proteins in a patient with plasma cell dyscrasia and amyloidosis. *J Clin Invest* (1973) 52: 1276-1281
268. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76: 4350-4354
269. Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Multiples Myelom, 1. Auflage 1998
270. Twort JM, Twort CC. Disease in relation to carcinogenic agents among 60.000 experimental mice. *J Pathol Bacteriol* (1932) 35: 219-242

271. van Gameren II, Hazenberg BP, Jager PL, Smit JW, Vellenga E. AL amyloidosis treated with induction chemotherapy with VAD followed by high dose melphalan and autologous stem cell transplantation. *Amyloid* (2002) 9: 165-174
272. Vassar PS, Culling CFA. Fluorescence stains, with special reference to amyloid and connective tissue. *Arch Pathol* (1959) 68: 487-489
273. Vidal R, Frangione B, Rostagno A, Mead S, Revesz T, Plant G, Ghiso J. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* (1999) 399: 776-781
274. Vidal R, Revesz T, Rostagno A, Kim E, Holton JL, Bek T, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Ghiso J, Frangione B. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97: 4920-4925
275. Vigushin O, Pepys MB, Hawkins PN. Comparison of histology with SAP scintigraphy for evaluation and amyloidosis. In: *Amyloid and Amyloidosis*. Kisilevski R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Jounq ID (eds). Parthenon Publ New York, London (1993) pp 685-687
276. Virchow R. Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz der chemischen Reaktion der Cellulose. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* (1854) 6: 135-137
277. Wally J, Kica G, Zhang Y, Ericsson T, Connors LH, Benson MD, Liepnieks JJ, Murray J, Skinner M, Comenzo RL. Identification of a novel substitution in the constant region of a gene coding for an amyloidogenic kappa 1 light chain. *Biochim Biophys Acta* (1999) 145: 49-56
278. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Codron MM, Teplow DB. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* (1997) 272: 22364-22372
279. Wang S, Sletten K, Westermark P. An unusual amino acid sequence of an AL-protein, AL-109, derived from a kappa I chain. *Amyloid: J Protein Folding Disord* (2001) 8: 274-276
280. Wanker EE. Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations. *Biol Chem* (2000) 381: 937-942
281. Watanabe S, Hilschmann N. The primary structure of a monoclonal kappa-type immunoglobulin L-chain of subgroup I (Bence-Jones Protein Hau): subdivision within subgroups. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* (1970) 351: 1291-1295
282. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. Amyloid fibril protein nomenclature – 2002. *Amyloid* (2002) 9: 197-200
283. Westermark P, Eizirik DL, Pipeleers DG, Hellerstrom C, Andersson A. Rapid deposition of amyloid in human islets transplanted into nude mice. *Diabetologia* (1995) 38: 543-549
284. Westermark P, Eriksson L, Engstrom U, Enestrom S, Sletten K. Prolactin-derived amyloid in the aging pituitary gland. *Am J Pathol* (1997) 150: 67-73
285. Westermark P, Mucchiano G, Marthin T, Johnson KH, Sletten K. Apolipoprotein A1-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* (1995) 147: 1186-1192
286. Westermark P, Natvig JB, Anders RF, Sletten K, Husby G. Coexistence of protein AA and immunoglobulin light-chain fragments in amyloid fibrils. *Scand J Immunol* (1976) 5: 31-36
287. Westermark P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG 3rd. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 2843-2845

288. Westermark P, Stenkvist B, Natvig JB, Olding-Stenkvist E. Demonstration of protein AA in subcutaneous fat tissue obtained by fine needle biopsy. *Ann Rheum Dis* (1979) 38: 68-71
289. Westermark P, Stenkvist B. A new method for the diagnosis of systemic amyloidosis. *Arch Intern Med* (1973) 132: 522-523
290. Westermark P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnsson KH. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am J Pathol* (1987) 127: 414-417
291. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson JH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) 84: 3881-3885
292. Widmer M, Reverdin E, Vesti B, Bollinger A, Linke RP, Burg G. Amyloidosis cutis nodularis atrophicans (Gottron). *Hautarzt* (1993) 44: 319-323
293. Wright JR, Calkins E, Humphrey RL. Potassium permanganate reaction in amyloidosis. A histologic method to assist in differentiating forms of this disease. *Lab Invest* (1977) 36: 274-281
294. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* (1970) 132: 211-250
295. Yokota T, Takashashi M, Ishihara T, Yamashita Y, Gondo T, Kawamura S, Hoshii Y, Koga M, Iwat T, Uchino F. Amyloid enhancing factor (AEF). Isolation and biochemical and pathological characteristics. *Acta Pathol Jpn* (1991) 41: 798-805
296. Yonezu T, Higuchi K, Tsunasawa S, Takagi S, Sakiyama F, Takeda T. High homology is present in the primary structures between murine senile amyloid protein (ASSAM) and human apolipoprotein A-II. *FEBS Lett* (1986) 203: 149-152
297. Yonezu T, Tsunasawa S, Higuchi K, Kogishi K, Haiki H, Hanada K, Sakiyama F, Takeda T. A molecular-pathologic approach to murine senile amyloidosis. Serum precursor-apolipoprotein A-II variant (Pro5----Gln) presents only in the senile amyloidosis-prone SAM-P/1 and SAM-P/2 mice. *Lab Invest* (1987) 57: 65-70
298. Zeier M, Perz J, Linke RP, Donini U, Waldherr R, Andrassy K, Ho AD, Goldschmidt H. No regression of renal AL amyloid in monoclonal gammopathy after successful autologous stem cell transplantation and significant clinical improvement. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2003) 18: 2644-2647
299. Zeldenrust S, Gertz M, Uemichi T, Bjornsson J, Wiesner J, Schwab T, Benson M. Orthotopic liver transplantation for hereditary fibrinogen amyloidosis. *Transplantation* (2003) 75: 560-561
300. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabilt S, Gatni J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial mediterranean fever. *N Engl J med* (1986) 314: 1001-1005

