

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Etablierung von h-FTAA als histochemisches Nachweisverfahren von  
ATTR-Amyloid im Karpaltunnelgewebe**  
**und**  
**Korrelation klinischer Patienteneigenschaften mit dem ATTR-Amyloidgehalt  
im Karpaltunnelgewebe**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Katharina Streit, geb. Hahn**  
aus **Preetz**

**Kiel 2018**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Seekamp, Klinik für  
Orthopädie und Unfallchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2020

zum Druck genehmigt, Kiel, den 02. Dezember 2019

gez.: Prof. Dr. med. C. Röcken  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

**Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
------------------------------------	----------

<b>ANMERKUNG .....</b>	<b>VI</b>
------------------------	-----------

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>1.1 Amyloid und Amyloidosen .....</b>	<b>1</b>
--	----------

1.1.1 Definition des Amyloids .....	1
-------------------------------------	---

1.1.2 Aufbau und Bestandteile des Amyloids .....	1
--	---

1.1.3 Übersicht über die verschiedenen Amyloidproteine .....	2
--	---

1.1.4 Pathophysiologie der Amyloidogenese .....	4
---	---

1.1.5 Epidemiologie der Amyloidosen .....	6
---	---

1.1.6 ATTR-Amyloidose .....	7
-----------------------------	---

1.1.6.1 Transthyretin .....	7
-----------------------------	---

1.1.6.2 Die erworbene ATTR-Amyloidose .....	8
---	---

1.1.6.3 Die hereditäre ATTR-Amyloidose .....	8
--	---

1.1.6.4 Therapie der ATTR-Amyloidosen .....	9
---	---

<b>1.2 Diagnostik und Klassifikation der Amyloidosen .....</b>	<b>10</b>
--	-----------

1.2.1 Diagnostik .....	10
------------------------	----

1.2.1.1 Kongorot-Färbung .....	11
--------------------------------	----

1.2.1.2 Thioflavin-Färbung .....	13
----------------------------------	----

1.2.1.3 h-FTAA-Färbung .....	14
------------------------------	----

1.2.1.3.1 LCPs und LCOs im Allgemeinen .....	14
--	----

1.2.1.3.2 h-FTAA im Speziellen .....	16
--------------------------------------	----

1.2.2 Klassifikation .....	17
----------------------------	----

1.2.2.1 Immunhistochemie .....	18
--------------------------------	----

1.2.2.2 Proteinbiochemie .....	18
--------------------------------	----

1.2.2.3 Molekularpathologie .....	18
-----------------------------------	----

<b>1.3 Das Karpaltunnelsyndrom .....</b>	<b>19</b>
--	-----------

1.3.1 Definition .....	19
------------------------	----

1.3.2 Anatomie und Pathophysiologie .....	19
---	----

1.3.3 Epidemiologie .....	20
---------------------------	----

1.3.4 Ätiologie .....	20
-----------------------	----

1.3.5 Symptome .....	21
----------------------	----

1.3.6 Diagnostik und Differenzialdiagnostik .....	22
---	----

1.3.7 Therapie .....	22
----------------------	----

1.3.8	Prognose und Komplikationen.....	23
1.3.9	Zusammenhang des Karpaltunnelsyndroms mit systemischer ATTR-Amyloidose.....	23
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Ethikvotum .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2</b>	<b>Material .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Chemikalien .....	26
2.2.2	Geräte .....	27
<b>2.3</b>	<b>Patientenkohorte .....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Kohorte A für die Korrelation der Patientendaten mit dem Amyloidgehalt .....	27
2.3.2	Kohorte B für den Vergleich der Färbungen h-FTAA, Kongorot und Anti-TTR .....	28
2.3.3	Kohorte C für den Vergleich des Amyloidgehalts in Resektaten aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels.....	28
<b>2.4</b>	<b>Histologie und Immunhistochemie .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Kongorot-Färbung für die digitale Bildanalyse .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>h-FTAA-Färbung .....</b>	<b>30</b>
<b>2.7</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8</b>	<b>Elastica-van-Gieson-Färbung.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9</b>	<b>Scanvorgang und Arealauswahl für den Vergleich der drei Färbungen .....</b>	<b>31</b>
<b>2.10</b>	<b>Quantifizierung des Amyloidgehalts für den Vergleich der drei Färbungen.....</b>	<b>32</b>
<b>2.11</b>	<b>Scanvorgang und ImageJ-Berechnung für die Korrelation zwischen Amyloidgehalt und klinischen Patienteneigenschaften .....</b>	<b>34</b>
<b>2.12</b>	<b>Vergleich des Amyloidgehalts in Resektaten aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels .....</b>	<b>35</b>
<b>2.13</b>	<b>Berechnung der Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome.....</b>	<b>35</b>
<b>2.14</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>36</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Methodenetablierung .....</b>	<b>37</b>
3.1.1	Die Verdünnung 1:500 der h-FTAA-Stammlösung eignet sich für die distinkte h-FTAA-Färbung.....	37
3.1.2	Die Modifikation der Kongorot-Färbung optimiert den Scanvorgang. ....	37
3.1.3	Die Kombination der Kongorot-Färbung mit der DAPI-Zellkernfärbung gelingt mittels eines DAPI-haltigen Eindeckmediums. ....	38
3.1.4	Die Anpassung der Scanner-Einstellungen Fokusfilter und Belichtungszeit erzeugt ein zufriedenstellendes Scan-Ergebnis. ....	38
3.1.5	Die Ermittlung der passenden Farbschwellenwerte im Programm ImageJ ermöglicht eine standardisierte Quantifizierung des Amyloidgehalts.....	41
3.1.6	Die Herstellung neuer Serienschritte ist nötig für den Vergleich der drei Färbungen in direkt aufeinanderfolgenden Arealen von Serienschritten.....	41
<b>3.2</b>	<b>Das Studiendesign in der Übersicht.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Im Vergleich mit der Kongorot- und der Anti-TTR-Färbung hat die h-FTAA-Färbung eine höhere Sensitivität für den Nachweis von Amyloid.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Die Quantifizierung des Amyloidgehalts in der Kohorte A ermöglicht die Korrelation mit den klinischen Patienteneigenschaften Alter, Geschlecht und anatomischer Lokalisation des Karpaltunnelsyndroms. ....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Mithilfe der Elastica-van-Gieson-Färbung erfolgte die Abklärung faser-artiger Strukturen in der Anti-TTR-, Kongorot- und h-FTAA-Färbung. ....</b>	<b>49</b>
<b>3.6</b>	<b>Vitronectin findet sich in ungefähr 50% einer ATTR-Amyloidablagerung.....</b>	<b>50</b>
<b>3.7</b>	<b>In den Resektaten der LCT-Kohorte lässt sich mehr ATTR-Amyloid nachweisen als in den Resektaten der KTS-Kohorte. ....</b>	<b>51</b>
<b>3.8</b>	<b>Die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome beträgt 11,66%.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Nachweis von Amyloid ist sensitiver mit h-FTAA als mit Kongorot. ....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Der immunhistochemisch nachweisbare Amyloid-Flächenanteil im Gewebe korreliert mit dem mittels Kongorot- oder h-FTAA-Färbung nachweisbaren Amyloid-Flächenanteil.....</b>	<b>56</b>

<b>4.3</b>	<b>Klinische Patienteneigenschaften korrelieren mit dem Amyloidgehalt.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Die ursprüngliche Lokalisation des entnommenen Gewebes ist in Hinblick auf den nachgewiesenen Amyloidgehalt relevant. ....</b>	<b>60</b>
<b>4.5</b>	<b>Die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome ist von klinischer Relevanz. ....</b>	<b>61</b>
<b>4.6</b>	<b>Studieneinschränkungen.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>I</b>
<b>7.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>7.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>7.3</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>III</b>
<b>7.4</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>IV</b>
<b>7.5</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>V</b>
7.5.1	Abstract.....	V
7.5.2	Kongressbeitrag.....	VI
7.5.3	Eigene Originalarbeiten.....	VII
<b>7.6</b>	<b>Akademischer Lebenslauf.....</b>	<b>VIII</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Anti-TTR:</b>	Anti-Transthyretin-Antikörper
<b>ATTR:</b>	Transthyretin-Amyloidose
<b>ATTRm:</b>	Hereditäre Transthyretin-Amyloidose
<b>ATTRwt:</b>	Wildtyp Transthyretin-Amyloidose
<b>CRF:</b>	Kongorot-Fluoreszenz
<b>DAPI:</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>FAP:</b>	Familiäre Amyloid-Polyneuropathie
<b>h-FTAA:</b>	Heptamere Formyl-Thiophen-Essigsäure ( <i>heptamer formyl thiophene acetic acid</i> )
<b>HSB:</b>	<i>Hue, Saturation, Brightness</i> (Farbwert, Sättigung, Helligkeit)
<b>HTAA:</b>	Hydrogen-Thiophen-Essigsäure ( <i>hydrogen thiophene acetic acid</i> )
<b>KTS:</b>	Karpaltunnelsyndrom, hier gezielt verwendet für bestimmte Resektate
<b>LCO:</b>	Lumineszierende konjugierte Oligothiophene ( <i>luminescent conjugated oligothiophene</i> )
<b>LCP:</b>	Lumineszierende konjugierte Polythiophene ( <i>luminescent conjugated polythiophene</i> )
<b>LCT:</b>	<i>Ligamentum carpi transversum</i>
<b>p-FTAA:</b>	Pentamere Formyl-Thiophen-Essigsäure ( <i>pentamer formyl thiophene acetic acid</i> )
<b>PTAA:</b>	Polythiophen-Essigsäure ( <i>polythiophene acetic acid</i> )
<b>ThS:</b>	Thioflavin S
<b>ThT:</b>	Thioflavin T
<b>TTR:</b>	Transthyretin

**Anmerkung**

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Verwendung einer geschlechterspezifischen Sprache verzichtet. Personenbezogene Formulierungen wurden in der maskulinen Form gehalten und schließen Angehörige jeder geschlechtlichen Identität mit ein.



## 1 Einleitung

### 1.1 Amyloid und Amyloidosen

#### 1.1.1 Definition des Amyloids

Der Begriff Amyloid bezeichnet pathologisch gefaltete, unlösliche und toxische Peptid- und Proteinaggregate, die eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen (Merlini & Bellotti, 2003). Im Folgenden werden Peptide und Proteine der Übersichtlichkeit halber unter dem Begriff Protein zusammengefasst. Bisher wurden 35 autologe physiologische Proteine identifiziert (siehe Tabelle 1), die Amyloid bilden und sich lokal oder systemisch in verschiedenen Geweben und Organen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär ablagern können (Chiti & Dobson, 2017; Sipe et al., 2016).

Amyloidosen sind die durch Amyloid verursachten Beeinträchtigungen der normalen Gewebe- und Organfunktionen. Die Diagnose erfolgt histologisch. Der polarisationsoptische Nachweis einer anomalen grün-gelben Polarisationsfarbe im kongorotgefärbten Gewebeschnitt ist spezifisch für das Vorliegen von Amyloid (Merlini & Bellotti, 2003).

#### 1.1.2 Aufbau und Bestandteile des Amyloids

Amyloidfibrillen verzweigen sich nicht, haben einen Durchmesser von 10-12 nm und sind von variabler Länge. Sie bestehen aus mehreren, mittels Wasserstoffbrückenbindungen umeinander gewobenen Protofilamenten, in denen die Amyloidproteine in einer  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen, sowohl mit paralleler als auch mit antiparalleler Ausrichtung. Die Protofilamente sind in sich leicht verdreht und haben je nach Ursprungprotein eine unterschiedliche Anzahl an  $\beta$ -Faltblättern als Rückgrat mit verschiedenen Seitenketten (Chiti & Dobson, 2006; Meinhardt & Fandrich, 2009). Diese prä-fibrillären Protofilamente können noch nicht mittels Kongorot nachgewiesen werden, üben aber bereits toxische Effekte auf das umliegende Gewebe aus und können Amyloidosen, wie zum Beispiel Alzheimer, Parkinson und Familiäre Amyloid-Polyneuropathie (FAP), verursachen (Chiti & Dobson, 2006; Faria et al., 2015; Hurshman et al., 2004; Sorgjerd et al., 2008).

Neben dem eigentlichen Amyloidprotein lassen sich regelhaft weitere Moleküle im Amyloid nachweisen. Amyloid-P-Komponente ist ein Glykoprotein, das sich im

Amyloid anreichert. Es verhindert möglicherweise die Proteolyse der Amyloidfibrillen. Weiterhin werden regelhaft hochsulfatierte Glykosaminoglykane und Proteoglykane (zum Beispiel Heparansulfat), Apolipoprotein E und verschiedene Bestandteile der interstitiellen Matrix (Kollagen Typ IV, Laminin, Perlecan und Vitronectin) im Amyloid nachgewiesen (Merlini & Bellotti, 2003).

### 1.1.3 Übersicht über die verschiedenen Amyloidproteine

Die Klassifikation der Amyloidosen erfolgt auf der Grundlage des Vorläuferproteins. Jedem Amyloidprotein können eine oder mehrere Formen der Amyloidose zugeordnet werden, die entweder lokal oder systemisch auftreten (Chiti & Dobson, 2017). Die Benennung der Amyloidosen ergibt sich dabei aus der Abkürzung für das Ursprungprotein, dem ein A für Amyloid vorangestellt ist. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die im Jahr 2016 bekannten Amyloidproteine:

Tabelle 1: Übersicht über die im Jahr 2016 bekannten Amyloidproteine (Sipe et al., 2016).

Protein	Vorläuferprotein	S/L	E/H	betroffene Organe/ausgelöste Krankheiten
AL	Immunglobulinleichtkette ( $\lambda$ oder $\kappa$ )	S, L	E, H	Alle Organe außer ZNS
AH	Immunglobulinschwerkette	S, L	E	Alle Organe außer ZNS
AA	(Apo) Serum-Amyloid-A	S	E	Alle Organe außer ZNS
ATTR	<b>Transthyretin, Wildtyp</b>	S	E	Herz, Ligamente, <b>Karpaltunnel</b>
	Transthyretin, Mutationsvarianten	S	H	PNS, ANS, Herz, Glaskörper, Leptomeningen, Niere
A $\beta$ 2M	$\beta$ 2-Mikroglobulin, Wildtyp	S	E	Muskuloskelettales System
	$\beta$ 2-Mikroglobulin, Mutationsvarianten	S	H	ANS, Herz
AApoA1	Apolipoprotein A-I, Mutationsvarianten	S	H	Herz, Leber, Niere, PNS, Hoden, Larynx, Haut
AApoAII	Apolipoprotein A-II, Mutationsvarianten	S	H	Niere, Herz
AApoAIV	Apolipoprotein A-IV, Wildtyp	S	E	Niere, Knochenmark, Herz
AApoCII	Apolipoprotein C-II, Mutationsvarianten	S	H	Niere
AApoCIII	Apolipoprotein C-III, Mutationsvarianten	S	H	Niere
AGel	Gelsolin, Mutationsvarianten	S	H	PNS, Kornea, Herz
ALys	Lysozym, Mutationsvarianten	S	H	Niere, Herz
ALECT2	Leukozyten-chemotaktischer Faktor 2	S	E	v.a. Niere
AFib	Fibrinogen $\alpha$ , Mutationsvarianten	S	H	v.a. Niere
ACys	Cystatin C, Mutationsvarianten	S	H	PNS, Haut
A $\alpha$ Syn	$\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ S)	L	E	Morbus Parkinson, Lewy-Body-Demenz, MSA
ATau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein $\tau$	S, L	E	ZNS
ABri	ABriPP, Mutationsvarianten	S	H	ZNS
ADan	ADanPP, Mutationsvarianten	L	H	ZNS
A $\beta$	A $\beta$ Vorläuferprotein, Wildtyp	L	E	ZNS
	A $\beta$ Vorläuferprotein, Mutationsvarianten	L	H	ZNS
APrP	Prionenprotein, Wildtyp	L	E	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, tödliche Schlaflosigkeit
	Prionenprotein, Mutationsvarianten	L	H	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, tödliche Schlaflosigkeit
	Prionenprotein, Mutationsvariante	S	H	PNS
ACal	(Pro)Calcitonin	L	E	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
AIAPP	Amylin (Inselzellenamyloidprotein)	L	E	Langerhans'sche Inselzellen, Insulinom
AANF	Atrialer natriuretischer Faktor	L	E	Herzvorhof
APro	Prolaktin	L	E	Prolaktinom, Hypophyse im Alter
AIns	Insulin	L	E	Iatrogene lokale Injektionen
AGal7	Galaktin 7	L	E	Haut
ACor	Korneodesmosin	L	E	Verhorntes Plattenepithel, Haarfollikel
AMed	Medin, Laktadherin	L	E	Senile Aorta, Media der Gefäße
AKer	Kerato-Epithelin	L	E	Kornea
ALac	Laktoferrin	L	E	Kornea
AOAAP	Odontogenes Ameloblasten-assoziiertes Protein	L	E	Odontogene Tumoren
ASem1	Semenogelin I	L	E	Samenblasen
ASPC	Surfactant-assoziiertes Protein C (SP-C)	L	E	Lunge
AEnf	Enfurvitide	L	E	Iatrogen

Legende: S = systemisch, L = lokal, E = erworben, H = hereditär, ZNS = Zentrales Nervensystem, PNS = Peripheres Nervensystem, ANS = Autonomes Nervensystem, MSA = Multisystematrophie

#### 1.1.4 Pathophysiologie der Amyloidogenese

Prinzipiell ist jedes Protein in der Lage, Amyloid zu bilden (Chiti & Dobson, 2006; Nilsson et al., 2010). Obwohl diese Proteine aus unterschiedlichen Aminosäuresequenzen hervorgehen, weist das entstehende Amyloid seine typische  $\beta$ -Faltblattstruktur als Grundstruktur auf. Aus einer Aminosäuresequenz können verschiedene Amyloidprotofilamente und folglich -fibrillen hervorgehen, was als Polymorphismus bezeichnet wird und beispielsweise bei der Transthyretin (TTR)-Amyloidogenese (Chiti & Dobson, 2017) auftritt. Je hydrophober und demnach unpolarer ein Protein ist, desto eher neigt es zur Aggregation. Stark polare Abschnitte eines Proteins können hingegen die Aggregationsneigung vermindern (Chiti & Dobson, 2006).

Die Fehlfaltung eines physiologischen Proteins und somit die Entstehung von Amyloid wird durch verschiedene Faktoren begünstigt:

##### 1) Änderung der Aminosäuresequenz

Erbliche Formen der Amyloidose haben gezeigt, dass die Änderung der Aminosäuresequenz durch Mutationen die Entstehung von Amyloid begünstigen kann. Beispiele hierfür sind Apolipoprotein A1, Fibrinogen, Lysozym und TTR (Merlini & Bellotti, 2003).

##### 2) Änderung der Proteinkonformation

Globuläre Proteine neigen unter bestimmten Bedingungen dazu, sich komplett oder partiell zu entfalten und anschließend zu aggregieren. Dabei spielen *in vitro* hohe Temperaturen, ein hoher Umgebungsdruck, ein saurer oder alkalischer pH-Wert oder erhöhte Konzentrationen organischer Lösungsmittel eine Rolle (Chiti & Dobson, 2006; Hammarstrom et al., 2002; Hurshman et al., 2004). Bei der TTR-Amyloidogenese dissoziiert das physiologische TTR-Tetramer, bevor es zur Amyloidentstehung kommt. Diese Dissoziation ist *in vivo* auch bei physiologischer Temperatur, Proteinkonzentration und physiologischem pH-Wert möglich. Die entstehenden partiell entfalteten und somit pathologischen Monomere sind thermodynamisch weniger stabil als das physiologisch gebildete TTR-Monomer. Dadurch neigen diese fehlgefalteten Monomere vermehrt zur Aggregation und bilden Amyloid. Je instabiler ein solches Monomer und je höher dessen Serumkonzentration ist, desto schwerwiegender ist oftmals die Amyloidose (Quintas et al., 2001; Sekijima et al., 2005).

### 3) Kernpolymerisation

Durch thermodynamische Prozesse entstehen aus fehlgefalteten Monomeren sogenannte *oligomere Nuclei*, an die sich weitere monomere Fragmente anlagern und so eine Amyloidfibrille bilden (Chiti & Dobson, 2017; Hurshman et al., 2004). Diese Kernpolymerisation läuft in verschiedenen Phasen ab und beginnt mit einer schnellen Lag-Phase, in der vermutlich der *Nucleus* entsteht (Chiti & Dobson, 2006), gefolgt von einer exponentiellen Wachstumsphase, in der aus der Zusammenlagerung von Monomeren Oligo- und Polymere entstehen. Sie endet mit einer Plateau-Phase, auch Equilibriums-Phase genannt, in der ein Gleichgewichtszustand zwischen sich bildenden und fertig gebildeten Amyloidfibrillen erreicht ist. Diese Form der Amyloidogenese wird unter anderem für die A $\beta$ -Amyloidose beschrieben (Hammarstrom et al., 2010; Nilsson et al., 2005).

### 4) Konzentration des Amyloidvorläuferproteins

Eine hohe Konzentration eines potentiell amyloidogenen Vorläuferproteins kann das Risiko für die Entstehung einer Amyloidose signifikant steigern. Hierfür existieren zahlreiche Beispiele:

AA-Amyloid: Eine konstant erhöhte Serumkonzentration des Serum-Amyloid-A (einem Akutphaseprotein) bei Patienten mit einer chronischen entzündlichen Grunderkrankung steigert signifikant das Risiko für die Entstehung von AA-Amyloid (Merlini & Bellotti, 2003).

AL-Amyloid: Eine Voraussetzung für die Entstehung der Immunglobulin-Leichtketten-assoziierten AL-Amyloidose ist die anhaltend hohe Synthese und Sekretion pathologischer Leichtketten, wie zum Beispiel bei dem Multiplen Myelom (Merlini & Bellotti, 2003).

A $\beta$ 2M-Amyloid: Die  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Amyloidose entsteht bei chronischer Niereninsuffizienz durch die verminderte Elimination und somit steigende Plasmakonzentration des  $\beta$ 2-Mikroglobulins. Standardmäßig verwendete Dialysemembranen sind zu feinporig und können  $\beta$ 2-Mikroglobulin nicht dialysieren.  $\beta$ 2-Mikroglobulin verbleibt somit weiterhin im Körper und lagert sich in Form von Amyloid vor allem im muskuloskelettalen System ab. Eine erhöhte Aktivität von Zytokinen und Komplementfaktoren durch den Entzündungsreiz der Dialyse kann hierbei ebenso eine Rolle spielen wie urämische Zustände im Körper, die zu fehlgefaltetem und ablagerungsfähigem  $\beta$ 2-Mikroglobulin führen (Scarpioni et al., 2016).

Ins-Amyloid: Werden die für die Therapie des Diabetes mellitus nötigen subkutanen Insulininjektionen wiederholt an derselben Stelle durchgeführt, kommt es lokal zu einem Überangebot von Insulin und dessen Akkumulation als Insulin-Amyloid (Ansari et al., 2017).

A $\beta$ - und ATTR-Amyloid: Die Konzentrationen von amyloidogenen Vorläuferproteinen werden auch durch die Blutplasmakonzentration männlicher Sexualhormone beeinflusst. Bei der A $\beta$ -Amyloidogenese beispielweise führt ein Androgenentzug durch chemische Kastration bei Mäusen zu erhöhten Blutplasmakonzentrationen von A $\beta$ -Protein und somit zu einem gesteigerten Risiko für eine Alzheimerdemenz, während Dihydrotestosteron die Synthese von TTR in der Leber steigert und somit die im Körper zirkulierende TTR-Konzentration erhöht (Goncalves et al., 2008; Quintela et al., 2008).

5) Proteolytische Freisetzung eines amyloidogenen Proteins

Proteolyse kann zur fehlerhaften Zersetzung eines amyloidogenen Vorläuferproteins führen. Bei der A $\beta$ -Amyloidose des Morbus Alzheimer bildet beispielsweise ein proteolytisches Spaltprodukt des transmembranären A $\beta$ -Vorläufermoleküls das Amyloidprotein (Chiti & Dobson, 2017).

6) Mangelnder Abbau von Amyloid

Einige Studien zeigen, dass Amyloid proteolytisch abbaubar ist und eine unzureichende Proteolyse bereits gebildeter Amyloidfibrillen die Krankheitsprogression begünstigen kann (Chiti & Dobson, 2017).

7) Verminderte Anzahl an Chaperon-Molekülen

Chaperone sorgen für die korrekte Faltung von Proteinen. Eine altersassoziierte Abnahme der Bildung von Chaperon-Molekülen kann vermutlich die Entstehung von Amyloid begünstigen (Chiti & Dobson, 2017).

### 1.1.5 Epidemiologie der Amyloidosen

Bislang liegen für Deutschland keine gesicherten epidemiologischen Angaben über die Inzidenz und Prävalenz der Amyloidosen vor, da viele Amyloidosen klinisch unauffällig sind oder klinisch symptomatische Amyloidosen möglicherweise nicht als solche erkannt werden.

Weltweit gibt es einige Amyloidosen, die regional oder im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen gehäuft auftreten. So tritt die AA-Amyloidose meist bei Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber oder begleitend bei Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Morbus Crohn oder Morbus Bechterew auf (Rocken et al., 2006). In den USA wurde die Inzidenz der AL-Amyloidose 2003 mit 8:1.000.000 beschrieben (Rocken & Sletten, 2003).

Die hereditäre ATTR-Amyloidose (ATTRm) hat je nach Symptomatik eine unterschiedliche Prävalenz. Diese beläuft sich bei Patienten mit Polyneuropathie auf 10.000 Betroffene weltweit, wobei in Schweden, Japan und Portugal die ATTRm endemisch auftritt und dann eine Prävalenz von 1:1.000 aufweist. In diesen Ländern sind ca. 40.000 Patienten von einer ATTR-Amyloid-Kardiomyopathie betroffen (Hawkins et al., 2015). Die Inzidenz der Wildtyp-ATTR-Amyloidose (ATTRwt) nimmt mit dem Alter zu (Sueyoshi et al., 2011) und wird bei über 80-jährigen Patienten mit einer Prävalenz von bis zu 25% angegeben (Westermarck et al., 1990).

### 1.1.6 ATTR-Amyloidose

Bei der ATTR-Amyloidose bildet TTR (Synonym Präalbumin) das Amyloidprotein. Sie ist eine der häufigsten systemischen Amyloidosen (Nilsson et al., 2010). Klinisch präsentiert sich die ATTR-Amyloidose in zwei verschiedenen Formen, zum einen als ATTRwt ohne Keimbahnmutationen und zum anderen als angeborene, durch *TTR*-Keimbahnmutationen verursachte ATTRm (Gertz et al., 2015).

#### 1.1.6.1 Transthyretin

TTR ist ein Plasma-Transportprotein, das überwiegend von der Leber und zu einem geringeren Anteil auch vom Plexus choroideus synthetisiert wird (Eriksson et al., 2009; Ingenbleek & Young, 1994). Im physiologischen Zustand ist es für den Transport des Komplexes aus Retinol-bindendem Protein und Vitamin A sowie des Schilddrüsenhormons Thyroxin zuständig (Chung et al., 2001). Die Blutplasmakonzentration ist von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig, unter anderem vom Eiweißgehalt der Nahrung. Er steigt bei chronischer Niereninsuffizienz (Cano, 2002) und sinkt bei Entzündungen im Sinne einer negativen Akut-Phase-Reaktion (Devoto et al., 2006).

Der Serum-TTR-Gehalt ist bei Männern höher als bei Frauen (Cano, 2002). Das Protein hat eine molare Masse von 55 kDa und besteht aus 127 Aminosäuren. Funktionell liegt es als Proteinkomplex aus vier identischen Untereinheiten vor (Homotetramer) und zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus, die ihm das amyloidogene Potential verleihen (Details zur Pathophysiologie siehe Abschnitt 1.1.4).

#### 1.1.6.2 Die erworbene ATTR-Amyloidose

Bei der erworbenen, nicht-erblichen ATTR-Amyloidose bildet das Wildtyp-TTR die Amyloidablagerungen. Die früher als senile-kardiovaskuläre ATTR-Amyloidose bezeichnete ATTRwt lagert sich bevorzugt in Gefäßwänden zahlreicher Organe ab und befällt außerdem häufig das Herz sowie Binde- und Sehngewebe, wie zum Beispiel das *Retinaculum flexorum* und Synovialgewebe (Sueyoshi et al., 2011). Sie tritt vor allem bei über 60-Jährigen auf. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Kristen et al., 2016). Der Großteil der kardialen ATTR-Amyloidosen ist durch ATTRwt-Ablagerungen bedingt (Chung et al., 2001). Sie können klinisch unscheinbar sein oder das Leben durch eine restriktive Kardiomyopathie bedrohen (Patel & Hawkins, 2015). Kristen et al. haben gezeigt, dass der Gehalt an ATTR-Amyloid (sowohl ATTRwt als auch ATTRm) im Herzen mit der Schwere der restriktiven Kardiomyopathie korreliert (Kristen et al., 2016).

#### 1.1.6.3 Die hereditäre ATTR-Amyloidose

Bei der ATTRm liegt eine Keimbahnmutation im *TTR*-Gen vor, die meist autosomal-dominant vererbt wird (Conceicao et al., 2016). Inzwischen wurden über 100 verschiedene Mutationen nachgewiesen, die zu einer ATTRm führen. Die p.Val30Met-Mutation zählt zu den häufigsten Mutationen des *TTR*-Gens (Hawkins et al., 2015). Klinisch imponieren entweder eine distal betonte sensomotorische Polyneuropathie (FAP, vor allem mit p.Val30Met-Mutation) oder ein kardialer Befall (sogenannte Amyloid-Kardiomyopathie) (Eriksson et al., 2009). Auch das autonome Nervensystem ist häufig betroffen, sodass es unter anderem zu Malabsorption kommen kann. Das Manifestationsalter liegt zwischen 30 und 50 Jahren, die Erkrankung endet oftmals innerhalb von zehn Jahren tödlich.



#### 1.1.6.4 Therapie der ATTR-Amyloidosen

Die Therapie der ATTR-Amyloidosen hängt entscheidend von den befallenen Organ-systemen ab. Dabei steht derzeit die symptomatische Therapie mittels Pharmakotherapie an erster Stelle. So kann die kardiale Symptomatik zum Beispiel durch Kontrolle des Wasserhaushalts mittels Schleifendiuretika gelindert werden. Bei Polyneuropathie, die auch die Herzerregung betreffen kann, sollte rechtzeitig ein Schrittmacher implantiert werden (Hawkins et al., 2015).

Für die Behandlung der ATTRm wurden inzwischen verschiedene Therapiemodalitäten entwickelt. Über 90% des zirkulierenden TTRs wird in der Leber synthetisiert. Die sogenannte Domino-Lebertransplantation ist eine Therapieoption bei Patienten mit ATTRm (Herlenius et al., 2004). Hierbei erhält der an ATTRm erkrankte Patient eine fremde Leber. Seine bis auf den Amyloidose-Stoffwechseldefekt funktionstüchtige Leber wird an einen Patienten mit andersartiger Indikation zur Lebertransplantation gespendet (Leberlebenspende). Dabei besteht das Risiko, dass sich bei dem Empfänger eine *de novo*-hereditäre ATTRm-Amyloidose entwickelt. Diese macht sich jedoch meist erst nach mehreren Jahren bemerkbar (Matsushima et al., 2017; Misumi et al., 2016). Vor allem ältere Patienten mit bedrohlicher Organdysfunktion profitieren von dieser Art der Lebertransplantation unter der Voraussetzung von regelmäßigen und sorgfältigen Nachkontrollen in Hinblick auf die Entwicklung einer *de novo* ATTRm-Amyloidose (Rocken et al., 2006). Insbesondere bei Patienten mit früh diagnostizierter ATTRm aufgrund einer p.Val30Met-Mutation kann mittels Lebertransplantation die Überlebenszeit verdoppelt werden (Ericzon et al., 2015). Diese Therapieform hängt jedoch entscheidend von allgemeinen weiteren klinischen Parametern der Patienten ab und ist durch den Mangel an Organspendern nur eingeschränkt verfügbar. Zudem ist nicht auszuschließen, dass das TTR der transplantierten Leber wiederum Amyloid bildet (Hawkins et al., 2015).

Durch ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie der ATTRm wurden inzwischen Medikamente entwickelt, die den Prozess der Fehlfaltung beeinflussen. Dazu gehören die TTR-Tetramer-Stabilisierer *Tafamidis* und *Diflusinal*. Diese Stoffe stabilisieren die physiologische Konformation des TTR-Proteins, wodurch sich die Struktur nicht in Richtung amyloidogener Form verändert. *Tafamidis* ist in Europa zur Behandlung der FAP bereits seit 2011 zugelassen. Eine internationale, multizentrische, doppelt verblindete, placebokontrollierte, randomisierte

klinische Phase III-Studie zur Anwendung von *Tafamidis* bei Amyloid-Kardiomyopathie lief von Dezember 2013 bis Februar 2018 und erzielte signifikant erfolgreiche Ergebnisse zur Reduktion der Mortalität und der Häufigkeit von kardiovaskulär bedingten stationären Einweisungen, sodass *Tafamidis* nun auch zur Behandlung der Amyloid-Kardiomyopathie zugelassen ist (Maurer et al., 2018). Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von *Antisense-Oligonukleotiden* (*ISIS-TTR<sub>Rx</sub>* bzw. *IONIS-TTR<sub>Rx</sub>*). Diese beeinträchtigen die Translation der TTR-mRNA, sodass weder die native noch die mutierte Form des TTRs gebildet werden kann. Hierzu wurde von Dezember 2012 bis Oktober 2017 eine doppelt verblindete, placebokontrollierte randomisierte klinische Phase-III-Studie durchgeführt, in der *Inotersen*, ein *Antisense-Oligonukleotid*, als effektiv und sicher für die Reduktion der Progression einer FAP eingestuft wurde (Benson et al., 2018). Ebenso wurden RNA-interferierende Medikamente in klinischen Studien untersucht, darunter *Patisiran*, welches im Herbst 2018 für die Behandlung von Patienten mit durch ATTRm-versursachter Polyneuropathie zugelassen wurde (Hoy, 2018).

Eine weitere Therapieoption bietet der Einsatz von Antikörpern gegen Bestandteile des Amyloids, so zum Beispiel gegen die Amyloid-P-Komponente. Ob diese Medikamente untereinander kombiniert werden können, um die Effektivität zu verbessern, wird noch untersucht (Hawkins et al., 2015).

## 1.2 Diagnostik und Klassifikation der Amyloidosen

Die Diagnostik und Klassifikation der Amyloidosen setzt sich aus mehreren Stufen zusammen. Wurde eine Amyloidose histologisch diagnostiziert, folgt anschließend die genauere Klassifikation. Im Folgenden werden histologische Färbungen zur Diagnostik und Methoden zur Klassifikation vorgestellt.

### 1.2.1 Diagnostik

Die Diagnostik der Amyloidosen erfolgt an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Resektaten mittels histologischer und/oder elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Elektronenmikroskopisch lassen sich die nicht-verzweigten Fibrillen unterschiedlicher Länge von etwa 10 nm Durchmesser darstellen (siehe Abschnitt 1.1.2).

Zur Materialgewinnung eignen sich sowohl Biopsien, die einen kleinen Ausschnitt des Gewebes widerspiegeln, als auch Resektionen, wodurch das komplette Gewebe oder Organ entnommen und untersucht wird.

### 1.2.1.1 Kongorot-Färbung

Goldstandard für die Diagnostik von Amyloid ist die Kongorot-Färbung nach Puchtler (Puchtler et al., 1962). Kongorot ist ein Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe mit einer hydrophoben, aromatischen Grundstruktur und zwei Sulfonsäuregruppen (sulfonylierter Bi-Naphthyl-Azofarbstoff, siehe Abbildung 1) (Klingstedt et al., 2011; Nilsson, 2009; Sjolander et al., 2016).

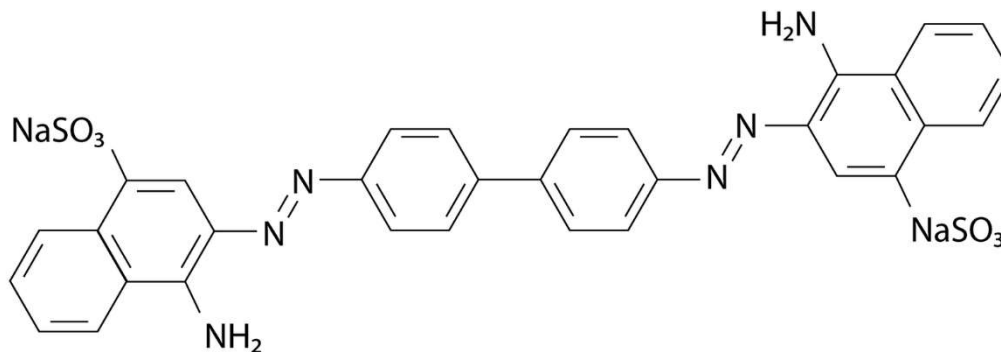


Abbildung 1: Die Strukturformel von Kongorot, einem sulfonylierten Bi-Naphthyl-Azofarbstoff.

Der Farbstoff Kongorot lagert sich mit seiner langen Achse durch eine Kombination von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften parallel an die  $\beta$ -Faltblattstruktur des Amyloids an (Elghetany et al., 1989; Krebs et al., 2005; Nilsson, 2009). In der Hellfeldmikroskopie sind die kongorotgefärbten Amyloidablagerungen durch ihre eosinophile Farbe sichtbar. Ein kongorotgefärbter Gewebeschnitt wird mikroskopisch genauer mithilfe eines Polarisationsmikroskops untersucht. Der Gewebeschnitt befindet sich hierbei zwischen dem Polarisator (ein Polarisationsfilter, der sich zwischen dem Objektträger und der Lichtquelle befindet) und dem Analysator (ein weiterer Polarisationsfilter auf der gegenüberliegenden Seite des Gewebeschnittes zwischen Objektträger und Betrachter). Polarisator und Analysator werden in rechtem Winkel zueinander ausgerichtet. Dadurch wird bei maximal hell eingestellter

Lichtquelle ein Dunkelfeld erzeugt. Von dieser Position ausgehend kann nun durch geringe Bewegung des Polarisators oder Analysators ein Farbumschlag in den Amyloidablagerungen sichtbar gemacht werden. Der gleiche Effekt wird durch Rotation des Objektträgertisches ausgelöst (Howie et al., 2008). Merlini beschreibt die Darstellung der kongorotgefärbten Amyloidablagerungen mit einer spezifischen grüngelben anomalen Polarisationsfarbe (Merlini & Bellotti, 2003). Das Amyloid kann auch in anderen anomalen Polarisationsfarben erscheinen, je nach Position des gefärbten Gewebes zum Polarisationsfilter (Howie et al., 2008). Die Kongorot-Färbung färbt alle Amyloidarten an (Nilsson et al., 2010), dennoch lässt sich eine unterschiedlich starke Ausprägung des Färb- und Polarisationsverhaltens je nach Amyloidart beobachten (Rocken & Eriksson, 2009).

Kongorot ist nicht spezifisch für Amyloid. Es werden auch weitere Proteine mit  $\beta$ -Faltblattstruktur angefärbt und in der darauf folgenden Polarisationsmikroskopie sichtbar, wie zum Beispiel Kollagen und Elastin (Khurana et al., 2001). Des Weiteren wird durch Kongorot zwar die fibrilläre Struktur des Amyloids nachweisbar, prä-fibrilläre Protofilamente bleiben jedoch unentdeckt (Sousa et al., 2001).

Die Sensitivität der Färbung ist beim Nachweis weniger und kleiner Amyloidablagerungen sowie bei dünnen Gewebeschnitten von 2-5  $\mu\text{m}$  eingeschränkt. Durch Erhöhung der Gewebeschnittdicke auf 5-10  $\mu\text{m}$  wird die Kongorot-Färbung intensiver. Einzelne kleine Ablagerungen sind bei Betrachtung des kongorotgefärbten Gewebeschnittes unter einem Fluoreszenzmikroskop sensitiver nachweisbar (Linke, 2000; Puchtler & Sweat, 1965). In dieser Kongorotfluoreszenz (CRF) kommt es im Vergleich mit der Kongorotpolarisation in deutlich geringerem Ausmaß zu einem falsch-positiven Nachweis von Gewebestrukturen (Clement & Truong, 2014). Durch die Kombination mit immunhistochemischen Färbungen lässt sich die Spezifität der Kongorot-Färbung sowohl polarisationsoptisch als auch fluoreszenzoptisch weiter erhöhen (Marcus et al., 2012).

Die Kongorot-Färbung ist kein Bestandteil der histologischen Standard-Routinediagnostik, sondern wird erst bei Verdacht auf das Vorliegen einer Amyloidose durchgeführt. Entsprechend bleiben viele Amyloidosen unentdeckt.

### 1.2.1.2 Thioflavin-Färbung

Ungefähr zeitgleich mit Kongorot wurde auch Thioflavin in den 1960er Jahren für den Nachweis von Amyloid als geeignet erklärt (Kelenyi, 1967a). Thioflavin ist ein hydrophober Benzothiazol-Farbstoff und existiert als Thioflavin S (ThS) und Thioflavin T (ThT, siehe Abbildung 2) (Kelenyi, 1967a; Klingstedt et al., 2011). Die Farbstoffe unterscheiden sich durch ihren pH-Wert und ihre chemischen Seitengruppen: ThS ist sauer und enthält eine Sulfonsäuregruppe, während ThT alkalisch ist und Methylgruppen enthält (Kelenyi, 1967a). Beides sind Fluorochrome, die sich vermutlich über ionische Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen sowohl an Proteine mit  $\alpha$ -Helix- als auch mit  $\beta$ -Faltblattstruktur anlagern, wobei die Thioflavin T-Moleküle zuvor in wässriger Lösung Mizellen ausbilden (Chiti & Dobson, 2017; Kelenyi, 1967b; Khurana et al., 2005).

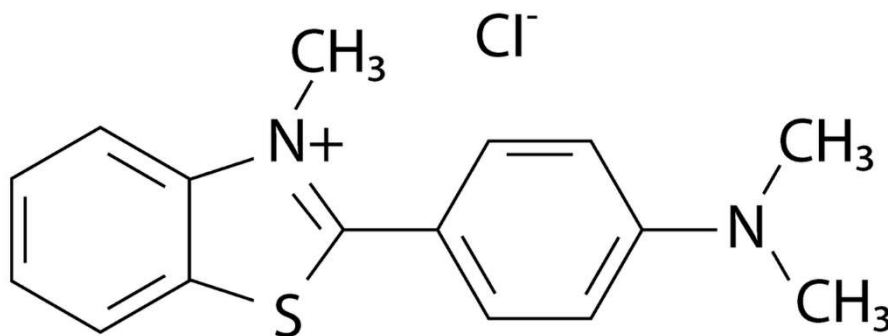


Abbildung 2: Die Strukturformel von ThT als Beispiel für die Benzothiazol-Farbstoffe ThS und ThT.

Bei Bindung von Thioflavin an Amyloid verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum von Exzitation/Emission 350 nm/438 nm zu Exzitation/Emission 450 nm/482 nm (Quintas et al., 2001). Es wird vermutet, dass über diese Verschiebung nicht nur die endgültige Form des Amyloids nachgewiesen werden kann, sondern auch die amyloidogenen Vorstufen im Verlauf der Aggregation, jedoch mit geringerer Signalintensität (Hammarstrom et al., 2010). Je weiter die Aggregation fortgeschritten ist, desto intensiver wird das Fluoreszenzsignal aufgrund einer zunehmenden Stabilität des Thioflavins durch die Verlängerung und geordnete Ablagerung der Amyloidfibrillen, an die sich das Thioflavin vermutlich parallel entlang der langen Achse anlagern kann (Klingstedt et al., 2011; Krebs et al., 2005).

Die Thioflavin-Färbung wird zwar im Vergleich zu der Kongorot-Färbung als sensitiver für den Nachweis von Amyloid beschrieben, ist jedoch ebenfalls nicht spezifisch für Amyloid, und die Abgrenzung zur Autofluoreszenz im Gewebe kann schwierig sein (Nilsson et al., 2010). Thioflavin färbt unter anderem auch elastische Fasern, Mukopolysaccharide, Keratin und Nukleinsäuren an (Kelenyi, 1967a; Khurana et al., 2005). Die Intensität des Fluoreszenzsignals hängt vom Gehalt des angefärbten Proteins ab (Hurshman et al., 2004). Die Sensitivität und die Spezifität können durch die Konzentration des Farbstoffes sowie den pH-Wert der Färbelösung beeinflusst werden (Kelenyi, 1967a).

Die Thioflavin-Färbung wird vor allem in der Forschung verwendet (Hammarstrom et al., 2010) und kommt in der klinischen Routine zur Diagnostik von Amyloid nicht zum Einsatz.

#### 1.2.1.3 h-FTAA-Färbung

Seit Anfang der 2000er Jahre schreitet die Forschung an fluoreszierenden Farbstoffen für die histologische Diagnostik von Amyloid weiter voran. Es wurden lumineszierende konjugierte Polythiophene (LCPs) und lumineszierende konjugierte Oligothiophene (LCOs) entwickelt, deren Grundstruktur aus mehreren Thiophen-Molekülen (Summenformel  $C_4H_4S$ ) besteht.

##### 1.2.1.3.1 LCPs und LCOs im Allgemeinen

LCPs und LCOs sind optisch und elektrisch aktiv (Nilsson, 2009; Nilsson et al., 2005). Die Anzahl der Thiophen-Moleküle in der Grundstruktur definiert die Zuordnung zu einer der beiden Gruppen: LCOs bestehen aus fünf bis sieben, LCPs aus mindestens sieben Thiophen-Molekülen (Klingstedt et al., 2011). Sie sind in der Lage, Proteine zu binden. Die Thiophene dienen als flexibles Rückgrat, sodass sich LCPs und LCOs der Konformation des Bindungsproteins anpassen. Daraus entstehen unterschiedliche Fluoreszenzspektren, die je nach Bindungsprotein charakteristisch sind (Hammarstrom et al., 2010; Klingstedt et al., 2011; Nilsson, 2009).

Ausgehend von der gleichen Grundstruktur existieren mehrere LCPs und LCOs mit jeweils chemischen Besonderheiten durch verschiedene Seitenketten. HTAA und

FTAA unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hydrogen- (HTAA) oder Carboxylgruppen (FTAA), während sich die LCOs h-FTAA (Heptamer) und p-FTAA (Pentamer) lediglich in der Anzahl ihrer Thiophen-Ringe unterscheiden (Klingstedt et al., 2011). Die unterschiedliche chemische Struktur führt zu verschiedenen Fluoreszenzspektren. Je nach Größe des Thiophen-Rückgrates erfolgt die Anlagerung an zahlreiche Proteinaggregate, sowohl an einzelne Moleküle *in vitro* als auch in histologischen Gewebeschnitten (Nilsson, 2009).