Danksagung

Ich danke dem Labor für Pathologie, Dr. med. E. van Almsick, Berlin, für die Zusendung von Gewebeschnitten der Patientin UNK.

Den behandelnden Ärzten am Virchow-Klinikum Berlin, v.a. Herrn Dr. Lars Mayer (wiss. Angestellter) möchte ich danken für die Überlassung von Sammelurin, Serumproben und Gewebeproben aus den entnommenen Amyloidknoten, sowie für die Kopie von Arztbriefen.

Der betreuenden Hausärztin Frau M. Gerstenmaier sowie dem betreuenden Neurologen Dr. J. Braun danke ich für die bereitwillige telefonische Auskunft bezüglich des aktuellen Krankheitsverlaufes.

Die Dünnschnitte der Gewebeproben der Patientin UNK wurden vom Institut für Pathologie des Virchow-Klinikums Berlin sowie von Herrn Dr. Geisel angefertigt, auch ihnen gilt mein herzlicher Dank.

Herrn Reinhard Mentele (MTA), MPI für Biochemie in Martinsried, Abt. Lottspeich, danke ich sehr für die Durchführung der HPLCs, der Proteinspaltung im Gel sowie die Proteinsequenzierung, für seine geduldige Einweisung in die wichtigsten Prinzipien der Auswertung von Rohdaten der Proteinsequenzierung, anregende Diskussionen sowie für sein großes persönliches Interesse daran, valides Datenmaterial zu liefern.

Herrn Dr. Kellermann, MPI für Biochemie in Martinsried, Abt. Lottspeich, danke ich für die Möglichkeit, auf die apparativen Voraussetzungen der Proteinsequenzierung und der Massenspektrometrie in seiner Abteilung zurückgreifen zu können, sowie für die Einweisung in den Gebrauch von Proteindatenbanken, Frau Dr. Mathes danke ich für die tryptische Spaltung von Proteinen im Gel.

Frau Monica Zabowa (MTA), MPI für Biochemie in Martinsried, Abt. Lottspeich, danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und ihre Einweisung in die Auswertung der dabei erhaltenen Daten.

Mein Dank gilt Frau Reinhild Joswig (MTA) für die Anleitung bei der Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen, sowie für ihre große Sorgfalt bei den immunhistochemischen Routinefärbungen, wo auch der Antikörper Anti-AL κ (UNK) zum Einsatz kommt.

Auch allen anderen MTA's des Labors, Frau Rosl Oos, Frau Johanna Lindermayer und Frau Margret Bandmann danke ich für die gute Atmosphäre im Labor, die ein angenehmes Arbeiten ermöglichte.

Frau Dr. chem. Edith Potthoff danke ich für die nette Zusammenarbeit beim gemeinsamen Erlernen grundlegender proteinbiochemischer Methoden zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Reinhold P. Linke möchte ich besonders danken für die Überlassung dieser klinisch interessanten und technisch vielseitigen Aufgabenstellung, für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit, viele Anregungen was Inhalt und Methodik betrifft, die stets unermüdlige Bereitschaft inhaltliche Gesichtspunkte dieser Arbeit kritisch zu diskutieren, sowie für die Vermittlung von grundsätzlichem Wissen über den Inhalt dieser Arbeit hinaus.

Lebenslauf

Natalie Marietta Wiegel
geb. am 09.05.1978 in Ingolstadt

Schulbildung: 1984 - 1988 : Grundschule Wettstetten
1988 - 1997 : Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt, 27.06.1997 Abitur

Studium: 11/1997 - 04/2004: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München,
23.04.2004 Abschluss mit dem 3. Staatsexamen

Beruf: 08/2004 - 09/2004 Ärztin im Praktikum,
seit 10/2004 Assistenzärztin an der Klinik für Visceral-, Gefäß-, und
Thoraxchirurgie des Hegau-Bodensee-Klinikums Singen (Chefarzt
Prof. Dr. med. D. Rühland), Virchowstraße 10, 78224 Singen a.H.
seit 10/2005 Assistenzärztin an der Klinik für vaskuläre und
endovaskuläre Chirurgie des Hegau-Bodensee-Klinikums Singen
(Chefarzt PD Dr. med. T. Pfeiffer), Virchowstraße 10, 78224 Singen
a.H.
seit 10/2006 Assistenzärztin an der Klinik für Allgemein-, Thorax-,
und Visceralchirurgie des Hegau-Bodensee-Klinikums Singen
(Chefarzt Prof. Dr. med. M. Gundlach), Virchowstraße 10, 78224
Singen a.H.

Promotion: seit März 1999 Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei
Prof. Dr. med. Reinhold P. Linke am Max-Planck-Institut für
Biochemie in Martinsried