LCPs und LCOs binden bevorzugt Proteine mit sich wiederholender  $\beta$ -Faltblattstruktur, wie zum Beispiel Amyloid. Vermutlich lagern sich die Farbstoffe entlang der langen Achse der Amyloidfibrille an, wobei die anionischen Carboxyl-Seitenketten des LCPs oder LCOs mit den positiv geladenen Seitenketten des Amyloids interagieren (Klingstedt et al., 2013b). Auch hydrophobe Wechselwirkungen sorgen für eine Anlagerung der LCPs und LCOs an Amyloid (Nilsson et al., 2006). Je nach Größe der jeweiligen Bindungstasche der Amyloidfibrille für ein LCP und/oder LCO wird ein Exzitations- und Emissionsspektrum erzeugt, das dem jeweiligen LCP und/oder LCO eindeutig zuordenbar ist (Klingstedt et al., 2011): Wenn sie an Amyloid gebunden sind, verändert sich ihr Fluoreszenzsignal durch eine Orientierungsänderung des Thiophen-Rückgrates und unterscheidet sich so von dem Fluoreszenzsignal, das bei Bindung an das native Protein ausgestrahlt wird (Nilsson, 2009). Die Amyloidablagerungen sind dadurch nachweisbar und von eventuell umgebender Autofluoreszenz abgrenzbar, wodurch die Diagnostik erleichtert wird (Klingstedt et al., 2013a; Sjolander et al., 2016). Bei Bindung an andere fibrilläre Proteine, wie zum Beispiel Kollagen, wird ein anderes Fluoreszenzspektrum erzeugt, sodass keine Verwechslungsgefahr zwischen Kollagen und Amyloidablagerungen besteht (Nilsson et al., 2006). Die Färbung verschiedener Resektate mit AL-Amyloidablagerungen mittels des LCOs PTAA führt zu unterschiedlichen Fluoreszenzspektren und es wird davon ausgegangen, dass sich verschiedene AL-Amyloidablagerungen in ihrer Konformation unterscheiden (Klingstedt & Nilsson, 2011). Selbst innerhalb von A $\beta$ -Amyloidablagerungen unterscheidet sich das mittels PTAA erzeugte Fluoreszenzspektrum und es können Rückschlüsse auf die Konformation der abgelagerten Amyloidfibrillen gezogen werden: Im Zentrum einer Ablagerung liegen die A $\beta$ -Amyloidfibrillen verdreht und locker nebeneinander, während sie im äußeren Bereich eher gerade, planar und dicht gepackt sind. Das Zentrum einer solchen Ablagerung fluoresziert grün, die Peripherie orange (Klingstedt & Nilsson,

2011). Ein weiteres Beispiel für die Sensitivität und Spezifität der konjugierten Polymere ist das LCO p-FTAA. Dessen ausgestrahltes Fluoreszenzsignal verändert sich auch abhängig von der Konformation der vorhandenen Amyloidart, und mittels p-FTAA-Spektroskopie kann die Amyloid-Klassifikation gelingen (untersucht für ATTR-, AA- sowie AL-Amyloid) (Nilsson et al., 2010). p-FTAA wird zur Herstellung der Färbelösung in PBS gelöst. Es besteht die Möglichkeit, immunhistochemische Antikörperfärbungen mit der p-FTAA-Färbung an ein- und demselben Gewebeschnitt zu kombinieren, was die Genauigkeit der Amyloid-Klassifikation erhöht (Nilsson et al., 2010).

Mittels LCPs und LCOs mit mindestens fünf Thiophen-Ringen und Carboxylgruppen in der Grundstruktur können auch prä-fibrilläre Amyloidablagerungen beispielsweise während der Kernpolymerisation nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.1.4). Dies ist mittels der Kongorot- oder Thioflavin-Färbung nicht möglich (Hammarstrom et al., 2010; Klingstedt et al., 2013b). Die Fluoreszenzspektren sind dabei ähnlich wie bei fibrillären kongorotpositiven Amyloidablagerungen. Ergänzend lassen sich auch intrazelluläre Protein-Einschlusskörperchen und Prionen mittels LCPs und LCOs nachweisen (Klingstedt et al., 2011).

LCPs und LCOs nehmen einen besonderen Platz in der Diagnostik von Amyloidosen ein. Ihre Eigenschaft, eine bestimmte funktionelle Konformation eines Proteins durch Verschiebung ihrer Fluoreszenzspektren zu erkennen, grenzt sie von den konventionellen Amyloidliganden ab, deren Fluoreszenzspektrum sich nur dann ändert, wenn sie aus freier Lösung in einen proteingebundenen Zustand übergehen (Nilsson, 2009).

#### 1.2.1.3.2 h-FTAA im Speziellen

h-FTAA steht für *heptamer formyl thiophene acetic acid*. Es besteht aus sieben Thiophen-Ringen mit einigen von der Essigsäure abgeleiteten Seitenketten und gehört zur Gruppe der LCOs (siehe Abbildung 3).



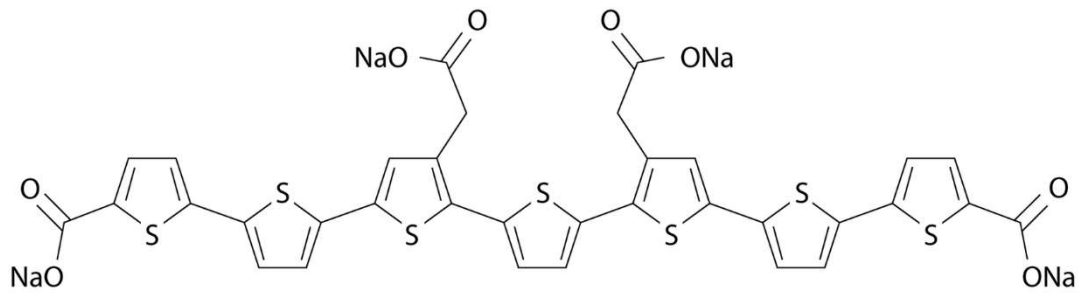


Abbildung 3: Die Strukturformel von h-FTAA. Die Grundstruktur von h-FTAA wird durch 7 Thiophen-Moleküle (Summenformel C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>S) gebildet.

Sjölander et al. (2016) beschreiben eine hundertprozentige Sensitivität des Amyloidnachweises für die häufigsten systemischen sowie für lokale Amyloidosen mit positiver Kongorot-Färbung. Des Weiteren lassen sich kleine Amyloidablagerungen nachweisen, die in der immunhistochemischen Färbung positiv sind, in der Kongorot-Färbung jedoch negativ. Es wurden Kontrollen verwendet, in denen mittels Kongorot-Färbung keine Ablagerungen zur Darstellung kamen. In einigen dieser Kontrollen wurden vor allem bei älteren multimorbiden Patienten die Paneth-Zellen in der Magenschleimhaut und kleine intrazelluläre Ablagerungen in Leber- und Nierengewebe sowie in den Samenbläschen von Hodengewebe durch h-FTAA angefärbt. Hierbei handelt es sich möglicherweise um prä-amyloidogene Ablagerungen, die durch Kongorot noch nicht detektierbar sind (siehe Abschnitt 1.2.1.1) (Sjölander et al., 2016). Die h-FTAA-Färbung kann direkt mit verschiedenen Färbungen kombiniert werden, zum Beispiel mit immunfluoreszierenden Farbstoffen. Wenn der immunfluoreszierende Farbstoff bei einer Wellenlänge über 640 nm angeregt wird, besteht keine Gefahr der gleichzeitigen Fluoreszenz durch h-FTAA, weil h-FTAA dieses Licht nicht mehr absorbiert (Nystrom et al., 2017).

### 1.2.2 Klassifikation

Die Klassifikation der vorliegenden Amyloidose ist heutzutage von hoher Relevanz, da Therapie und Prognose von der Amyloidart abhängen. Sie gelingt mittels immunhistochemischer und/oder proteinbiochemischer Verfahren. Bei erblichen Formen sind

zur Diagnosesicherung zusätzlich molekularpathologische Untersuchungen erforderlich, um das Vorliegen einer Keimbahnmutation zu belegen.

#### 1.2.2.1 Immunhistochemie

Anhand immunhistochemischer Färbungen mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Ursprungspoltein einer Amyloidose werden die verschiedenen Amyloidarten klassifiziert und einzelne Bestandteile von Amyloid (zum Beispiel Amyloid-P-Komponente und Vitronectin) nachgewiesen. Die Antikörper, von denen einige kommerziell erhältlich sind, identifizieren dabei eine spezifische Sequenz eines Proteins, wobei die Faltung des Gesamtproteins für die Erkennung keine Rolle spielt (Klingstedt & Nilsson, 2011; Nilsson, 2009). Durch diese kann ein Amyloidprotein bereits nachgewiesen werden, bevor die Amyloidablagerung ihre endgültige fibrilläre Struktur erreicht hat (Sousa et al., 2001). Da etliche Amyloidosen nur lokal auftreten, ist es nicht sinnvoll, ein Resektat auf alle Ursprungspolteine hin zu überprüfen. Laut der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Amyloid-Krankheiten e.V. soll nur auf die häufigsten Amyloidosen hin getestet werden: AA-, AApoAI-, AFib-, AL-, ALys- und ATTR-Amyloid (Rocken et al., 2006). Der immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitt sollte immer mit dem kongorotgefärbten Gewebeschnitt verglichen werden (Rocken & Eriksson, 2009).

#### 1.2.2.2 Proteinbiochemie

Die eindeutige Identifikation des Amyloid-Ursprungspolteins gelingt durch die Extraktion des Amyloidproteins aus dem Gewebe mit anschließender Sequenzierung der Aminosäuresequenz. Bisher wird dieses Verfahren in der Routinediagnostik jedoch nicht eingesetzt (Rocken & Eriksson, 2009).

#### 1.2.2.3 Molekularpathologie

Um eine hereditäre Amyloidose nachzuweisen, werden molekularpathologische Verfahren ergänzend genutzt. Dazu muss die Amyloidose zunächst diagnostiziert und klassifiziert sein, bevor aus dem Blut oder dem für die Diagnostik verwendeten

Gewebe molekularbiologisch der Nachweis einer Mutation erfolgen darf (Rocken & Eriksson, 2009).

### 1.3 Das Karpaltunnelsyndrom

#### 1.3.1 Definition

Bei einem Karpaltunnelsyndrom (Synonym *Brachialgia paraesthetica nocturna*) wird der *Nervus medianus* (Mittelhandnerv) im Karpaltunnel komprimiert. Dadurch wird der Nerv geschädigt und es kommt zu Taubheitsgefühlen in den Fingern und dem Gefühl des Einschlafens der Hand. Auch motorische Störungen der Handbeweglichkeit können auftreten. Das Karpaltunnelsyndrom tritt in der Regel beidseits auf, wobei die dominante Hand meist früher und stärker betroffen ist (Assmus, 2015).

#### 1.3.2 Anatomie und Pathophysiologie

Im Karpaltunnel (Karpalkanal, *Canalis carpi*) verlaufen der *Nervus medianus* sowie die Sehnen der langen oberflächlichen und tiefen Fingerbeuger (*M. flexor pollicis longus*, *Mm. flexor digitorum superficialis et profundus*). Er wird nach dorsal und lateral durch die Handwurzelknochen und nach palmar durch das *Retinaculum flexorum* (Synonym *Ligamentum carpi transversum*) begrenzt (Schünke et al., 2011). Synovialgewebe dient als Gleitgewebe im Karpaltunnel (Assmus, 2015). Am engsten ist der Karpaltunnel mit etwa 1 cm Durchmesser über der Mitte der distalen Handwurzelreihe (Schünke et al., 2011).

Der Verlauf des *Nervus medianus* ist proximal des Handgelenks sehr oberflächlich und wird hier noch von den Sehnen der *Mm. flexor carpi radialis et palmaris longus* begleitet. Der *Ramus palmaris*, der das radiale Handgelenk sensibel innerviert, geht proximal des Handgelenks ab und verläuft auf dem *Retinaculum flexorum*. Weitere sensible Äste versorgen die radiale Hohlhand, den Thenar sowie palmar die Finger I bis III inklusive des radialen Fingers IV und dorsal die Fingerkuppen II, III und die radiale Fingerkuppe des Fingers IV. Distal außerhalb des Karpaltunnels teilt sich der Nerv und versorgt motorisch den Daumenballen (*Ramus thenaris*) sowie die übrigen Finger (*Nn. digitales communes*) (Assmus, 2015).

Durch eine Volumenvermehrung im Karpaltunnel kommt es zu erhöhtem Druck im Gewebe. Diese Druckerhöhung führt zu einem gestörten Axoplasma- und Blutplasmafluss im Nerv und in den begleitenden Gefäßen. Durch die Ischämie nimmt die Myelinisierung des Nervs ab. Je länger und je höher die Druckbelastung ist, desto stärker wird der Nerv geschädigt und die Nervenleitfähigkeit nimmt ab. Die sensiblen Fasern sind zuerst beeinträchtigt, motorische Ausfälle folgen bei chronischer Schädigung (Assmus, 2015).

### 1.3.3 Epidemiologie

Das Karpaltunnelsyndrom ist das häufigste Kompressionssyndrom eines peripheren Nervs mit einer Prävalenz von 5-10% bei einer Inzidenz von 3/1.000 in Deutschland, wobei die meisten Betroffenen zwischen 40 und 60 Jahre alt sind. Ähnliche Zahlen liegen für die Bevölkerungen Südschwedens und Italiens vor (Atroshi et al., 1999; Mondelli et al., 2002; Nordstrom et al., 1998). Frauen sind drei- bis viermal häufiger betroffen als Männer. Besonders häufig erkranken Schwangere durch eine erhöhte Ödemneigung im dritten Trimenon, Menschen mit Adipositas (Lam & Thurston, 1998), Patienten unter Langzeit-Hämodialyse aufgrund hämodynamischer Störungen durch den arteriovenösen Shunt, Patienten mit ausgeprägter Tenosynovitis oder mit Amyloidablagerungen im Karpaltunnel. In Deutschland wird bei über 120.000 Patienten pro Jahr ein Karpaltunnelsyndrom operativ behandelt (Assmus, 2015).

### 1.3.4 Ätiologie

Die wichtigsten prädisponierenden Faktoren sind ein zu enger Karpaltunnel und die Synovialitis. Des Weiteren existieren zahlreiche Risikofaktoren und Begleiterkrankungen unterschiedlicher Genese, die zu einem Karpaltunnelsyndrom führen können (Assmus, 2015):

- 1) Genetische Disposition und familiäre Häufung
- 2) Entzündliche Ursachen: Tenosynovitis der Beugesehnen, Gicht, Chondrokalzinose
- 3) Degenerative Ursachen: Karpalkanalstenose, Osteoarthritis

- 4) Endokrine Ursachen: Diabetes mellitus, Adipositas, Hypo- und Hyperthyreose, Östrogen-, Progesteron- und Gonadotropin-Störungen, Akromegalie, Störungen des Kalziumhaushalts
- 5) Immunologische Ursachen: Rheumatoide Arthritis, Sklerodermie, Polymyalgia rheumatica, Lupus erythematodes
- 6) Infektiöse Ursachen: Borreliose, Lepra
- 7) Neuropathische Ursachen: generalisierte periphere Polyneuropathie, hereditäre Neuropathie
- 8) Raumfordernde Ursachen: Handödem, Gefäßmissbildungen, Anomalien des *Nervus medianus*, Muskelanomalien
- 9) Amyloidose: ATTRwt, ATTRm, AL- und A $\beta$ 2M-Amyloidose
- 10) Überbelastung: mechanische Beanspruchung durch sich wiederholende Handbewegungen, wie zum Beispiel bei Computerarbeit
- 11) Weitere Ursachen: frühere Frakturen des Handgelenks, Patientinnen nach Operation eines Mammakarzinoms mit Axilladisektion und Ödemneigung, Alkoholexzess, Fibromyalgie, Mukopolysaccharidose

### 1.3.5 Symptome

Im Frühstadium kommt es zur reversiblen Einschränkung der sensiblen Qualitäten des Nervs. Schmerzhaftes Parästhesien (Kribbeln, Taubheit, Einschlafen der Hände) sind die Folge, die vor allem nachts auftreten. Tätigkeiten in Beugestellung der Hand lösen die Missempfindungen ebenfalls aus. Durch Schütteln oder Massieren der Hände bessern sich die Beschwerden. Bei chronischer Kompression persistieren die Symptome und es folgt ein permanentes Taubheitsgefühl der Finger I bis III. Dies beeinträchtigt die Feinmotorik der Finger. Des Weiteren kommt es durch die Abnahme der Innervation zu einer Atrophie des Daumenballens. Liegt eine assoziierte Synovialitis vor, treten Morgensteifigkeit und ein schmerzhaftes Schnapp-Phänomen der Finger auf (*Tendovaginitis stenosans*). Bei sehr schwerer Schädigung des Nervs können vegetative Symptome wie zum Beispiel eine verminderte Schweißsekretion hinzukommen (Assmus, 2015).

### 1.3.6 Diagnostik und Differenzialdiagnostik

Die Diagnose wird klinisch anhand der vorliegenden Symptome gestellt. Ergänzend helfen in der klinischen Untersuchung vor allem im Frühstadium der Erkrankung zum Screening das *Hoffmann-Tinel-Zeichen*, bei dem das Beklopfen des Karpaltunnels zu einschießenden Schmerzen in den Fingern führt, das *Phalen-Zeichen*, bei dem die Schmerzen durch forcierte Flexion oder Extension der Hand ausgelöst werden, sowie das *Flaschenzeichen*, bei dem die Abduktion des Daumens durch den Ausfall des *M. abductor pollicis* eingeschränkt ist und ein runder Gegenstand nicht mehr komplett umschlossen werden kann. All diese Zeichen haben jedoch eine geringe Spezifität und sollten durch elektroneurographische Untersuchungen ergänzt werden. Hierbei werden die sensiblen und motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten überprüft, die durch die Demyelinisierung vermindert sind. Ergänzend können mithilfe der Sonographie der Durchmesser des Karpaltunnels und der Nerven sowie strukturelle Änderungen dargestellt werden (Assmus, 2015).

Differenzialdiagnostisch sind vor allem das radikuläre C6-/ C7-Syndrom sowie die Polyneuropathie zu beachten. Bei beiden sind die Beschwerden nicht auf die Hand beschränkt und in der elektroneurographischen Untersuchung sind andere Nerven und Muskeln mitbetroffen. Häufig treten die genannten Erkrankungen in Kombination mit einem Karpaltunnelsyndrom auf (Assmus, 2015).

### 1.3.7 Therapie

Therapiebedarf besteht bei typischen Symptomen, vor allem bei Beeinträchtigung des Schlafes. Zur konservativen Behandlung stehen unter anderem die Verwendung einer Handgelenksschiene zur Ruhigstellung sowie die orale Einnahme oder lokale Infiltration von Glukokortikoiden mit zeitlich begrenzter Anwendungsdauer zur Verfügung. Bei Versagen der konservativen Therapien besteht die Indikation zur Operation mit dem Ziel der Dekompression des *Nervus medianus*. Es existieren verschiedene Operationstechniken: Die Standardmethode ist die offene Ligament-Spaltung des *Retinaculum flexorum*, die trotz fehlender kompletter Entfernung des Ligaments zu einer ausreichenden Entlastung des Karpaltunnels führt. Ein weiteres Verfahren ist die Resektion des Synovialgewebes des Karpaltunnels ohne Spaltung des Ligaments. Ergänzend entnehmen manche Chirurgen Resektate aus beiden Bereichen des

Karpaltunnels (siehe Abschnitt 2.3.3). Auch endoskopische Verfahren stehen zur Verfügung, wobei die offene chirurgische Technik bisher bevorzugt wird. Die operative Therapie führt häufig zum kompletten Verschwinden der reversiblen Symptome, ist erfolgreicher als die konservative Therapie (Assmus, 2015) und ermöglicht durch die histologische Diagnostik des entnommenen Gewebes eine ätiologische Abklärung.

#### 1.3.8 Prognose und Komplikationen

Nach der frühzeitigen Operation kommt es in etwa 80% der Fälle zu einer deutlichen Symptomverbesserung bzw. -befreiung. In etwa 0,5-3% der operativ behandelten Fälle, bei denen das *Retinaculum flexorum* nicht komplett durchtrennt wurde, kommt es zu Rezidiven (Miamed.Amboss., 2017). Besonders gehäuft treten Rezidive bei Patienten unter langjähriger Dialyse auf. Vor der Diagnosestellung eines Rezidivs gilt es jedoch zu beachten, dass sich trotz Operation die neurographischen Parameter nicht komplett normalisieren und es so zu einer fehlerhaften Einschätzung eines vorliegenden Rezidivs kommen kann. Im Vordergrund stehen immer die Symptome des Patienten (Assmus, 2015).

#### 1.3.9 Zusammenhang des Karpaltunnelsyndroms mit systemischer ATTR-Amyloidose

Das Karpaltunnelsyndrom stellt oft das erste Symptom der ATTRwt dar (Nakagawa et al., 2016). In Kombination mit einer progressiven peripheren, sensomotorischen Polyneuropathie ist es auch ein Warnsymptom für eine FAP (Conceicao et al., 2016). Die Prävalenz der ATTRwt bei Patienten mit operiertem Karpaltunnelsyndrom steigt stetig von fast abwesend bei Patienten unter 49 Jahren zu mehr als 20% bei Patienten über 80 Jahren (Gioeva et al., 2013). Dies ist insbesondere in Hinblick auf die systemische Ausbreitung der ATTRwt relevant. Oftmals finden sich hier Ablagerungen im Herzen (Siddiqi & Ruberg, 2018). Es kommt zu typischen, jedoch unspezifischen kardialen Symptomen wie Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen, zum Beispiel Vorhofflimmern oder AV-Block, und auch zum Perikarderguss (Youngstein et al., 2017). In Hinblick auf eine amyloidogene Ursache der Beschwerden sind die gezielte Diagnostik mittels Kardio-MRT oder Technetium-Szintigraphie (Siddiqi & Ruberg, 2018) sowie die Kombination der kardialen Beschwerden mit weiteren Symptomen,

insbesondere mit einem Karpaltunnelsyndrom (zeitgleich oder in der Vergangenheit) und/oder polyneuropathischen Symptomen, maßgeblich, um eine gezielte Amyloid-Diagnostik in die Wege zu leiten. Die kardiale Beteiligung einer ATTRwt kann durch die sich entwickelnde Herzinsuffizienz gravierende Auswirkungen auf die Lebensqualität eines Patienten haben und die Überlebenszeit um circa 4 Jahre verkürzen (Hawkins et al., 2015).

#### **1.4 Fragestellung**

Der gewebebasierte Nachweis von Amyloid mit Hilfe der Kongorot-Färbung und Polarisationsmikroskopie stellt zwar den Goldstandard der Amyloiddiagnostik dar, hat jedoch unverändert Schwächen in Hinblick auf Sensitivität und Qualität. Der Nachweis der anomalen Polarisationsfarbe im kongorotgefärbten Gewebeschnitt nach der von Puchtler entwickelten Methode ist hochspezifisch für Amyloid (Linke, 2000) und gelingt am besten an einem speziell für Polarisationsmikroskopie ausgerichteten Mikroskop. Weiter verbreitete, handelsübliche (auch hochwertige) Durchlichtmikroskope stehen qualitativ einem „echten“ Polarisationsmikroskop nach und bergen gleichermaßen das Risiko eines falsch-negativen und falsch-positiven Befundes.

Um die Schwächen des bei Kongorot-Färbung polarisationsoptisch geführten Nachweises von Amyloid zu beheben, wurden in den vergangenen Jahren Bemühungen unternommen, neue Farbstoffe und Nachweismethoden zu etablieren. Einer dieser Farbstoffe ist das LCO h-FTAA, das mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden kann. Es ist Bestandteil einer Bibliothek zahlreicher LCPs und LCOs, die von Klingstedt et al. zusammengefasst wurden (Klingstedt et al., 2011). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich LCPs und LCOs aufgrund ihrer flexiblen Struktur hervorragend für einen sensitiven Nachweis von fibrillären Amyloidablagerungen und deren prä-amyloidogenen Ablagerungen eignen (Klingstedt et al., 2013b; Nilsson et al., 2005). So besteht mittels Analyse der Fluoreszenzspektren von beispielsweise p-FTAA bei Bindung an amyloidogene Vorstufen die Möglichkeit, exakter als mittels Kongorot oder Thioflavin T die Kinetik der Entstehung von Amyloidablagerungen darzustellen. Dies ist relevant in Hinblick auf die vermutete Toxizität der prä-fibrillären Amyloid-Vorstufen (Hammarstrom et al., 2010). Sjölander



et al. zeigten bereits die Fähigkeit von h-FTAA, Ablagerungen verschiedener systemischer und lokalisierter Amyloidosen darzustellen. Ergänzend gelang der Nachweis kleinster und potentiell prä-amyloidogener Ablagerungen, sodass h-FTAA im Vergleich mit Kongorot sensitiver zu sein verspricht (Sjolander et al., 2016).

Grundlage dieser Studie war die Beobachtung, dass bei Patienten mit ATTR-Amyloid in Resektaten eines Karpaltunnelsyndroms im kongorotgefärbten Gewebeschnitt weniger Amyloid nachweisbar war als mit einem gegen TTR-gerichteten Antikörper. Es stellte sich die Frage, ob es sich dabei um Amyloid handele oder um prä-amyloidogene Ablagerungen von TTR.

Folgende Hypothesen galt es zu überprüfen:

- 1) Der Nachweis von Amyloid mit Hilfe von h-FTAA ist sensitiver als der Nachweis mit Kongorot und Polarisationsmikroskopie.
- 2) Der Flächenanteil der Anti-TTR-Antikörper (Anti-TTR)-gefärbten Ablagerungen korreliert mit dem Flächenanteil h-FTAA- und kongorotgefärbter Amyloidablagerungen und kann als sensitives Suchverfahren genutzt werden, um den Nachweis von Amyloid und dessen Bestätigung durch Kongorot bzw. h-FTAA zu erleichtern.
- 3) Der Amyloidgehalt in Resektaten eines Karpaltunnelsyndroms korreliert signifikant mit den klinischen Patienteneigenschaften Alter und Geschlecht der Patienten sowie anatomischer Lokalisation der Amyloidablagerungen im Karpaltunnelgewebe.
- 4) Der Amyloidgehalt ist abhängig von der ursprünglichen Lokalisation des entnommenen Gewebes. Bei Patienten mit durch Amyloid verursachtem Karpaltunnelsyndrom enthält das *Retinaculum flexorum* mehr Amyloid als das Synovialgewebe des Karpaltunnels.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethikvotum**

Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel der Deklaration von Helsinki folgend genehmigt (D 581/15-585/15).

### **2.2 Material**

#### **2.2.1 Chemikalien**

h-FTAA (1,5 mM in deionisiertem Wasser) wurde freundlicherweise von Per Hammarström (Linköping, Schweden) zur Verfügung gestellt. Kongorot (Art. Nr. 27215.01) wurde von Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Xylol und Äthanol von Büfa (Lübeck, Deutschland), PBS und Hämatoxylin Gill III von Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Resorcinfuchsin nach Weigert von Waldeck (Münster, Deutschland) und Vectashield DAPI Mounting Medium von Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien, USA) bezogen. DAKO Hamburg lieferte die monoklonalen Antikörper gegen AA-Amyloid sowie die polyklonalen Antikörper gegen Amyloid-P-Komponente, Lambda-Leichtkette und Kappa-Leichtkette. Von Merck Millipore aus Darmstadt wurden Natriumchlorid, Salzsäure, Säurefuchsin, Pikrinsäure und der Antikörper gegen Vitronectin bezogen. Der TTR-3-Antikörper ist ein nicht kommerziell erhältlicher polyklonaler Kaninchen-IgG-Peptid-Antikörper. Dieser wurde ebenso wie die Antikörper gegen AL7 und Apo-A1 von Pineda Antikörper-Service (Berlin, Deutschland) für das Institut für Pathologie Kiel hergestellt und vorab ausgiebig validiert (Gioeva et al., 2013). Der Antikörper gegen AL1-Amyloid ist ebenfalls nicht kommerziell erhältlich und wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Röcken selbst hergestellt.

Für die Kongorot-Färbung nach Puchtler (Puchtler et al., 1962) wurden verschiedene Lösungen vorbereitet. Der Grundansatz bestand aus 30 g Natriumchlorid, das in 1.000 ml 80%igem Äthanol gelöst wurde. Nach 24-stündiger Reifungszeit dienten 500 ml dieser gesättigten Lösung inklusive eines Teils des NaCl-Bodensatzes als Kongorot Stammlösung 1. Für die Kongorot Stammlösung 2 wurden 2,5 g Kongorot in den restlichen 500 ml des Grundansatzes gelöst. Nach weiteren 24 Stunden Reifungszeit wurden für die jeweiligen Gebrauchslösungen zu je 160 ml Stammlösung 2 ml einer 1%igen NaOH-Lösung hinzugegeben. Diese Gebrauchslösungen sind eine Woche lang haltbar.

Für die Elastica-van-Gieson-Färbung wurde das van Gieson-Gemisch als Gebrauchslösung aus 1.000 ml einer wässrigen gesättigten Pikrinsäure, gemischt mit 15 ml einer Lösung aus 1%igem Säurefuchsin in deionisiertem Wasser, hergestellt.

### 2.2.2 Geräte

Für die Durchführung und Auswertung wurden die folgenden Geräte verwendet: Leica Mikrotom und BondMax Färbeautomat (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Tissue Tek Prisma Färbeautomat sowie Tissue Tek Film Eindeckautomat (beide Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, Kalifornien, USA), Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) unter Verwendung von Fluoreszenzfiltern der Firma Semrock, Inc. (Rochester, New York, USA), LEICA SCN400 Scanner (Leica Biosystems) und ZEISS Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (ZEISS Deutschland, Oberkochen, Deutschland).

## 2.3 Patientenkohorte

### 2.3.1 Kohorte A für die Korrelation der Patientendaten mit dem Amyloidgehalt

Aus dem Amyloidregister des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurde eine Kohorte A aus 208 Resektaten von 184 Patienten [105 (57%) Frauen und 79 (43%) Männer] ausgewählt. Alle Resektate zeigten variable Mengen an interstitiellen Amyloidablagerungen mit der charakteristischen gelb-grünen anomalen Polarisationsfarbe im polarisierten Licht nach Kongorot-Färbung. Auswahlkriterium war der histologisch geführte Nachweis von ATTR-Amyloid im Synovialgewebe des Karpaltunnels durch eine starke und homogene Immunreaktion mit einem gegen TTR gerichteten Anti-TTR-Antikörper. Es wurde keine Immunreaktion mit Antikörpern gegen AA-Amyloid, Apolipoprotein A1, Lambda- und Kappa-Leichtketten-Antikörpern (siehe Abschnitt 2.7) nachgewiesen.

Der Zeitraum der Resektion umfasste die Jahre 2010 bis 2015. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 78 Jahre bei einer Altersverteilung von 50 bis 99 Jahren. Bei 24 Patienten [15 (63%) Frauen, 9 (37%) Männer] standen zwei Resektate aufgrund von Operationen beidseitiger Karpaltunnel

oder aber durch erneute Operationen bei rezidivierendem Karpaltunnelsyndrom zur Verfügung. Insgesamt lagen 88 (42,3%) Resektate des linken und 119 (57,2%) des rechten Karpaltunnelgewebes vor. Bei einem Patienten (0,5%) war die anatomische Seite der Resektion unbekannt. Diese Kohorte, im Folgenden Kohorte A genannt, wurde für die Korrelation der Patientendaten mit dem Amyloidgehalt verwendet.

### 2.3.2 Kohorte B für den Vergleich der Färbungen h-FTAA, Kongorot und Anti-TTR

Aus der Kohorte A wurde eine Kohorte B von 48 Patienten [29 (60%) Frauen und 19 (40%) Männer] mit 53 Resektaten anhand des Vorhandenseins von Paraffinblöcken ausgewählt. Das mediane Alter dieser Kohorte B betrug zum Zeitpunkt der Operation 76 Jahre bei einer Altersverteilung von 57 bis 92 Jahren. Bei vier Patienten [3 (75%) Frauen, 1 (25%) Mann] lagen Resektate aus beidseitigen Karpaltunneln vor. Bei einem (2%) männlichen Patienten lagen zwei Resektate von einer Seite vor. Insgesamt bestand das Kollektiv aus 20 (38%) Resektaten vom linken und 33 (62%) Resektaten vom rechten Karpaltunnelgewebe. Diese Kohorte B wurde für den Vergleich der h-FTAA- mit der Kongorot- sowie der Anti-TTR-Färbung verwendet.

### 2.3.3 Kohorte C für den Vergleich des Amyloidgehalts in Resektaten aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels

Die Kohorte C setzte sich aus 15 Patienten der Kohorte A zusammen, wobei von einer Patientin Resektate sowohl der linken als auch der rechten Seite vorlagen. Bei diesen Patienten wurden während der Operation jeweils zwei Resektate aus einem Karpaltunnel entnommen, betitelt als LCT für *Ligamentum carpi transversum/Retinaculum flexorum* (LCT-Kohorte) sowie KTS für Karpaltunnelsyndrom (KTS-Kohorte, Resektate des Synovialgewebes des Karpaltunnels), sodass diese Kohorte C 32 Resektate beinhaltete. Der Zeitraum der Resektion umfasste die Jahre 2011 bis 2015. In dieser Kohorte C lagen Resektate von 4 (27%) Männern und 11 (73%) Frauen vor. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 78 Jahre bei einer Altersverteilung von 66 bis 86 Jahren. Es stammten 16 (50%) Resektate von der linken und 14 (44%) Resektate von der rechten Seite. Bei einem (6%) Patienten war die anatomische Seite der Resektion unbekannt. Anhand dieser Kohorte C wurde der

Unterschied im Amyloidgehalt zwischen den beiden Resektionsorten LCT und KTS ermittelt.

#### **2.4 Histologie und Immunhistochemie**

Alle Resektate waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Von jedem Paraffinblock waren bereits zuvor für die Routinediagnostik 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und mit Hämalaun sowie Kongorot gefärbt worden. Der Nachweis von Amyloid erfolgte primär polarisationsoptisch durch den Nachweis der charakteristischen anomalen Polarisationsfarbe. Anschließend wurde das gefundene Amyloid mit Hilfe der Immunhistochemie klassifiziert (siehe Abschnitt 2.7). Die kongorotgefärbten Gewebeschnitte der Kohorte B wurden, angelehnt an die Methode von Linke (Linke, 2000), zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines ZEISS Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskops begutachtet.

#### **2.5 Kongorot-Färbung für die digitale Bildanalyse**

Für die digitale Bildanalyse wurde die Kongorot-Färbung nach Puchtler geringfügig modifiziert (Puchtler et al., 1962): Die Paraffinschnitte der Kohorte B wurden 2 x 10 min in Xylol entparaffinisiert und 2 x 5 min in 96% Äthanol, 2 x 5 min in 70% Äthanol, 2 x 3 min in 50% Äthanol und 2 x 3 min in deionisiertem Wasser rehydriert. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation der Gewebeschnitte in Gebrauchslösung 1, gefolgt von 15 min in Gebrauchslösung 2 (siehe Abschnitt 2.2.1). Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 15 Sek. in 80% Äthanol inkubiert, für 2 x 2 min in 96% Äthanol und für 5 Sek. in deionisiertem Wasser gewaschen und schließlich mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit Nagellack versiegelt.

Da die Kongorotgebrauchslösungen 1 und 2 eine Woche lang haltbar sind, wurden alle Färbungen dieser Kohorte innerhalb einer Woche durchgeführt, um ein standardisiertes Vorgehen durch Verwendung derselben Färbelösungen einhalten zu können.

## 2.6 h-FTAA-Färbung

Die Paraffinschnitte der Kohorte B für die h-FTAA-Färbung wurden 2 x 10 min in Xylol entparaffinisiert und 2 x 5 min in 96% Äthanol, 2 x 5 min in 70% Äthanol, 2 x 3 min in 50% Äthanol und 2 x 3 min in deionisiertem Wasser rehydriert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit PBS für 10 min inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden dann mit h-FTAA 1,5 mM (Verdünnung 1:500) für 30 min inkubiert, gefolgt von einer Spülung für 10 min in PBS. Die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte wurden schließlich mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium bedeckt, durch ein Deckglas verschlossen und ebenfalls mit Nagellack versiegelt.

## 2.7 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen an den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Resektaten wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen AA-Amyloid (MC1-Klon; Code M0759; 1:2.000) und Vitronectin, polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Amyloid-P-Komponente (Code A0302; 1:2.000), Antikörper gegen die Lambda-Leichtkette (Code A0193; 1:150.000) und die Kappa-Leichtkette (Code A0191; 1:100.000) sowie nicht-kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper gegen Apolipoprotein A1 (Anti-Apo A1; 1:1.000) (Gregorini et al., 2005), gegen von der Lambda-Leichtkette-abgeleitete Amyloidproteine (AL1-Antikörper; 1:250) (Kuci et al., 2007), Anti-Lambda-Leichtketten-Peptidantikörper (AL7- Antikörper; 1:200) (Schonland et al., 2012) und Anti-TTR-Antikörper (TTR3; 1:2.000) (Gioeva et al., 2013) verwendet. Die Färbungen wurden mittels Leica BondMax Färbeautomat unter Verwendung des Bond Polymer Refine Red Detektionssystems voll automatisiert durchgeführt. Je nach Herstelleranweisung wurden für die Antigendemaskierung die ER2-Bond Epitope Retrieval Solution 2 (Amyloid-P-Komponente, Lambda-Leichtkette, Kappa-Leichtkette und TTR3), die ER1-Bond Epitope Retrieval Solution 1 (apo A1, Vitronectin) oder das Enzym 1 (AL7) benutzt. Die Spezifität wurde unter Verwendung von Resektaten, die bekannte Amyloidarten enthalten (AA-Amyloid, ATTR-Amyloid, Lambda-Leichtketten-Amyloid), oder unter Verwendung von Positivkontrollen, die von den Herstellern empfohlen wurden (alle anderen Antikörper), verifiziert. Zusätzlich wurden Tissue-Microarrays (TMA) mit 16 Stanzen aus Gewebe von Leber, AA-, ATTR- und AL $\lambda$ -Amyloid als Positiv- und Negativkontrollen direkt auf dem Objektträger bei jedem Färbedurchgang verwendet. Das Weglassen des primären Antikörpers diente

als weitere Negativkontrolle. Alle in dieser Studie verwendeten Antikörper wurden in der Vergangenheit bereits gründlich validiert und für immunreaktiv mit dem entsprechenden Amyloidprotein befunden. Die Klassifizierung erfolgte wie folgt: Die starke und gleichmäßige Immunfärbung einer Amyloidablagerung durch einen nicht-AL-Antikörper wurde als Beweis gegen das Vorhandensein von AL-Amyloid eingeordnet (so zum Beispiel bei AA-, AApoAl- oder ATTR-Amyloid). Eine AL-Amyloidose hingegen wurde diagnostiziert, wenn mindestens einer der im Folgenden genannten Antikörper immunreaktiv war: AL1, AL7, Anti-Lambda-Leichtkette, AK3 und Anti-Kappa-Leichtkette. Alle anderen Antikörper, die nicht die AL-Amyloidose identifizierten, waren in diesem Fall definitionsgemäß negativ (Rocken et al., 1996).

## **2.8 Elastica-van-Gieson-Färbung**

Die Elastica-van-Gieson-Färbung wurde exemplarisch an 11 in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten der Kohorte B mittels des Färbeautomats Tissue Tek Prisma durchgeführt. Nach 2 x 3 min Entparaffinisierung in Xylol erfolgte die Rehydrierung 1 x 1 min in 100% Äthanol, 1 x 1 min in 96% Äthanol, 1 x 1 min in 70% Äthanol und 1 x 1 min in deionisiertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte 45 min in Resorcinfuchsin nach Weigert inkubiert. Nach einer 20-sekündigen Spülung in deionisiertem Wasser folgte die 5-minütige Inkubation mit Hämatoxylin Gill III, woraufhin für 15 Sek. in deionisiertem Wasser gespült wurde. Es folgten 20 Sek. in einem Salzsäure-Äthanol-Gemisch und anschließend 5 min Inkubation in deionisiertem Wasser. Nun wurden die Gewebeschnitte 5 min in dem van Gieson-Gemisch (siehe Abschnitt 2.2.1) inkubiert. Nach kurzen Inkubationen in deionisiertem Wasser für 15 Sek., in 96% Äthanol für 15 Sek. und in 100% Äthanol für 30 Sek. erfolgte abschließend die 2-minütige Inkubation in Xylol, bevor der Färbeprozess mit der automatischen Eindeckung mittels des Eindeckautomaten Tissue Tek Film beendet wurde.

## **2.9 Scanvorgang und Arealauswahl für den Vergleich der drei Färbungen**

Die kongorotgefärbten sowie die h-FTAA-gefärbten und eingedeckten Gewebeschnitte der Kohorte B wurden mit dem Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner einen Tag nach der Färbung mit den folgenden Einstellungen eingescannt: Fluoreszenzlicht, 400-

fache Auflösung, DAPI (Anregungswellenlänge/Bandbreite = 370/36 nm; Emissionswellenlänge/Bandbreite = 440/40 nm) als Fokusfilter (mit doppelter Belichtungszeit), Alexa555 (Anregungswellenlänge/Bandbreite = 560/25 nm; Emissionswellenlänge/Bandbreite = 607/36 nm) als Fluoreszenzfilter für die Kongorot-Färbung (mit vierfacher Belichtungszeit) und Alexa488 (Anregungswellenlänge/Bandbreite = 485/20 nm; Emissionswellenlänge/Bandbreite = 525/35 nm) als Fluoreszenzfilter für die h-FTAA-Färbung (mit vierfacher Belichtungszeit). Die Anti-TTR-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit demselben Hamamatsu NanoZoomer 2. ORS-Scanner ebenfalls in 400-facher Auflösung unter Hellfeld-Einstellung gescannt. Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte derselben Kohorte, die weder mit Kongorot noch mit h-FTAA gefärbt worden waren.

Mithilfe des Programms NDP.view 2 von Hamamatsu konnten die gescannten Gewebeschnitte am Computer betrachtet und weiter verwendet werden. Die drei Bilddateien eines Patienten, jeweils gefärbt in h-FTAA, Kongorot und mit Anti-TTR, wurden nebeneinander geöffnet, um direkt aufeinanderfolgende Areale zu identifizieren und als TIFF-Datei in 200-facher Vergrößerung zu exportieren. Pro Patient wurden zumeist drei Areale in 200-facher Vergrößerung mit einem beliebigen Amyloidgehalt ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.4).

## **2.10 Quantifizierung des Amyloidgehalts für den Vergleich der drei Färbungen**

Der Gehalt des im ausgewählten Areal enthaltenen Amyloids wurde bewertet, indem Pixel mit der Farbschwellenwertfunktion des frei verfügbaren, Java-basierten Bildverarbeitungsprogramms ImageJ 1.48v (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) im *Hue/Saturation/Brightness* (HSB)-Farbmodell gezählt wurden. Für alle 142 ausgewählten Areale der Kohorte B wurden die folgenden Farbschwellenwerte sowohl für die Kongorot- als auch für die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte verwendet: Farbwert (*Hue*) 0-255, Sättigung (*Saturation*) 0-255 und Helligkeit (*Brightness*) 47-255. Die folgenden Farbschwellenwerte wurden für die Anti-TTR-gefärbten Gewebeschnitte verwendet, mit leichter Modifizierung angelehnt an Kristen et al. (Kristen et al., 2016): Farbwert 0-40 und 227-255, Sättigung 90-255 und Helligkeit 0-255. Der Prozentsatz der Amyloid-darstellenden Pixel in Bezug zur Anzahl der Pixel des gesamten ausgewählten Gewebeareals (entsprechend der gesamten Pixelanzahl



der TIFF-Datei) wurde berechnet und zwischen den drei unterschiedlich gefärbten Serienschnitten verglichen.

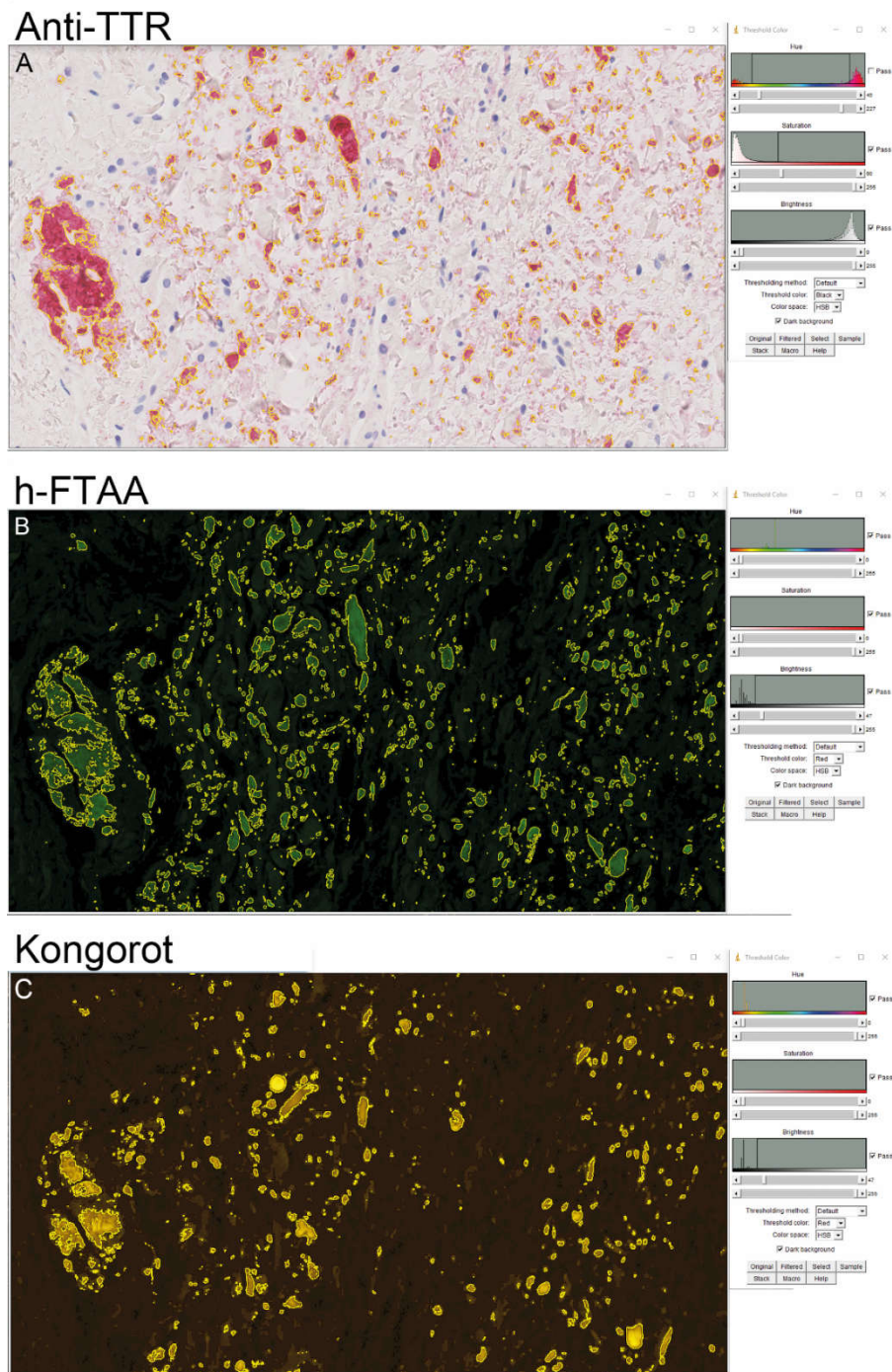


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Amyloidgehalts in jeweils einzelnen ausgewählten Arealen mittels ImageJ. Gezeigt ist ein Areal in den jeweiligen Färbungen Anti-TTR (A), h-FTAA (B) und Kongorot (C). Gelb umrandet sind die über die Farbschwellenwertfunktion (siehe jeweils rechts im Bild) identifizierten Amyloid-darstellenden Pixel. Farbschwellenwerte für die Anti-TTR-gefärbten Areale: Farbwert 0-40 und 227-255, Sättigung 90-255 und Helligkeit 0-255. Farbschwellenwerte für die h-FTAA- und kongorotgefärbten Areale: Farbwert 0-255, Sättigung 0-255 und Helligkeit 47-255. Die Abbildung wurde für den Druck der Dissertation in Helligkeit und Kontrast angepasst. Für die Auswertung wurden die unangepassten Bilddateien verwendet.

### **2.11 Scanvorgang und ImageJ-Berechnung für die Korrelation zwischen Amyloidgehalt und klinischen Patienteneigenschaften**

Der Amyloidgehalt im Synovialgewebe des Karpaltunnels wurde mit folgenden Patienteneigenschaften korreliert: Alter und Geschlecht der Patienten sowie Zeitpunkt und anatomische Körperseite der Gewebeentnahme. Dazu wurden Anti-TTR-gefärbte Gewebeschnitte unter Verwendung eines LEICA SCN400 Scanners mit 400-facher Vergrößerung gescannt und als TIFF-Dateien in 200-facher Vergrößerung exportiert. Artefakte durch Farbstoffreste oder durch Verschmutzung des Objektträgers um die Gewebeschnitte herum wurden manuell mittels der Bildbearbeitungssoftware GIMP 2 entfernt. Anschließend wurde der Amyloidgehalt im gesamten Gewebeschnitt eines jeden Patienten mit ImageJ 1.48v berechnet, indem der Flächenanteil der Amyloid-darstellenden Pixel zu dem Flächenanteil der den gesamten Gewebeschnitt darstellenden Pixel in Relation gesetzt wurde.

Um die Gesamtmenge des vorhandenen Gewebes in der gescannten TIFF-Datei herauszufinden, wurde die Menge an Hintergrundpixeln mit der Farbschwellenwert-Funktion mit den folgenden Farbschwellenwerten berechnet: Farbwert 0-255, Sättigung 0-255, Helligkeit 220-255. Diese wurden von der Pixelmenge der gesamten TIFF-Datei abgezogen, um die Anzahl der Pixel des Gewebeschnitts zu erhalten. Die Menge der Amyloid-darstellenden Pixel im Gewebe wurde mithilfe der folgenden Einstellungen berechnet: Farbwert 0-40 und 227-255, Sättigung 90-255, Helligkeit 0-255. Daraufhin wurde das Verhältnis von Gewebe darstellenden Pixeln zu Amyloid-darstellenden Pixeln berechnet.

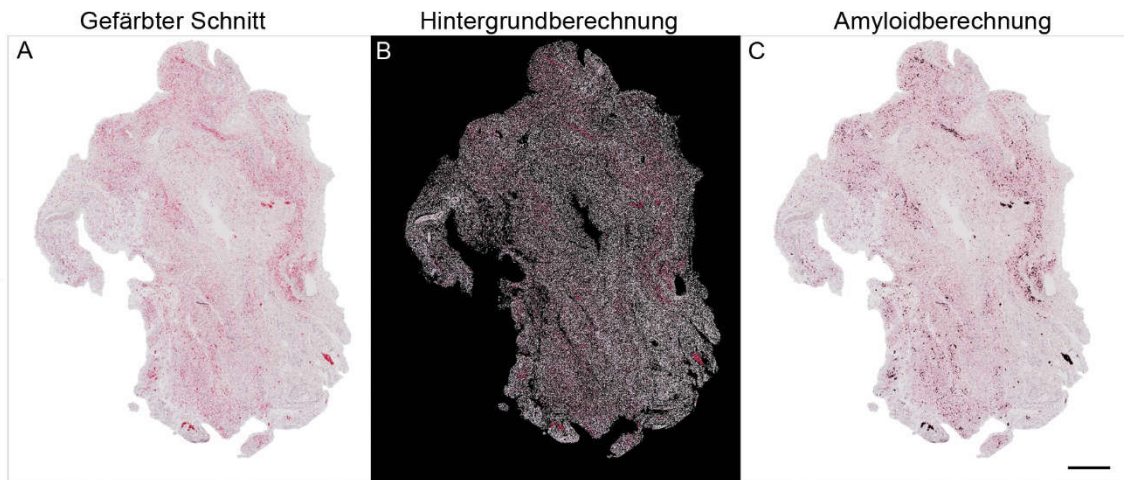


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Amyloidgehalts im gesamten Gewebe mittels ImageJ. A: Gezeigt ist ein Gewebeschnitt, der mit Anti-TTR-Antikörper gefärbt und anschließend mittels LEICA SCN400 Scanner eingescannt wurde. B: Für die Berechnung der Pixelanzahl des gesamten Gewebes wurden die Hintergrundpixel (hier in schwarz) mit den Farbschwellenwerteinstellungen Farbwert 0-255, Sättigung 0-255 und Helligkeit 220-255 berechnet und von der Pixelmenge der gesamten TIFF-Datei abgezogen, um die Anzahl der Pixel des Gewebeschnitts zu erhalten. C: Für die Berechnung der Amyloid-darstellenden Pixel (hier in schwarz) wurden folgende Farbschwellenwerte eingestellt: Farbwert 0-40 und 227-255, Sättigung 90-255, Helligkeit 0-255. 10-fache Vergrößerung, Maßstab 1.000  $\mu\text{m}$ .

## 2.12 Vergleich des Amyloidgehalts in Resektaten aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels

Bei einigen Patienten lagen Resektate aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels vor (LCT- und KTS-Kohorte, siehe Abschnitt 2.3.3). Sie wurden mittels Anti-TTR immunhistochemisch gefärbt. Der Amyloidgehalt in den Resektaten der LCT-Kohorte wurde mit dem Amyloidgehalt in den Resektaten der KTS-Kohorte verglichen, um einen eventuell vorliegenden Probensammelfehler aufzudecken. Dabei wurde der Amyloidgehalt im jeweiligen gesamten Resektat genauso ermittelt wie für die Korrelation zwischen Amyloidgehalt und klinischen Patienteneigenschaften (siehe Abschnitt 2.11).

## 2.13 Berechnung der Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome

Seit 2010 werden die im Amyloidregister Kiel eingehenden Fälle systematisch archiviert. Von 2010 bis Anfang 2018 wurden 582 histologische Resektate mit ATTR-

Amyloid im Karpaltunnelgewebe zusammengetragen. Die Resektate wurden in Hinblick auf Alter und Geschlecht der Patienten untersucht. Durch den Vergleich der insgesamt eingegangenen Fälle von Resektaten des Karpaltunnelgewebes mit den Fällen von Resektaten des Karpaltunnelgewebes, die ATTR-Amyloid enthalten, konnte die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome berechnet werden.

## **2.14 Statistik**

Die statistische Analyse wurde mittels SPSS Version 20 (International Business Machines, Armonk, New York, USA) durchgeführt. Kontinuierliche Daten wurden als Median ausgedrückt und reichten von der ersten bis zur dritten Quartile. Kategoriale Variablen wurden als absolute Zahlen und Prozentsätze ausgedrückt. Die Gleichförmigkeit der Prävalenz von Geschlecht und anatomischer Lokalisation wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Der Pearson-Korrelationskoeffizient und die lineare Regressionsanalyse wurden verwendet, um die Korrelation zwischen kontinuierlichen Variablen (nachweisbarer Amyloidgehalt der verschiedenen Färbeverfahren, Alter) zu bewerten. Die Unterschiede der Verteilung der kontinuierlichen Daten (Amyloidgehalt, Alter) zwischen den Gruppen wurden unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für ungepaarte Daten (Geschlecht, anatomische Seite, Altersgruppe) und des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests für gepaarte Daten (Wiederholungsbiopsie) getestet. Für die Berechnung des unterschiedlichen Amyloidgehalts in verschiedenen Regionen des Karpaltunnels wurde ebenfalls der Wilcoxon-Signed-Rank-Test verwendet. Ein Signifikanzniveau von 0,05 wurde angenommen.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Methodenetablierung**

3.1.1 Die Verdünnung 1:500 der h-FTAA-Stammlösung eignet sich für die distinkte h-FTAA-Färbung.

Die h-FTAA-Stammlösung (1,5 mM h-FTAA in deionisiertem Wasser) wird standardmäßig für den Färbeprozess verdünnt. Um die geeignete Verdünnungsstufe für den Vergleich der h-FTAA- mit der Kongorot- und der Anti-TTR-Färbung herauszuarbeiten, wurden zufällig ausgewählte Gewebeschnitte des Kollektivs in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:500, 1:1.000, 1:1.500, 1:2.500 und 1:5.000) gefärbt, fluoreszenzmikroskopiert und anschließend mit dem Hamamatsu NanoZommer 2. ORS-Scanners eingescannt. Nach Begutachtung dieser und im Vergleich mit den kongorotgefärbten Gewebeschnitten durch einen erfahrenen Pathologen wurde die Verdünnung 1:500 aufgrund der distinkten, aber nicht überstrahlten Darstellung der Amyloidablagerungen als geeignete Verdünnungsstufe ausgewählt und im Folgenden verwendet.

3.1.2 Die Modifikation der Kongorot-Färbung optimiert den Scanvorgang.

Die Kongorot-Färbung lässt sich bei Betrachtung unter einem Hellfeldmikroskop nicht verwerten, da die dezente Rotfärbung des Farbstoffes nicht spezifisch ist. Auch andere Strukturen im Gewebe, wie beispielsweise Kollagenfasern, zeigen im Durchlicht eine rötliche Färbung. Daher verwendet man die Polarisationsmikroskopie (siehe Abschnitt 1.2.1.1). Für die in dieser Arbeit vollzogene quantitative Berechnung des Amyloidgehalts war das Einscannen der Gewebeschnitte notwendig. Handelsübliche Scanner bieten jedoch nicht die Möglichkeit, Gewebeschnitte im polarisierten Licht einzuscannen. Aus diesem Grund wurden die kongorotgefärbten Gewebeschnitte fluoreszenzmikroskopisch eingescannt. Dies stellt das sensitivste Verfahren des kongorotbasierten Nachweises von Amyloid dar (Linke, 2000). Um während des Scanvorgangs unabhängig vom Amyloidgehalt des Gewebes die Gewebeschnittebene fokussieren zu können, wurden die Zellkerne fokussiert. Hierfür wurde eine DAPI-Zellkernfärbung benötigt, weshalb das Färbeprotokoll der Kongorot-Färbung nach Puchtler optimiert wurde: Auf die Zellkernfärbung mittels der standardmäßig verwendeten Hämalaun-Färbung nach Mayer wurde verzichtet und das Färbeprotokoll wurde um die DAPI-

Zellkernfärbung mittels eines DAPI-haltigen Eindeckmediums erweitert. In der Polarisationsmikroskopie und in der CRF konnte beim Amyloidnachweis kein Unterschied zwischen den für die Routinediagnostik kongorot- sowie hämalaungefärbten und den für die digitale Bildanalyse kongorot- sowie DAPI-gefärbten Gewebeschnitten festgestellt werden, sodass die Anpassung des Färbeprotokolls keine Einschränkung darstellte.

### 3.1.3 Die Kombination der Kongorot-Färbung mit der DAPI-Zellkernfärbung gelingt mittels eines DAPI-haltigen Eindeckmediums.

Die Darstellung der Zellkerne war für das fokussierte Einscannen der Gewebeschnitte vonnöten. Standardmäßig werden Zellkerne für die Darstellung in der Fluoreszenzmikroskopie mit DAPI gefärbt. Die direkte Kombination aus DAPI-Zellkernfärbung mit anschließender Kongorot-Färbung in einem Protokoll gelang nicht, denn bei Betrachtung der Gewebeschnitte im Fluoreszenzmikroskop waren keine Zellkerne sichtbar. Es wurde entschieden, ein DAPI-Eindeckmedium zu verwenden, das nicht mit der Kongorot-Färbung intervenierte. Für ein standardisiertes Vorgehen wurden ebenfalls die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte mit dem DAPI-Eindeckmedium eingedeckt, und es wurde keine direkte Kombination aus h-FTAA-Färbung und DAPI-Zellkernfärbung in einem Protokoll durchgeführt. Laut Standard-Färbeprotokoll von Puchtler et al. (Puchtler et al., 1962) werden die Gewebeschnitte vor dem Eindecken in Permount Eindeckmedium mit Xylol geklärt. Die Verwendung von Xylol vor dem Eindecken in DAPI-Eindeckmedium behinderte jedoch die homogene Verteilung des DAPI-Eindeckmediums und somit auch das Einscannen der Gewebeschnitte. Die Qualität der DAPI-Eindeckung wurde optimiert durch eine vorherige Differenzierung der bereits kongorot- oder h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte mit Äthanol und abschließender kurzer Spülung in deionisiertem Wasser ohne Verwendung von Xylol.

### 3.1.4 Die Anpassung der Scanner-Einstellungen Fokusfilter und Belichtungszeit erzeugt ein zufriedenstellendes Scan-Ergebnis.

Anhand von Probeschnitten des Kollektivs wurden sowohl für die h-FTAA- als auch für die Kongorot-Färbung die am Scanner vorzunehmenden Einstellungen Fokusfilter und

Belichtungszeit optimiert. Zunächst wurde der für die Fokussierung der Gewebeschnitte zu verwendende Fluoreszenzfilter festgelegt. Die Amyloidablagerungen, die in jedem Gewebeschnitt unterschiedlich und unregelmäßig ausgeprägt waren, eigneten sich nicht für die Fokussierung. Zellkerne hingegen sind ubiquitär im Gewebe verteilt und können durch den Scanner fokussiert werden. Die Zellkerne wurden zuvor durch ein DAPI-haltiges Eindeckmedium angefärbt (siehe Abschnitt 3.1.3), sodass der DAPI-Fluoreszenzfilter als Fokusfilter festgelegt wurde. Ein scharf eingescanntes Bild wurde durch gleichmäßig über den Gewebeschnitt gesetzte Fokuspunkte auf die DAPI-gefärbten Zellkerne gewährleistet. In seltenen Fällen war es aufgrund von Unebenheiten in einem Gewebeschnitt nicht möglich, diesen komplett scharf fokussiert zu scannen. Durch die gewählte Fokussierung war es auch möglich, die Negativkontrollen ohne Färbung mit h-FTAA oder Kongorot, die auch mittels DAPI-haltigem Eindeckmedium eingedeckt worden waren, in guter Qualität einzuscannen (siehe Abbildung 6).

Darüber hinaus galt es, die Belichtungszeiten einzustellen. Das DAPI-Signal war mit einfacher Belichtungszeit zu schwach. Mit zweifacher Belichtungszeit war es eindeutig darstellbar, ohne dabei überstrahlt zu werden. Für die kongorotgefärbten Gewebeschnitte war selbst die zweifache Belichtungszeit zu dunkel, und es wurde die vierfache Belichtungszeit benötigt, um die CRF gut abbilden zu können. Auch für die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte eignete sich die vierfache Belichtungszeit am besten, um selbst einzelne Amyloidablagerungen von wenigen  $\mu\text{m}$  Größe zur Darstellung zu bringen, ohne das Gewebe dabei zu überstrahlen. Die einfache Farb-Balance zwischen den Farben rot, grün und blau wurde nicht verändert. Es wurde darauf geachtet, die unterschiedlich gefärbten Gewebeschnitte eines Patienten in gleicher Bildgröße (in cm) zu scannen.

Die ausgewerteten Areale wurden repräsentativ für den gesamten Gewebeschnitt ausgewählt. Um anschließend den Amyloidgehalt standardisiert bestimmen zu können, wurde der zu exportierende Arealausschnitt in jeder Bilddatei gewebefüllend ausgewählt. Randständige Amyloidablagerungen konnten somit teilweise nicht berücksichtigt werden. Gefäße, die im exportierten Bild als gewebeunterbrechend erschienen, wurden als zum Gewebe gehörend bewertet und dienten oftmals als Orientierung für die Auswahl der direkt aufeinanderfolgenden Areale in den verschiedenen Färbungen. Aufgrund kleiner Resektatgröße oder geringen Amyloidgehalts konnten in

einigen Gewebeschnitten nur ein bis zwei Areale in 200-facher Vergrößerung für die Auswertung ausgewählt werden. Insgesamt entstanden durch dieses Verfahren 142 auszuwertende Areale aus den 53 Resektaten des Kollektivs B.

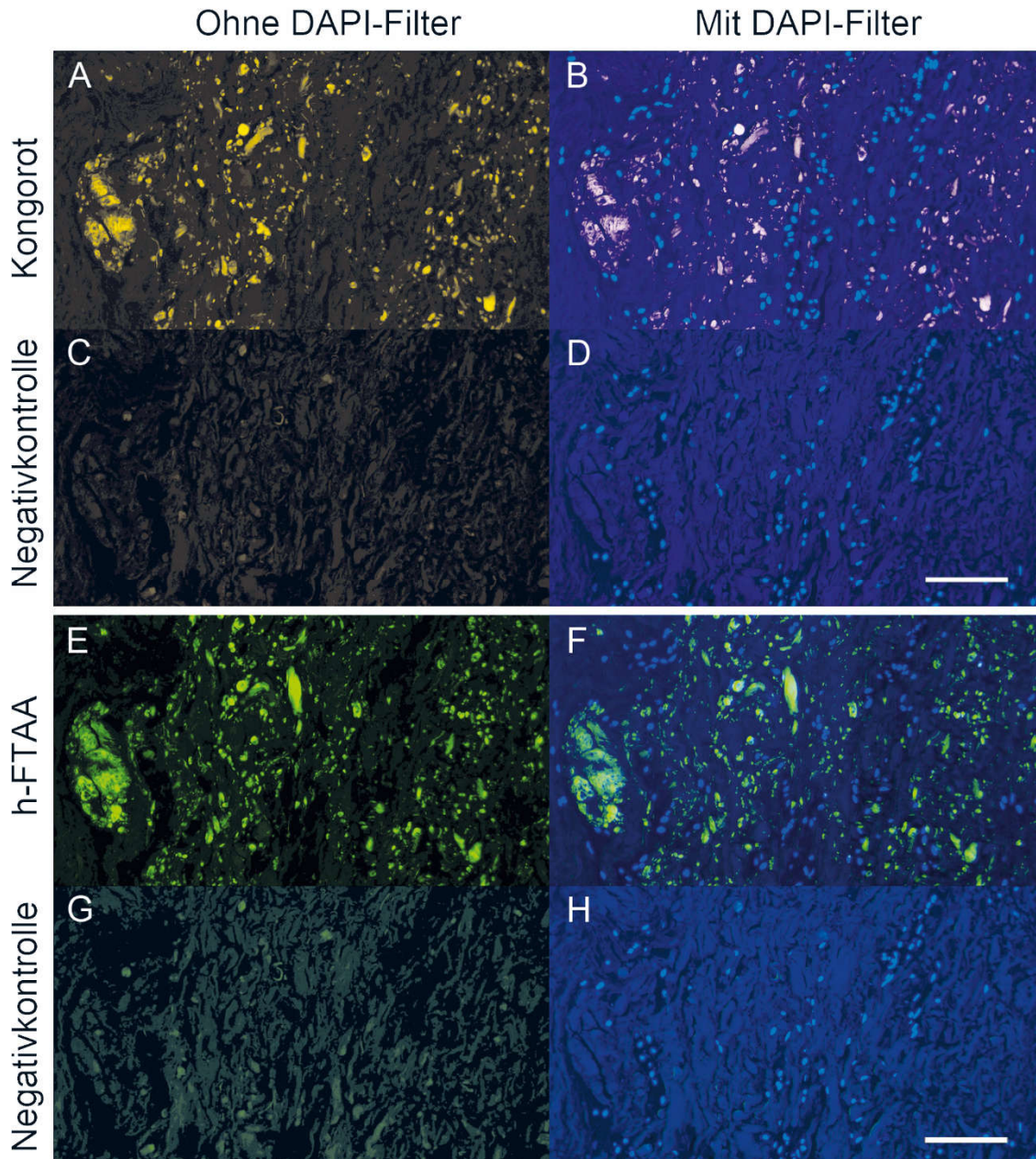


Abbildung 6: Der Vergleich zwischen kongorot- und h-FTAA-gefärbten Arealen sowie Negativkontrollen ohne Kongorot- oder h-FTAA-Färbung. A-D: Für die kongorotgefärbten Gewebeschnitte wurde am Hamamatsu Fluoreszenzscanner der Fluoreszenzfilter Alexa555 verwendet. 200-fache Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . E-H: Für die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte wurde am Fluoreszenzscanner der Fluoreszenzfilter Alexa488 verwendet. 200-fache Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . A, C, E, G: Die gefärbten Areale in der Darstellung mit ausgeblendetem DAPI-Filter, der als Fokusfilter für das Scannen diente. B, D, F, H: Die gefärbten Areale in der Darstellung mit DAPI-Filter. Die Abbildung wurde für den Druck der Dissertation in Helligkeit und Kontrast angepasst. Für die Auswertung wurden die unangepassten Bilddateien verwendet.



3.1.5 Die Ermittlung der passenden Farbschwellenwerte im Programm ImageJ ermöglicht eine standardisierte Quantifizierung des Amyloidgehalts.

Für die Quantifizierung des Amyloidgehalts wurde die Farbschwellenwertfunktion des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ 1.48v verwendet. Bevor mit der Auswertung des Studienkollektivs begonnen werden konnte, wurden die Farbschwellenwerte bestimmt, die am sensitivsten die Anzahl der die Amyloidablagerungen darstellenden Pixel in der jeweiligen TIFF-Datei berechnete. Dazu wurde an 20 zufällig ausgewählten Resektaten des Studienkollektivs die Menge an Amyloid-darstellenden Pixeln mit jeweils eigenen Farbschwellenwerten für die Amyloid-darstellenden Pixel in TIFF-Dateien der eingescannten kongorotgefärbten Gewebeschnitte sowie der h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte identifiziert. Hierbei wurden sowohl Areale mit vielen als auch mit wenigen Amyloidablagerungen berücksichtigt. Aus den jeweils eigenen Farbschwellenwerten für Kongorot und h-FTAA wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde für eine standardisierte Auswertung sowohl für die kongorotgefärbten als auch für die h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitte des gesamten Studienkollektivs verwendet (siehe Abschnitt 2.10).

3.1.6 Die Herstellung neuer Serienschnitte ist nötig für den Vergleich der drei Färbungen in direkt aufeinanderfolgenden Arealen von Serienschnitten.

Im Laufe der Methodenetablierung stellte sich heraus, dass die im Archiv bereits vorhandenen Leerschnitte nicht aufeinanderfolgenden Serienschnitten entsprachen. Der korrekte Vergleich des nachweisbaren Amyloids in den drei Färbungen war ohne direkt aufeinanderfolgende Serienschnitte nicht möglich, weil ohne direkt aufeinanderfolgende Serienschnitte der Amyloidgehalt in Gewebeschnitten ein und desselben Resektats zu sehr schwankte. Dementsprechend wurden von den Paraffinblöcken der Gewebeschnitte von Kohorte B erneut 2 µm dicke Serienschnitte an einem Leica Mikrotom angefertigt und über Nacht im Brutschrank bei 54 °C getrocknet.

### 3.2 Das Studiendesign in der Übersicht

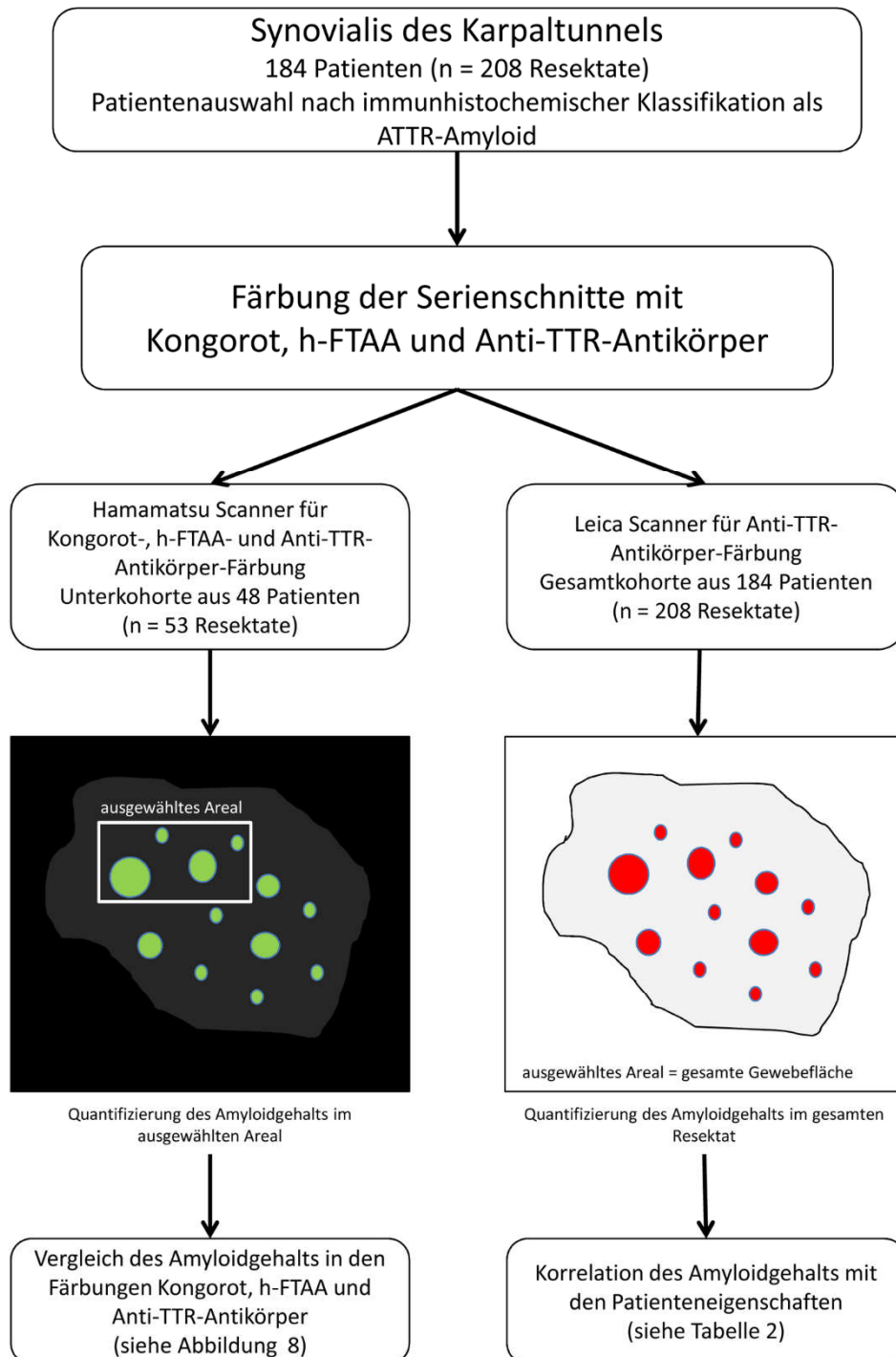


Abbildung 7: Übersichtsdarstellung des Studiendesigns.

### 3.3 Im Vergleich mit der Kongorot- und der Anti-TTR-Färbung hat die h-FTAA-Färbung eine höhere Sensitivität für den Nachweis von Amyloid.

Zuerst wurde die Färbung von h-FTAA mit der Kongorot- und mit der Anti-TTR-Färbung verglichen. Serienschnitte der zufällig ausgewählten Kohorte B wurden mit h-FTAA, Kongorot und Anti-TTR gefärbt (siehe Abbildung 8). Alle Resektate enthielten Amyloid, was durch die Kongorot-Färbung polarisationsmikroskopisch bestätigt worden war, und zeigten eine positive Reaktion mit h-FTAA und Immunreaktivität für TTR. Interessanterweise stellten sich sowohl in der h-FTAA- als auch in der Anti-TTR-Färbung angefärbte Areale von unter 2  $\mu\text{m}$  Größe dar, die als Amyloidablagerungen bewertet werden können. Diese waren in den kongorotgefärbten Gewebeschnitten weder polarisations- noch fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.

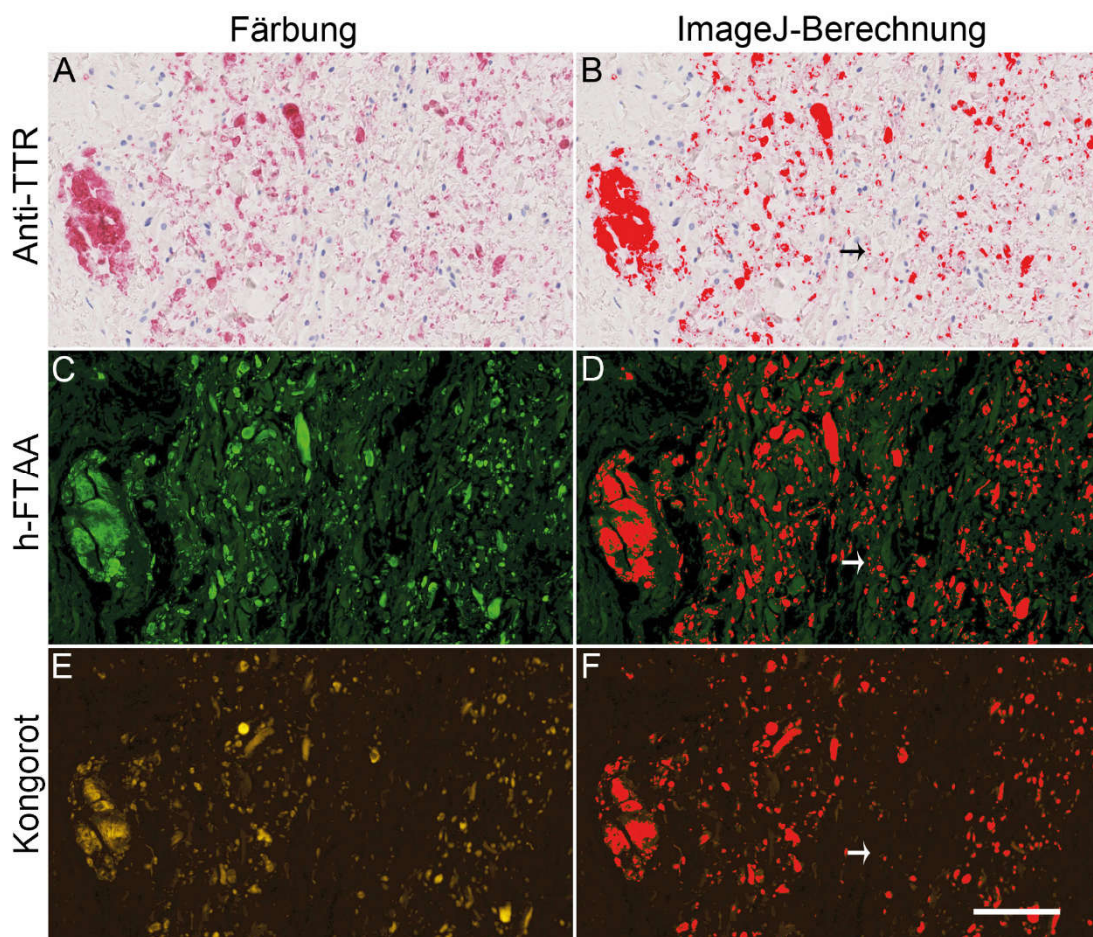


Abbildung 8: Vergleich von Anti-TTR- (A, B), h-FTAA- (C, D) und Kongorot- (E, F) Färbung in Serienschnitten des Synovialgewebes des Karpaltunnels. A, C und E zeigen die jeweilige Färbung. B, D und F zeigen die ImageJ-Berechnung. Exemplarisch gesetzte Pfeile in B, D und F zeigen Amyloidablagerungen von unter 2  $\mu\text{m}$  Größe, die in der Kongorot-Färbung nicht zur Darstellung kommen. 200-fache Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung wurde für den Druck der Dissertation in Helligkeit und Kontrast angepasst. Für die Auswertung wurden die unangepassten Bilddateien verwendet.

Um die Empfindlichkeit der einzelnen Färbeverfahren zu beurteilen, wurden 142 ausgewählte Areale mittels eines Hamamatsu Fluoreszenzscanners digitalisiert (siehe Abschnitt 2.9 und Abschnitt 3.1.4). Aus jedem Gewebeschnitt wurden in den direkt aufeinanderfolgenden Serienschnitten übereinstimmende Areale ausgewählt, und der Amyloidgehalt wurde quantifiziert. Insgesamt wurden 426 TIFF-Dateien von den 53 verschiedenen Resektaten des Kollektivs B in den drei unterschiedlichen Färbungen erstellt und bewertet.

Die computerbasierte Quantifizierung der gescannten Gewebeschnitte lieferte ein Maß für den Amyloidgehalt im ausgewählten Bereich. Der höchste prozentuale Anteil an Amyloid in den untersuchten Arealen wurde in den Anti-TTR-gefärbten Gewebeschnitten (44%) nachgewiesen, gefolgt von den h-FTAA- (32%) und den kongorotgefärbten (26%) Gewebeschnitten. Der mediane Amyloidgehalt betrug 5,3% für h-FTAA, 4,9% für Anti-TTR und 1,9% für Kongorot. Die lineare Regressionsanalyse für die Ergebnisse war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ; Abbildung 9). Der Pearson-Korrelationskoeffizient war hoch und betrug 0,80 für Kongorot gegen h-FTAA, 0,82 für Kongorot gegen Anti-TTR und 0,88 für Anti-TTR gegen h-FTAA. Diese Ergebnisse zeigen, dass die h-FTAA-Färbung eine höhere Sensitivität für den Nachweis von ATTR-Amyloid hat als Kongorot und insbesondere den Nachweis von kleinen, punktförmigen Amyloidablagerungen verbessert, die in der Kongorot-Färbung in Verbindung mit der Polarisationsmikroskopie oft schwierig oder gar nicht zu erkennen sind.

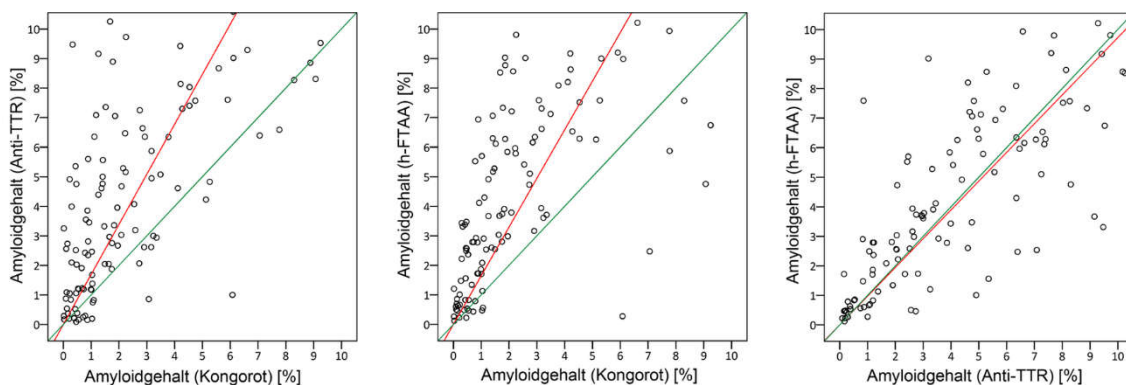


Abbildung 9: Lineare Regressionsanalyse der Korrelationen zwischen den verschiedenen Färbungen. Anti-TTR- gegen Kongorot-Färbung (Pearsons Korrelationskoeffizient 0,819), h-FTAA- gegen Kongorot-Färbung (Pearsons Korrelationskoeffizient 0,800) und h-FTAA- gegen Anti-TTR-Färbung (Pearsons Korrelationskoeffizient 0,877). Die grüne Linie stellt die Referenzlinie für optimale Korrelation dar, die rote Linie die Korrelation durch die jeweiligen Messwerte („Fit Line for Total“).

### **3.4 Die Quantifizierung des Amyloidgehalts in der Kohorte A ermöglicht die Korrelation mit den klinischen Patienteneigenschaften Alter, Geschlecht und anatomischer Lokalisation des Karpaltunnelsyndroms.**

Die vorliegende Computeranalyse stellt ein objektives Maß für die Variabilität des Amyloidgehalts zwischen den Patienten dar. Es wurde die Frage geklärt, ob der Amyloidgehalt alters- und/ oder geschlechtsspezifische Unterschiede zeigt.

Hierfür wurden Anti-TTR-gefärbte Gewebeschnitte verwendet, da diese das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei geringer Vergrößerung bereitstellten, die richtige Erkennung des Gewebebereiches ermöglichten und somit die Beurteilung des gesamten Gewebeschnitts erleichterten, wodurch ein untersucherbezogener Selektionsbias vermieden werden konnte. Es wurden Gewebeschnitte von 184 Patienten digitalisiert. Bei 24 Patienten dieser Kohorte A wurden mehrfach Resektionen durchgeführt, wodurch zwei Resektate von der gleichen oder kontralateralen anatomischen Seite zur Verfügung standen (insgesamt  $n = 208$ ). Für die Korrelation zwischen Amyloidgehalt und Patientendaten wurde nur das jeweils erste Resektat in die Analyse einbezogen (siehe Tabelle 2), dementsprechend bestand die Analyse aus 112 (60,9%) Resektaten der rechten Seite, 71 (38,6%) Resektaten der linken Seite und einem (0,5%) Resektat mit unbekannter Seite.

Der mediane Amyloidgehalt in den 184 Resektaten betrug 2,19% (Spannweite 0,01% - 57,39%; siehe Abbildung 11). Die Korrelation des Vorhandenseins von Amyloid mit klinischen Patienteneigenschaften zeigte, dass die Kohorte signifikant mehr Frauen ( $p = <0,001$ ) und signifikant mehr Resektate der rechten Seite enthielt (sowohl in der Auswertung für alle Patienten gemeinsam als auch in der geschlechtsspezifischen Auswertung, jeweils  $p = <0,001$ ). Darüber hinaus war das mediane Alter der Frauen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant höher im Vergleich zu dem der Männer [79 Jahre (Spannweite 50 Jahre - 95 Jahre) versus 76 Jahre (Spannweite 52 Jahre - 99 Jahre);  $p = 0,008$ ; siehe Abbildung 10].

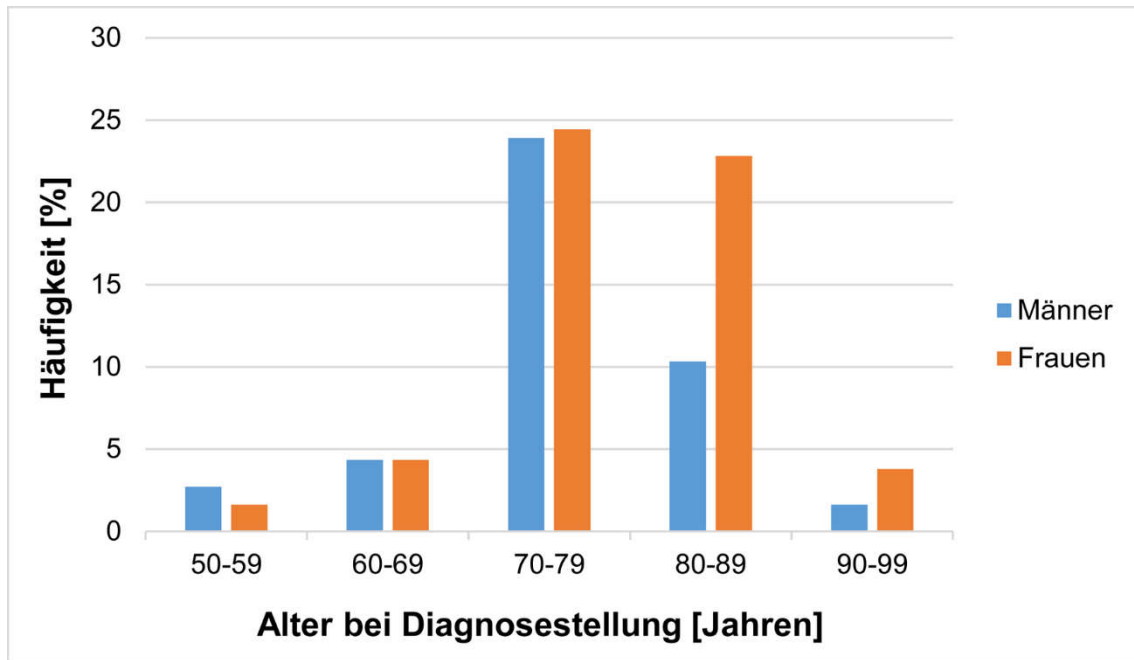


Abbildung 10: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Alters in Jahren bei Diagnosestellung, für Männer und Frauen getrennt. Frauen sind bei Diagnosestellung signifikant älter als Männer ( $p = 0,008$ ). Das mediane Alter der Frauen bei Diagnosestellung beträgt 79 Jahre und das der Männer 76 Jahre.

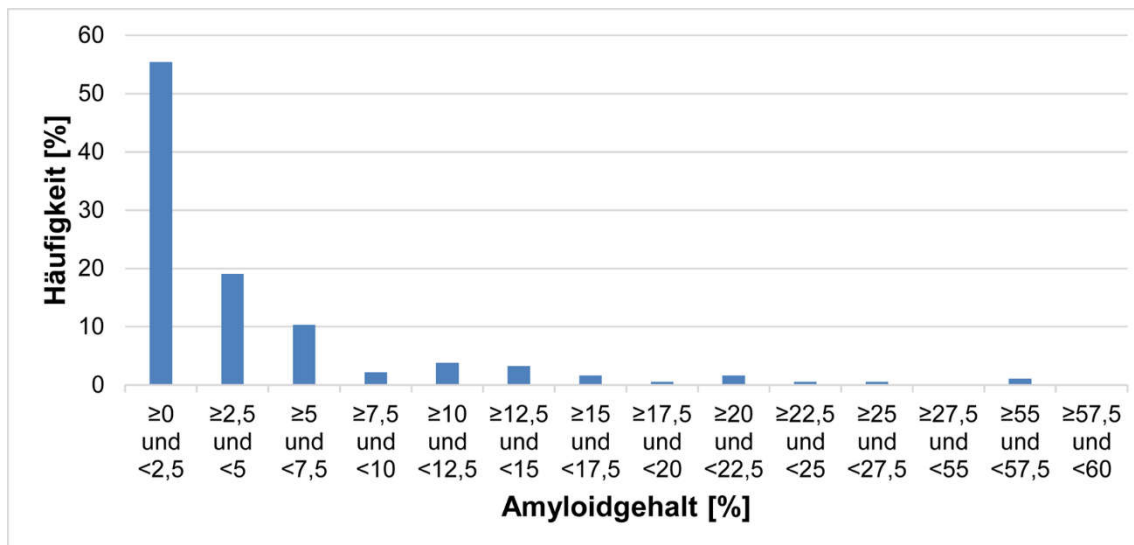


Abbildung 11: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Amyloidgehalts in Prozent der Kohorte A ( $n = 184$ ).

Die Resektate der Männer enthielten signifikant mehr Amyloid als die der Frauen ( $p = 0,001$ ). Es konnte keine signifikante Korrelation des Alters mit dem Amyloidgehalt in der Kohorte A hergestellt werden (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,076,  $p = 0,306$ ). Auch geschlechtsspezifisch ließ sich hier keine signifikante Korrelation nachweisen [Pearson's Korrelationskoeffizient für Männer 0,04 ( $p = 0,719$ ), für Frauen 0,17 ( $p = 0,084$ )]. Der Amyloidgehalt der Frauen zeigte jedoch eher eine steigende Tendenz bei zunehmendem Alter als der der Männer (siehe Abbildung 12), was sich in der geschlechtsspezifischen Auswertung mit einem signifikant höheren Amyloidgehalt bei Frauen in höherem Lebensalter widerspiegelte (siehe Tabelle 2;  $p = 0,034$ ). Sowohl in der Auswertung der gesamten Kohorte A als auch in der geschlechtsspezifischen Auswertung der Männer war der Amyloidgehalt im Alter nicht signifikant höher (siehe Tabelle 2). Der Amyloidgehalt war nicht signifikant unterschiedlich zwischen der rechten und linken Seite, weder in der Auswertung der gesamten Kohorte A noch in der geschlechtsspezifischen Auswertung (siehe Tabelle 2).

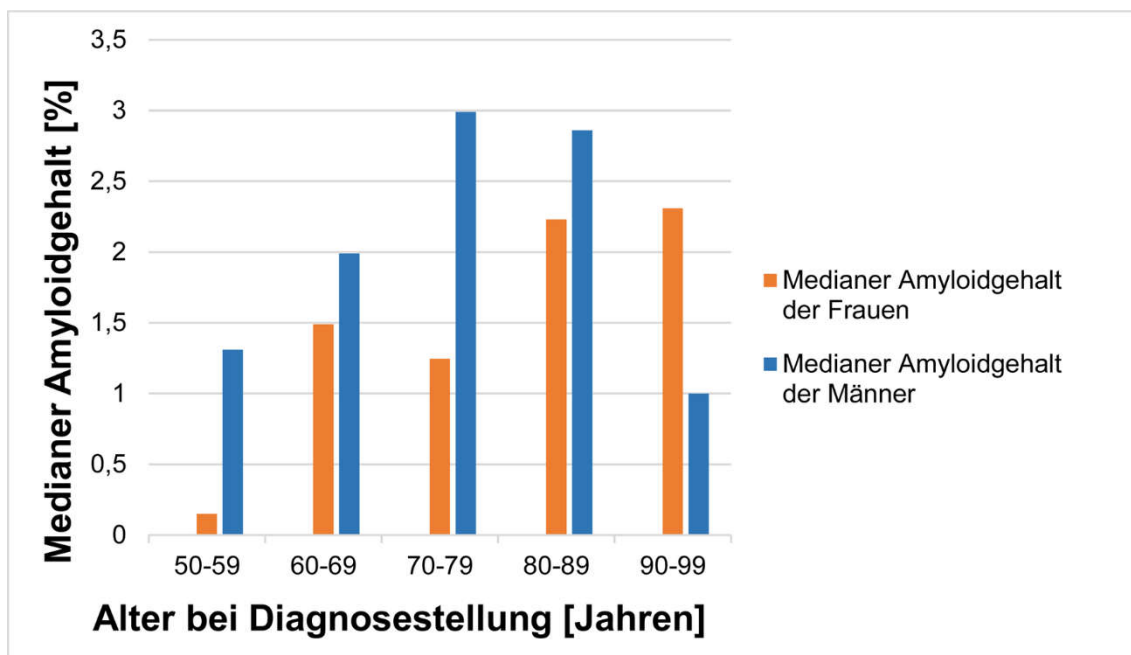


Abbildung 12: Medianer Amyloidgehalt in Prozent nach Alter in Jahren und getrennt nach Geschlecht.

Wiederholte Resektionen wurden bei 24 Patienten [15 (63%) Frauen, 9 (37%) Männer] durchgeführt. Die mediane Zeitdifferenz zwischen dem ersten und zweiten Resektat betrug 11,1 Monate (Spannweite 0,62 Monate - 38,4 Monate). Die Differenz

im Amyloidgehalt war nicht signifikant verschieden zwischen den Resektaten der ersten und denen der zweiten Resektion, auch nicht in der geschlechtsspezifischen Auswertung (siehe Tabelle 2). Auch der Amyloidgehalt der jeweils ersten Resektion war nicht signifikant verschieden zwischen Patienten mit nur einer Resektion [n = 160, medianer Amyloidgehalt 2,19% (Spannweite 0,01% - 57,39%)] und Patienten mit zwei Resektionen [n = 24, medianer Amyloidgehalt 1,87% (Spannweite 0,07% - 15,02%); p = 0,309].

Tabelle 2: Korrelation der Patienteneigenschaften mit dem Amyloidgehalt. Altersaufteilung anhand des jeweiligen Median. Fettgedruckte p-Werte sind statistisch signifikant.

Patienteneigenschaften	Anzahl n [%]	p-Wert	Amyloidgehalt M [%] (IQR [%])	p-Wert
Geschlecht		<b>&lt; 0,001<sup>1</sup></b>		<b>0,001<sup>2</sup></b>
Weiblich	105 (57,10)		1,68 (0,01-56,01)	
Männlich	79 (42,90)		2,82 (0,07-57,39)	
Anatomische Lokalisation, alle		<b>&lt; 0,001<sup>1</sup></b>		0,242 <sup>2</sup>
rechte Seite	112 (60,90)		2,15 (0,01-57,39)	
linke Seite	71 (38,60)		2,33 (0,02-56,01)	
Unbekannte Seite	1 (0,50)		0,01	
Anatomische Lokalisation, Frauen		<b>&lt; 0,001<sup>1</sup></b>		0,144 <sup>2</sup>
rechte Seite	63 (60)		1,06 (0,01-24,30)	
linke Seite	41 (39)		2,10 (0,02-56,01)	
Unbekannte Seite	1 (1)		0,01	
Anatomische Lokalisation, Männer		<b>&lt; 0,001<sup>1</sup></b>		0,813 <sup>2</sup>
rechte Seite	49 (62)		2,74 (0,13-57,39)	
linke Seite	30 (38)		2,91 (0,07-22,02)	
Alter bei Diagnosestellung, alle				0,434 <sup>2</sup>
Alter <78 Jahre	89 (48,4)		2,03 (0,01-57,39)	
Alter ≥78 Jahre	95 (51,6)		2,31 (0,01-56,01)	
Alter bei Diagnosestellung, Frauen				<b>0,034<sup>2</sup></b>
Alter <79 Jahre	51 (48,6)		1,25 (0,01-21,27)	
Alter ≥79 Jahre	54 (51,4)		2,20 (0,01-56,01)	
Alter bei Diagnosestellung, Männer				0,750 <sup>2</sup>
Alter <76 Jahre	35 (44,3)		2,98 (0,07-57,39)	
Alter ≥76 Jahre	44 (55,7)		2,70 (0,14-26,43)	
Wiederholte Biopsien, alle				0,331 <sup>3</sup>
Differenz 2. minus 1. Resektat	24		0,21 ((-4,34)-5,77)	
Wiederholte Biopsien, Frauen				0,151 <sup>3</sup>
Differenz 2. minus 1. Resektat	15		0,15 ((-2,70)-5,47)	
Wiederholte Biopsien, Männer				1,000 <sup>3</sup>
Differenz 2. minus 1. Resektat	9		1,25 ((-4,34)-5,77)	

Legende: M = Median, IQR = Interquartilabstand, 1: Kolmogorov-Smirnov-Test, 2: Mann-Whitney-Test, 3: Wilcoxon-Signed-Rank-Test (paarweise)



### **3.5 Mithilfe der Elastica-van-Gieson-Färbung erfolgte die Abklärung faserartiger Strukturen in der Anti-TTR-, Kongorot- und h-FTAA-Färbung.**

Während der Auswertung des Amyloidgehalts fiel auf, dass vor allem in der CRF faserartige Strukturen in einigen Gewebeschnitten hervortraten. Diese Gewebeschnitte enthielten im gesamten Gewebeschnitt subjektiv kaum und in der objektiven Quantifizierung weniger als 1% Amyloid. Es schien keine Anfärbbarkeit im eigentlichen Sinne zu sein, denn die Amyloidablagerungen wurden mit einem intensiveren gelb-orangenem Fluoreszenzsignal in der Kongorot-Färbung dargestellt. Auch in der h-FTAA-Färbung waren diese faserartigen Strukturen teilweise sichtbar, jedoch farblich schwächer als die Amyloidablagerungen. Es stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um Amyloid handeln könnte. Um die Herkunft dieser faserartigen Strukturen zu ergründen, wurde exemplarisch an 11 Gewebeschnitten von Resektaten, die subjektiv beurteilt zahlreiche faserartige Strukturen enthielten, automatisiert eine Elastica-van-Gieson-Färbung durchgeführt und mit den vorliegenden Gewebeschnitten in den Färbungen Anti-TTR, h-FTAA und Kongorot verglichen (siehe Abschnitt 2.8). Dabei zeigte sich, dass diese faserartigen Strukturen elastischen Fasern entsprachen und kein Amyloid darstellten, was durch die fehlende Anfärbbarkeit durch Anti-TTR bestätigt wurde (siehe Abbildung 13). Faserartige Strukturen, die auch Anti-TTR-positiv gefärbt waren, wurden als Amyloidablagerung gewertet. In die quantitative Berechnung des Amyloidgehalts gingen die faserartigen, Anti-TTR-negativen Strukturen teilweise bei einigen Arealen aus Gewebeschnitten mit weniger als 1% Amyloidgehalt im gesamten Gewebeschnitt insbesondere in den kongorotgefärbten Gewebeschnitten mit ein.

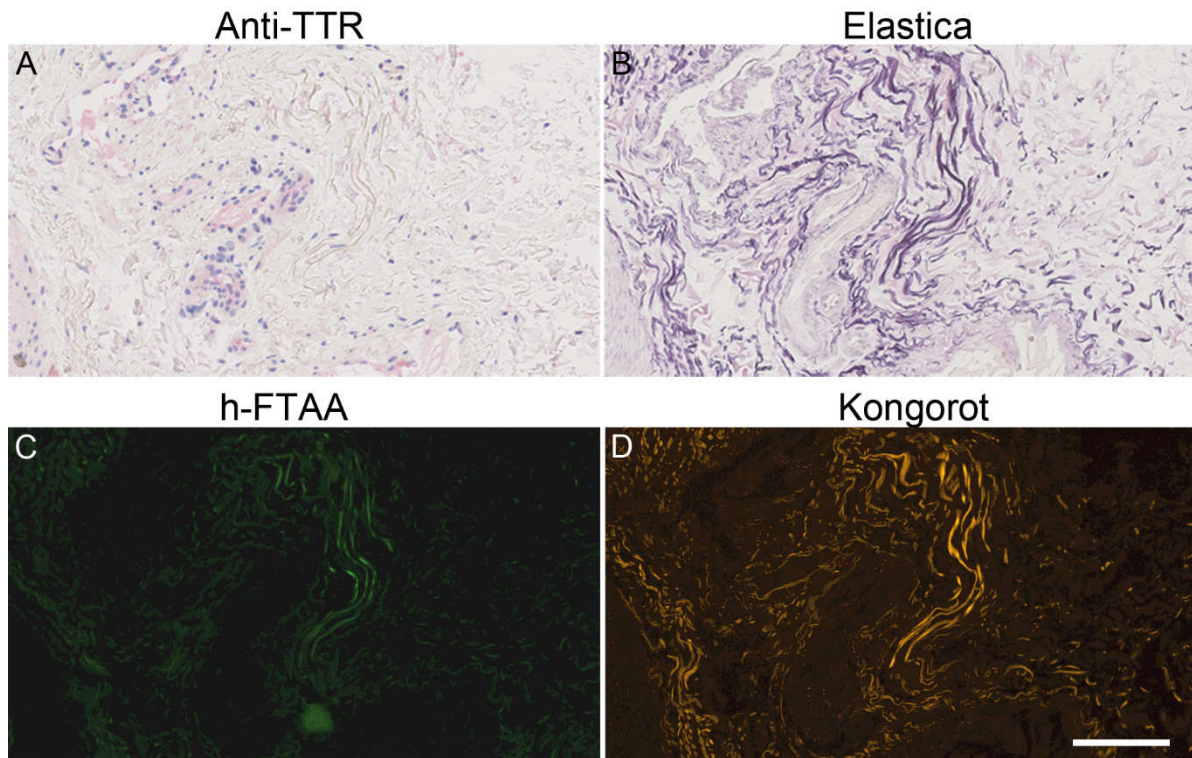


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung elastischer Fasern in den jeweiligen Färbungen Anti-TTR (A), Elastica-van-Gieson (B), h-FTAA (C) und Kongorot (D) in einem Areal ohne Amyloidablagerungen. 200-fache Vergrößerung, Maßstab 100 µm. Die Abbildung wurde für den Druck der Dissertation in Helligkeit und Kontrast angepasst. Für die Auswertung wurden die unangepassten Bilddateien verwendet.

### 3.6 Vitronectin findet sich in ungefähr 50% einer ATTR-Amyloidablagerung.

Vitronectin als Bestandteil der extrazellulären Matrix findet sich regelhaft in Amyloidablagerungen. Die Menge des Vitronectins hängt wesentlich von der Amyloidart ab und kann dabei in über 90% der Ablagerungen vorhanden sein. Im ATTR-Amyloid findet es sich in circa 50% einer Ablagerung (Winter et al., 2015). Dies konnte im vorliegenden Kollektiv bestätigt werden, indem mikroskopisch die unterschiedlich gefärbten Gewebeschnitte eines Resektats verglichen wurden. Vitronectin befand sich oft am Rand einer Amyloidablagerung und stellte mengenmäßig weniger Amyloid dar als die Färbungen mit Kongorot, h-FTAA oder Anti-TTR. Des Weiteren war die Färbung gegen Vitronectin farblich weniger intensiv ausgeprägt. Die computerbasierte quantitative Auswertung des Amyloidgehalts wurde zusätzlich durch zahlreiche, nicht ausgewaschene Farbstoffreste auf dem Objektträger erschwert. Entsprechend wurden die Anti-Vitronectin-Antikörper-gefärbten Gewebeschnitte für die computerbasierte quantitative Auswertung des Amyloidgehalts nicht weiter berücksichtigt.

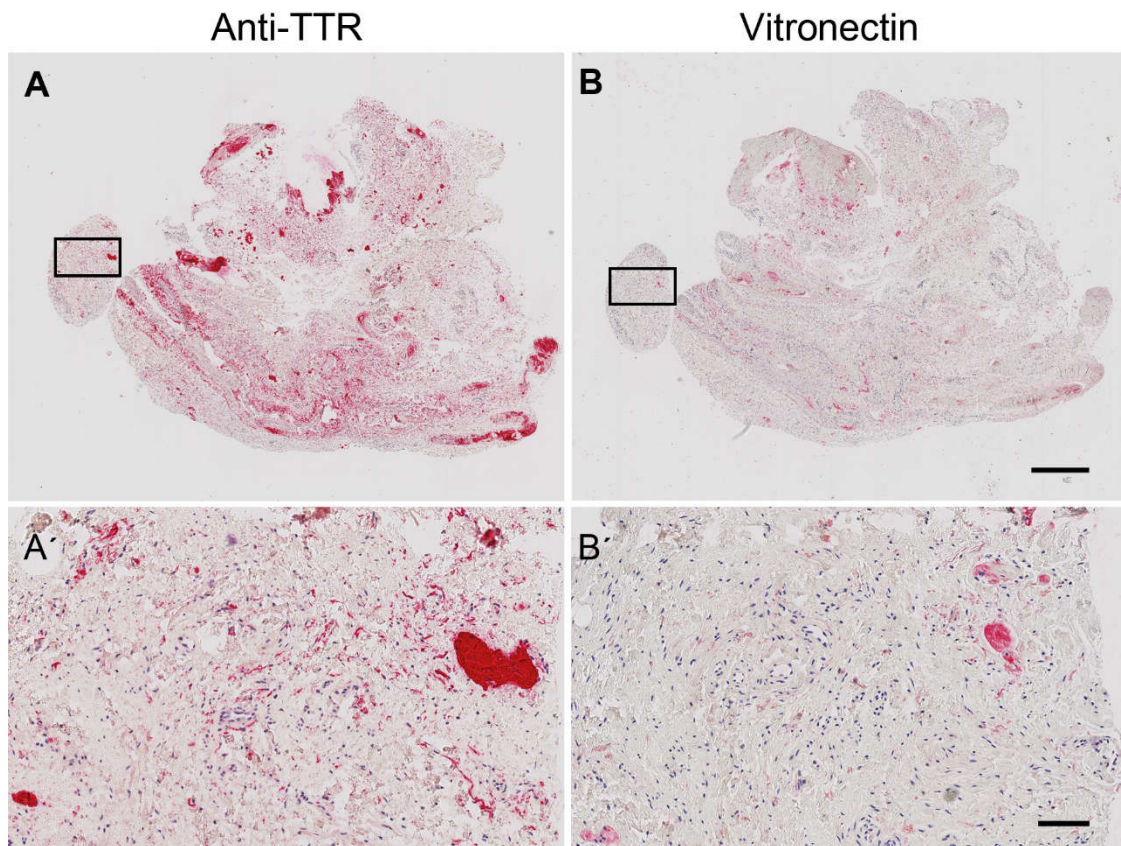


Abbildung 14: Exemplarischer Vergleich von Anti-TTR- (A) und Vitronectin- (B) Färbung. Es wird deutlich, dass mittels immunhistochemischer Vitronectin-Färbung weniger ATTR-Amyloidablagerungen dargestellt werden als mittels Anti-TTR-Antikörper-Färbung. A' und B' zeigen jeweils einen Ausschnitt aus A und B (siehe Markierung in A und B). A und B: 10-fache Vergrößerung, Maßstab 1.000  $\mu\text{m}$ . A' und B': 100-fache Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.7 In den Resektaten der LCT-Kohorte lässt sich mehr ATTR-Amyloid nachweisen als in den Resektaten der KTS-Kohorte.

Für den Vergleich des Amyloidgehalts in Resektaten aus verschiedenen Regionen des Karpaltunnels (KTS und LCT, siehe Abschnitt 2.3.3) wurden 32 Resektate von 15 Patienten der Kohorte C mit zwei Resektaten pro Patient und anatomischer Lokalisation (vier Resektate bei einer Patientin aufgrund beidseitiger Resektion) verwendet. Die vier Resektate dieser Patientin wurden als unabhängige Wertepaare betrachtet, sodass insgesamt 16 Resektionspaare je KTS- sowie LCT-Kohorte ausgewertet wurden. Mittels Rangsummentest konnte festgestellt werden, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der KTS-Kohorte und der LCT-Kohorte gab ( $p < 0,001$ ). Im Median enthielt das KTS-Resektat 2,10% Amyloid, das LCT-Resektat hingegen 9,66%. Der minimale Amyloidgehalt im KTS entsprach 0,01% Amyloid, der

maximale Gehalt 13,63%. Im LCT betrug der minimale Amyloidgehalt 1,15%, der maximale Gehalt 32,53%.

### 3.8 Die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome beträgt 11,66%.

Durch die Auswertung des Anteils der Resektate von Karpaltunnelgewebe mit ATTR-Amyloid an den insgesamt resezierten und histologisch untersuchten Karpaltunnelgeweben konnte die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome errechnet werden. Hierbei wurde jedes eingesandte Resektat als eigenständiges Wertepaar behandelt. Patienten, bei denen mehrfache Operationen eines Karpaltunnels beziehungsweise Operationen beider Karpaltunnel durchgeführt wurden, wurden mehrfach erfasst. Das Kollektiv der insgesamt operierten Karpaltunnelsyndrome bestand aus 4.990 Fällen [3454 Frauen (69,22%) und 1536 Männer (30,78%)]. Bei 582 Resektaten dieses Kollektivs wurde ATTR-Amyloid nachgewiesen, wobei mit 53% mehr Gewebeproben von Frauen vorlagen [307 (53%) Frauen und 275 (47%) Männer, siehe Tabelle 3]. Somit beträgt die Prävalenz insgesamt 11,66%. Bei Männern liegt sie mit 17,90% höher als bei Frauen (8,89%). Das mediane Alter betrug auch in dieser Auswertung 78 Jahre (vergleiche hierzu auch Tabelle 2).

Tabelle 3: Patienteneigenschaften in der Übersicht: Vom 01.01.2010 bis 30.06.2018 wurden insgesamt 4990 Resektate von Karpaltunnelgewebe (von 3454 Frauen und 1536 Männern mit Karpaltunnelsyndrom) histologisch auf Amyloid hin untersucht. Bei 582 (11,66%) wurde ATTR-Amyloid nachgewiesen.

Patienteneigenschaften	Anzahl	
	n	[%]
Gesamtanzahl Patienten	582	100,00
Geschlecht		
Weiblich	307	52,75
Männlich	275	47,25
Alter bei Diagnosestellung, alle		
Alter <78 Jahre	263	45,19
Alter ≥78 Jahre	319	54,81
Alter bei Diagnosestellung, Frauen		
Alter <79 Jahre	141	45,93
Alter ≥79 Jahre	166	54,07
Alter bei Diagnosestellung, Männer		
Alter <77 Jahre	133	48,36
Alter ≥77 Jahre	142	51,64

#### 4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit konnten folgende Hypothesen bestätigt werden:

- 1) Der Nachweis von Amyloid mit Hilfe von h-FTAA ist sensitiver als der Nachweis mit Kongorot und Polarisationsmikroskopie.
- 2) Der Flächenanteil der Anti-TTR-gefärbten Ablagerungen korreliert mit dem Flächenanteil h-FTAA- und kongorotgefärbter Amyloidablagerungen und kann als sensitives Suchverfahren genutzt werden, um den Nachweis von Amyloid und dessen Bestätigung durch Kongorot bzw. h-FTAA zu erleichtern.
- 3) Der Amyloidgehalt in Resektaten eines Karpaltunnelsyndroms korreliert signifikant mit den klinischen Patienteneigenschaften Alter und Geschlecht der Patienten.
- 4) Der Amyloidgehalt ist abhängig von der ursprünglichen Lokalisation des entnommenen Gewebes. Bei Patienten mit durch Amyloid verursachtem Karpaltunnelsyndrom enthält das *Retinaculum flexorum* mehr Amyloid als das Synovialgewebe des Karpaltunnels.

Folgender Teilaspekt einer der oben genannten Hypothesen wurde verworfen:

- 1) Der Amyloidgehalt in Resektaten eines Karpaltunnelsyndroms korreliert signifikant mit der anatomischen Seite der Amyloidablagerungen im Karpaltunnelgewebe.

Amyloidablagerungen sind die Auslöser unterschiedlicher Krankheitsbilder, vermutlich zahlreicher und vielfältiger als bisher angenommen (Chiti & Dobson, 2006). Die Diagnostik mittels derzeitiger standardmäßig verwendeter histologischer Färbungen ist dabei nicht immer eindeutig, und es kann zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen kommen, weshalb weiterhin nach neuen sensitiveren histochemischen Färbungen geforscht wird. Für den Vergleich diagnostischer Färbeverfahren eignen sich Resektate, die zahlreich zur Verfügung stehen, risikoarm entnommen werden können und regelhafter Bestandteil einer Therapie sind, wie zum Beispiel im Falle der operativen Therapie des Karpaltunnelsyndroms mit histologischer Begutachtung des entnommenen Gewebes.

Die ATTRwt ist die häufigste Form der Amyloidose. Sie ist wahrscheinlich aufgrund mangelnden Bewusstseins für die Erkrankung und durch die unspezifische

Symptompräsentation unterdiagnostiziert. Ferner liegen zwischen Symptombeginn und korrekter Diagnose oftmals mehrere Jahre (Hawkins et al., 2015). Am ehesten tritt sie sogar endemisch auf. Bei dem demografischen Wandel der deutschen Bevölkerung nimmt ihre Prävalenz stetig zu. Sie lässt sich bei bis zu 10% der Karpaltunnel-Resektate von über 50-Jährigen nachweisen, und es besteht die Vermutung, dass die ATTR-Amyloidose in bis zu 10% der Fälle der Auslöser von Herzinsuffizienz ist (Siddiqi & Ruberg, 2018). Aufgrund dieser klinischen Relevanz ist eine möglichst frühzeitige und korrekte Diagnostik und Therapie der Amyloidose wichtig.

#### **4.1 Der Nachweis von Amyloid ist sensitiver mit h-FTAA als mit Kongorot.**

Um Amyloid zu diagnostizieren, existieren zahlreiche verschiedene histologische Farbstoffe (Nilsson, 2009). Keiner von diesen färbt sensitiv nur Amyloidablagerungen an, sondern auch viele andere ähnlich strukturierte Proteine. Die Kongorot-Färbung ist in Kombination mit der Polarisationsmikroskopie der Goldstandard für die Amyloiddiagnostik. Allerdings ist ihre Empfindlichkeit begrenzt, und kleine oder prä-amyloide Ablagerungen können unerkannt bleiben. Zusätzlich kann es zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen kommen, zum Beispiel, wenn das Resektat reich an Kollagen ist. Fehlerhafte Ergebnisse sind auch abhängig von der Qualität der Kongorot-Färbung, der Polarisationsanordnung und der Erfahrung des Pathologen (Linke, 2000). Die Empfindlichkeit der Kongorot-Färbung wird durch die CRF erhöht, wobei eine begrenzte Spezifität in Kauf genommen wird: Fasern, die nicht aus Amyloid bestehen, werden ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch dargestellt (Khurana et al., 2001). Dies konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Insbesondere in Fällen mit weniger als 1% Amyloidablagerungen im gesamten Gewebeschnitt fluoreszierten faserartige Strukturen in der CRF, die jedoch nicht in der Anti-TTR-Färbung nachweisbar waren.

Diese hervorgerufene Fluoreszenz könnte durch Autofluoreszenz erklärt werden (Billinton & Knight, 2001; Puchtler et al., 1973) und führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Linke et al. haben bereits die Fluoreszenz von Elastin und Kollagen in der Fluoreszenzmikroskopie von CRF beschrieben (Linke, 2000). In der h-FTAA-Färbung waren diese autofluoreszierenden Fasern stellenweise ebenfalls zu sehen,

vor allem in ausgewählten Arealen aus Gewebeschnitten mit insgesamt weniger als 1% Amyloidablagerungen. Im Gegensatz zu der Fluoreszenz der Fasern in CRF waren durch h-FTAA weniger Fasern nachweisbar. Diese erschienen weniger hell als die Amyloidablagerungen selbst. Deswegen sind die Fasern in der Auswertung des Amyloidgehalts der ausgewählten Areale mittels ImageJ in den h-FTAA-gefärbten Gewebeschnitten kaum mit in die Berechnung eingegangen, in den kongorotgefärbten Gewebeschnitten hingegen vermehrt. Um die Möglichkeit einer falsch-positiven Detektion von elastischen Fasern zu evaluieren, wurde an einigen ausgewählten Gewebeschnitten mit subjektiv beurteilt geringem Amyloidgehalt und zahlreichen fluoreszierenden faserartigen Strukturen eine Elastica-van-Gieson-Färbung durchgeführt. Im Vergleich der unterschiedlichen Färbungen zeigte sich eine positive Färbung der Fasern durch Elastica-van-Gieson und Kongorot, jedoch kaum durch h-FTAA und gar nicht durch Anti-TTR.

Die Amyloidbildung ist ein dynamischer Prozess, der das Auftreten von oligomeren Zwischenprodukten einschließt (Fandrich, 2012). Darüber hinaus können Amyloidfibrillen innerhalb eines kranken Individuums in ihrer dreidimensionalen Architektur, die zu polymorphen Fibrillen führt, beträchtlich variieren (Annamalai et al., 2016). Es wurden bereits nicht-fibrilläre Aggregate von TTR bei Patienten mit ATTRm beschrieben (Sousa et al., 2001). Ähnlich schilderten Koike et al. Anti-TTR-immunreaktive aber kongorotnegative Ablagerungen in Nervenbiopsaten von an ATTRm erkrankten Patienten (Koike et al., 2004). Es ist wahrscheinlich, dass die Anti-TTR-Färbung und die h-FTAA-Färbung frühe nicht-fibrilläre Aggregate von TTR nachweisen können. Mittels der h-FTAA-Färbung können auch sehr kleine Amyloidablagerungen sowie prä-amyloidogene Ablagerungen nachgewiesen werden. h-FTAA ist ein anionisches, lumineszierendes konjugiertes Oligothiophen, das das Protein nichtkovalent bindet und den Unterschied in der fibrillären Konformation des Amyloidproteins gegenüber dem ursprünglichen Protein nachweisen kann (Klingstedt et al., 2011; Nilsson et al., 2005). Daher könnten die Anti-TTR-Färbung und die h-FTAA-Färbung eine diagnostische Lücke zwischen dem Beginn der Erkrankung und der Diagnostik von ATTR-Amyloid in kongorotgefärbtem Gewebe unter polarisiertem Licht füllen. Insbesondere unter Berücksichtigung der vermuteten Toxizität prä-fibrillärer amyloidogener Proteinablagerungen ist die möglichst frühzeitige Diagnostik von (Prä-) Amyloid zum Beispiel mittels h-FTAA von hoher Relevanz (Chiti & Dobson,

2006). Diese ist mittels Standardfärbemethoden wie Kongorot und Thioflavin T nicht möglich (Hammarstrom et al., 2010).

#### **4.2 Der immunhistochemisch nachweisbare Amyloid-Flächenanteil im Gewebe korreliert mit dem mittels Kongorot- oder h-FTAA-Färbung nachweisbaren Amyloid-Flächenanteil.**

Die geringe Empfindlichkeit der Kongorot-Färbung in Verbindung mit der Polarisationsmikroskopie wird durch den Vergleich mit der Immunfärbung veranschaulicht. Häufig können Anti-TTR-Immunreaktionen von weniger als 5 µm Größe bei Resektaten aus dem Karpaltunnelgewebe beobachtet werden. Dies wirft die Frage auf, ob entweder unspezifisch immunhistochemisch gefärbte Gewebebestandteile oder aber sehr kleine Amyloidablagerungen nachgewiesen werden, die die Kongorot-Färbung verfehlt. Interessanterweise war die immunhistochemische Anti-TTR-Färbung deckungsgleicher mit der h-FTAA-Färbung als mit CRF, was letztere These unterstützt. Somit ist die h-FTAA-Färbung in Verbindung mit der Fluoreszenzmikroskopie in Hinblick auf Sensitivität und Spezifität von Kongorot und CRF das überlegene Nachweisverfahren.

Die jeweils errechneten Amyloid-Flächenanteile in den unterschiedlichen Gewebeschnitten divergieren sehr und schwanken zwischen einem geringen prozentualen Anteil und mehr als der Hälfte des berechneten Gewebes. Dies deckt sich mit der Beobachtung im Amyloidregister Kiel, dass der Amyloidgehalt stark zwischen verschiedenen Patienten variiert. Bei der Mehrzahl der untersuchten Areale der hier vorliegenden Arbeit liegt der Amyloidgehalt zwischen 0,02% bis 2,5%. Dies ist unter anderem bedingt durch die gewählte Methode: Für die Auswertung wurden aus den vorliegenden eingescannten Resektaten je nach Größe und Amyloidgehalt ein bis drei repräsentative Areale ausgewählt, und zwar in 200-facher Vergrößerung für eine möglichst detailgetreue Darstellung der einzelnen Amyloidablagerungen. Um die Auswertung standardisiert durchführen zu können, wurde jedes Areal bildfüllend gewählt, sodass randständige Ablagerungen nicht berücksichtigt werden konnten. Des Weiteren wurden jegliche Strukturen im Gewebe, die nicht h-FTAA-, Kongorot- oder Anti-TTR-positiv waren, als nicht Amyloid darstellendes Gewebe bewertet, so auch Gefäßlumina und Risse im Gewebe. Die Berechnung erfolgte anhand gezählter



Bildpixel. Der Großteil des Karpaltunnelgewebes besteht selbst bei vorhandenem Amyloid aus physiologischen Strukturen und macht somit den überwiegenden Anteil der gezählten Pixel im gesamten Bild aus, wodurch der Amyloidgehalt in Relation gering erscheint. In amyloidfreiem Gewebe ist histologisch keine h-FTAA-, Kongorot- bzw. Anti-TTR-Färbung sichtbar. Trotz prozentual geringen Amyloidgehalts wurden alle hier vorliegenden Resektate mit positiver Kongorot-Färbung als Amyloid enthaltend gewertet.

#### **4.3 Klinische Patienteneigenschaften korrelieren mit dem Amyloidgehalt.**

Das Karpaltunnelsyndrom kann durch viele verschiedene Zustände verursacht werden, einer von ihnen ist die ATTR-Amyloidose (Gioeva et al., 2013; Iskra et al., 2013). Typische Risikofaktoren sind Übergewicht, Alter und weibliches Geschlecht (Becker et al., 2002); das Karpaltunnelsyndrom betrifft Frauen, die älter als 55 Jahre sind, mindestens doppelt so häufig wie Männer (Lam & Thurston, 1998). McDiarmid et al. haben sich auf die Suche nach beruflichen Risikofaktoren gemacht und herausgefunden, dass etwa die gleiche Risikoquote für Frauen und Männer mit ähnlichen Arbeitsaufgaben gilt. Insgesamt zeigte sich ein höheres Risiko für Frauen aufgrund sich häufiger wiederholender Handbewegungen bei der Arbeit (McDiarmid et al., 2000). Über die Art der Arbeit, mit der Patienten der hier vorliegenden Kohorte beschäftigt waren, lagen keine Informationen vor. Es konnte gleichwohl gezeigt werden, dass erheblich mehr Frauen vom Karpaltunnelsyndrom mit nachweisbaren ATTR-Amyloidablagerungen betroffen sind. Frauen sind bei Diagnosestellung signifikant älter als Männer und haben im Alter von über 79 Jahren einen signifikant höheren ATTR-Amyloidgehalt im Karpaltunnelgewebe als jüngere Frauen. Karpaltunnelsyndrom und Amyloidose werden als chronische Erkrankungen betrachtet, die sich über eine längere Zeit entwickeln. Dies könnte das häufigere Auftreten beider Erkrankungen bei älteren Patienten erklären.

In diesem Kollektiv stammen sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Patienten ungefähr 60% der Resektate von der rechten anatomischen Seite. Leider liegen zu der Händigkeit der Patienten dieses Kollektivs keine Daten vor. Aufgrund der epidemiologischen Daten zur Verteilung der Händigkeit in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands wäre von 85-90% Rechtshändigkeit auszugehen

(Sattler et al., 2014). Demzufolge wäre ein höherer Amyloidgehalt in den Resektaten des rechtsseitigen Karpaltunnelgewebes zu erwarten gewesen. Dies konnte in der statistischen Auswertung nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war der Amyloidgehalt in den Resektaten des linken Karpaltunnelgewebes höher, ohne dass der Unterschied signifikant war. Ohne Informationen zur klinischen Beschwerdesymptomatik der Patienten und zum zeitlichen Ablauf zwischen erstmaligem Symptombeginn und operativer Entlastung des Karpaltunnelsyndroms lässt sich hierfür keine Erklärung finden.

Bei einigen Patienten erfolgte die Operation beider Karpaltunnel (rechts und links), selten sogar die mehrfache Operation ein und desselben Karpaltunnels mit einem medianen zeitlichen Abstand von ungefähr elf Monaten. Unter der Annahme, dass die zweite Resektion bereits bei geringerer klinischer Symptomatik und entsprechend geringerem Amyloidgehalt durchgeführt worden war, wurden signifikante Unterschiede zwischen dem Amyloidgehalt der ersten im Vergleich zur zweiten Resektion vermutet. Dies konnte jedoch nicht statistisch signifikant belegt werden. Zu bedenken ist hierbei die geringe Größe des Studienkollektivs ( $n = 24$ ), wodurch die Aussagen zur Signifikanz möglicherweise keine verlässlichen Rückschlüsse zulassen.

Interessanterweise haben Männer einen signifikant höheren Amyloidgehalt als Frauen. Die verschiedenen Sexualhormonkonzentrationen von Männern und Frauen scheinen eine Rolle in der Pathophysiologie der ATTR-Amyloidose zu spielen: In einer italienischen monozentrischen Studie zu hereditärer ATTR-Kardiomyopathie konnte gezeigt werden, dass prämenopausale Frauen seltener und weniger gravierend betroffen sind als Männer (Rapezzi et al., 2008). In einer japanischen Studie sank die Konzentration von ATTR V30M (ATTRm mit der häufigsten p.Val30Met-Mutation) nach chirurgischer Kastration von transgenen Mäusen signifikant (Ueda et al., 2007). Verhaltenspsychologisch könnte diese Beobachtung auch mit einer anzunehmenden späteren Arztkonsultation von Männern bei erst starken Beschwerden mit folglich längerer Amyloidogenese-Zeit erklärt werden. Becker et al. haben ebenfalls schwerwiegendere Karpaltunnelsyndrome bei Männern vorgefunden und ähnlich argumentiert (Becker et al., 2002).

Das Geschlechterverhältnis des hier vorliegenden Kollektivs spiegelt mit 57% Frauen und 43% Männern nicht korrekt die in der Literatur beschriebene Epidemiologie

des Karpaltunnelsyndroms wider [Frauen sind drei- bis viermal häufiger vom Karpaltunnelsyndrom betroffen als Männer (Assmus, 2015)]. Jedoch reflektiert es, dass Männer häufiger von der ATTR-Amyloidose betroffen sind und entsprechend einen größeren Anteil in diesem Kollektiv ausmachen als in der Allgemeinbevölkerung bei Patienten mit Karpaltunnelsyndrom.

In Hinblick auf das mediane Alter der Patienten (79 Jahre) ist zu vermuten, dass der Anteil an Patienten mit Amyloidablagerungen im Karpaltunnelsyndrom in hohem Alter größer wäre, wenn mehr Menschen ein Alter über 90 Jahre erreichten und sich mehr Menschen im Alter über 80 Jahren operieren ließen.

Die Amyloidose im Karpaltunnel ist oft das erste Symptom einer ATTR-Amyloidose [sowohl ATTRm als auch ATTRwt (Nakagawa et al., 2016)] sowie auch anderer Formen der Amyloidose, wie zum Beispiel AL-Amyloidose (Merlini & Bellotti, 2003). Im National Amyloidosis Centre in London haben circa 98% der Patienten mit kardialer ATTRwt ein symptomatisches Karpaltunnelsyndrom, von denen knapp 50% bereits mehrere Jahre vor Beginn der kardialen Beschwerden operativ entlastet wurden (Youngstein et al., 2017). Dies unterstreicht die klinische Relevanz der Amyloiddiagnostik im Karpaltunnelgewebe. Der signifikant höhere ATTR-Amyloidgehalt im Karpaltunnelgewebe von Männern im Vergleich zu dem von Frauen und der signifikant höhere ATTR-Amyloidgehalt von Frauen über 79 Jahre im Vergleich zu dem von jüngeren Frauen lassen auch eine relevante Amyloidlast im gesamten Körper vermuten, die als Risikofaktor für die Entwicklung insbesondere einer kardialen ATTR-Amyloidose angesehen werden muss. Die jüngsten Patienten dieses Kollektivs waren 50 Jahre alt. Patienten mit dem Risiko für die Entwicklung einer kardialen ATTRwt müssen rechtzeitig identifiziert werden, um frühzeitig eine symptomatische Behandlung in die Wege zu leiten. Bei nicht oder spät erkannter ATTR-Amyloid-Kardiomyopathie verkürzt sich die Überlebenszeit um circa 2,5 bis 4 Jahre (Hawkins et al., 2015). Deswegen empfiehlt sich die Resektion und anschließende histologische Untersuchung des Karpaltunnelgewebes auf Amyloidablagerungen aller männlichen und weiblichen Patienten ab 50 Jahren.

#### **4.4 Die ursprüngliche Lokalisation des entnommenen Gewebes ist in Hinblick auf den nachgewiesenen Amyloidgehalt relevant.**

Jede Beurteilung pathologischer Veränderungen hängt von der Art und Weise der Gewebeentnahme ab. Insbesondere Biopsien und Probe-Exzisionen (PEs) unterliegen der Gefahr eines Probensammelfehlers, da sie meist nur einen Teil des pathologisch veränderten Gewebes darstellen und die Gefahr besteht, dass das pathologisch veränderte Gewebe gar nicht erfasst wird. Eine Ausnahme stellt die Exzisionsbiopsie dar, bei der das pathologisch veränderte Gewebe vollständig entfernt wird. Die Gefahr des Probensammelfehlers wird bei teilweiser Resektion minimiert und kann bei vollständiger Resektion mit anschließender Begutachtung des kompletten pathologisch veränderten Gewebes sogar vermieden werden. Die in dieser Studie verwendeten KTS-Resektate beinhalten zumeist nur unvollständige Resektate des Synovialgewebes des Karpaltunnels mit der Folge möglicher Fehldiagnosen. In wenigen Fällen wurden nach chirurgischer Resektion zwei Resektate aus unterschiedlichen Bereichen des Karpaltunnels zur histologischen Begutachtung eingesandt, betitelt mit LCT für *Ligamentum carpi transversum/Retinaculum flexorum* und KTS für Synovialgewebe des Karpaltunnels. Bei der quantitativen Bestimmung des jeweiligen Amyloidgehalts zeigten sich im LCT statistisch signifikant mehr ATTR-Amyloidablagerungen als im KTS. Die Berechnung erfolgte relativ und ist somit unabhängig von der zumeist größeren Gewebemenge des LCT-Resektats. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass bei vielen Patienten mit operativ behandeltem Karpaltunnelsyndrom und alleiniger Resektion des Synovialgewebes des Karpaltunnels der Amyloidgehalt im Gewebe zu gering eingeschätzt wird und die Gefahr besteht, dass eine Amyloidose unentdeckt bleibt oder als irrelevant eingeschätzt wird. Für die korrekte Diagnose einer Amyloidose im Karpaltunnel und sich anschließender Diagnostik auf eventuell begleitende systemische Amyloidablagerungen empfiehlt sich die Entnahme von möglichst viel Gewebe aus verschiedenen Strukturen des Karpaltunnels und vor allem aus dem *Retinaculum flexorum*. Daher sollte das chirurgische Standardverfahren der Ligament-Spaltung um die vollständige Resektion und histologische Begutachtung des Ligaments erweitert werden.

#### **4.5 Die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome ist von klinischer Relevanz.**

Die bekannte Epidemiologie des Karpaltunnelsyndroms (Assmus, 2015) kann dadurch bestätigt werden, dass in der Auswertung der Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome mehr Proben von Frauen vorlagen. Die Prävalenz der ATTR-Amyloidose im Karpaltunnelgewebe war bei Männern höher als bei Frauen und spiegelt damit die bekannte Epidemiologie der erworbenen ATTR-Amyloidose wider (Kristen et al., 2016).

Die S3-Leitlinie der AWMF zum Karpaltunnelsyndrom weist das Karpaltunnelsyndrom als das häufigste Engpass-Syndrom eines peripheren Nervs aus (Assmus et al., 2007). Gioeva et al. haben nachgewiesen, dass ca. 7,3% der operativ behandelten Fälle mit Karpaltunnelsyndrom ATTR-Amyloid aufweisen (Gioeva et al., 2013). In dem hier vorliegenden Kollektiv beträgt die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome sogar 11,66%. Die Prävalenz des Karpaltunnelsyndroms in Deutschland beträgt 5-10%, entsprechend ca. 4.1-8.2 Millionen Menschen. Somit sind vermutlich 492.000-984.000 Menschen an einer ATTR-Amyloidose erkrankt. Dies unterstreicht die Relevanz der histologischen Untersuchung des Karpaltunnelgewebes zur ätiologischen Abklärung eines Karpaltunnelsyndroms, insbesondere in Hinblick auf die mögliche systemische und klinisch relevante Verteilung einer ATTR-Amyloidose.

#### **4.6 Studieneinschränkungen**

In dieser Studie wurde nur eine Art von Amyloid einer einzigen Gewebeart und anatomischen Lokalisation untersucht. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass sich h-FTAA für die sensitive Diagnostik verschiedener Arten von Amyloidosen in verschiedenen Arten von Geweben bewährt hat (Sjolander et al., 2015; Sjolander et al., 2016). Daher wurde sich aus folgenden Gründen für dieses Studiendesign entschieden:

- 1) Das *Retinaculum flexorum* ist reich an Kollagen und elastischen Fasern, sodass in der Kongorot-Färbung schnell falsch-positive Befunde entstehen können.
- 2) Die ATTR-Amyloidose hat ein gut erkennbares Ablagerungsmuster, das sich hervorragend für einen quantitativen Vergleich eignet.

- 3) Die ATTR-Amyloidose ist durch den spezifischen Anti-TTR-Antikörper im Gewebe identifizierbar.

#### **4.7 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit ist eine retrospektive Analyse von Patienten mit ATTR-Amyloid im Karpaltunnel. ATTR-Amyloid wirkt sich häufig auf das Herz aus. Ob die Patienten in dieser Studie auch Amyloidablagerungen im Herzen hatten, ist nicht bekannt. In Bezug auf das Alter der Patienten ist zu vermuten, dass es sich in diesem Kollektiv hauptsächlich um ATTRwt-Amyloid handelte. Nach Sekijima et al. stellt das Karpaltunnelsyndrom häufig das erste Symptom der ATTRwt dar (Sekijima et al., 2011). Eine langfristig angelegte, prospektive Studie mit einer großen Patientenkohorte für die Korrelation von ATTR-Amyloid im Karpaltunnel mit einer möglichen Herzbeteiligung könnte einen detaillierten Einblick in die Ätiologie und Epidemiologie der ATTR-Amyloidose liefern.

Das in dieser Studie verwendete Gesamtkollektiv befindet sich als Bestandteil eines größeren Kollektivs verschiedener histologischer Resektate in erneuter Auswertung durch die Arbeitsgruppe von Per Hammarström an der Linköping Universität in Schweden. Mittels Spektralanalyse und hyperspektraler Darstellung wurde unter anderem bereits eine automatisierte Quantifizierung des Amyloidgehalts an den h-FTAA-gefärbten Resektaten durchgeführt, und es wurden Charakteristika des Farbstoffes herausgearbeitet: Die h-FTAA-Färbung lässt sich mit anderen Farbstoffen kombinieren (siehe Abschnitt 1.2.1.3.2). Unter Verwendung niedrig konzentrierter Färbelösungen und Langpassfiltern in der Fluoreszenzmikroskopie kommt es in geringerem Ausmaß zu Autofluoreszenz beziehungsweise Fluoreszenz des Hintergrundes und entsprechend zu einer gut kontrastierten Darstellung der Ablagerungen (Nystrom et al., 2017).

Mittlerweile gibt es kommerziell erhältliche h-FTAA-Färbelösungen (Nystrom et al., 2017), und es ist davon auszugehen, dass die zukünftige Erforschung und Weiterentwicklung der Nachweismethoden für Amyloid unter der Berücksichtigung der aktuellen Forschungsergebnisse zum detaillierteren Verständnis der Pathophysiologie und Ätiologie sowie zur weiteren Erarbeitung von Therapiemöglichkeiten beitragen wird.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Farbstoff h-FTAA (*heptamer formyl thiophene acetic acid*) aus der Gruppe der lumineszierenden konjugierten Oligothiophene für den histologischen Nachweis von Transthyretin-Amyloid im Synovialgewebe des Karpaltunnels untersucht. Das Gesamtkollektiv umfasste 208 Resektate von 184 Patienten. Mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ wurde der Amyloidgehalt im Gewebe computerbasiert erfasst und mit dem Goldstandard Kongorot-Färbung sowie der immunhistochemischen Anti-TTR-Antikörper-Färbung verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die h-FTAA-Färbung ein hoch qualifiziertes Verfahren ist, um bereits geringe Mengen (ab 0,12%) von Transthyretin-Amyloid im Karpaltunnelgewebe zu erkennen. Für den Vergleich von h-FTAA mit Anti-Transthyretin-Antikörper wurde ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,88 berechnet. Im Median betrug der Amyloidgehalt 5,3% im h-FTAA-, 4,9% im Anti-Transthyretin-Antikörper- und 1,9% im kongorotgefärbten Gewebe. Die Amyloidablagerungen lassen sich mit der Fluoreszenzmikroskopie ohne spezielles Polarisationsmikroskop, welches für die Kongorot-Färbung benötigt wird, nachweisen. Das Färbeprotokoll ist unkompliziert, und wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist die h-FTAA-Färbung ein sensitives Verfahren, um Amyloidablagerungen zu erkennen. Es vermag Kongorot nicht zu ersetzen, aber es kann ergänzend verwendet werden, um die Diagnose von ATTR-Amyloid in einem früheren Stadium zu optimieren.

Durch die Korrelation des Amyloidgehalts mit klinischen Patienteneigenschaften konnte gezeigt werden, dass Frauen signifikant häufiger von einer Transthyretin-Amyloidose im Karpaltunnelgewebe betroffen sind als Männer. Bei Männern war der Amyloidgehalt signifikant höher als bei Frauen, während der Amyloidgehalt bei Frauen über 79 Jahre signifikant höher war als bei jüngeren Frauen. Das *Retinaculum flexorum* enthält mehr Amyloid als die Synovialis des Karpaltunnels. Die Prävalenz der durch ATTR-Amyloid bedingten Karpaltunnelsyndrome beträgt 11,66%. Nach Sekijima et al. (2011) stellt das Karpaltunnelsyndrom häufig das erste Symptom einer Transthyretin-Amyloidose dar, die im schlimmsten Fall zur Amyloid-Kardiomyopathie mit den Symptomen einer Herzinsuffizienz führt und die Lebensqualität und Lebenszeit einschränkt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit tragen zur frühzeitigeren Diagnose der Transthyretin-Amyloidose bei.

## 6 Literaturverzeichnis

- Annamalai, K., Guhrs, K. H., Koehler, R., Schmidt, M., Michel, H., Loos, C., Gaffney, P. M., Sigurdson, C. J., Hegenbart, U., Schonland, S. & Fandrich, M. (2016). Polymorphism of amyloid fibrils in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(15), 4822-4825.
- Ansari, A. M., Osmani, L., Matsangos, A. E. & Li, Q. K. (2017). Current insight in the localized insulin-derived amyloidosis (LIDA): clinico-pathological characteristics and differential diagnosis. *Pathol Res Pract*, 213(10), 1237-1241.
- Assmus, H. (2015). Das Karpaltunnelsyndrom - eine Übersicht für Ärzte aller Fachgebiete. Springer, Schriesheim
- Assmus, H., Antoniadis, G., Bischoff, C., Haussmann, P., Martini, A. K., Mascharka, Z., Scheglmann, K., Schwerdtfeger, K., Selbmann, H. K., Towfigh, H., Vogt, T., Wessels, K. D. & Wustner-Hofmann, M. (2007). [Diagnosis and therapy of carpal tunnel syndrome--guideline of the german societies of handsurgery, neurosurgery, neurology, orthopaedics, clinical neurophysiology and functional imaging, plastic, reconstructive and aesthetic surgery, and surgery for traumatology]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 39(4), 276-288.
- Atroshi, I., Gummesson, C., Johnsson, R., Ornstein, E., Ranstam, J. & Rosen, I. (1999). Prevalence of carpal tunnel syndrome in a general population. *JAMA*, 282(2), 153-158.
- Becker, J., Nora, D. B., Gomes, I., Stringari, F. F., Seitensus, R., Panosso, J. S. & Ehlers, J. C. (2002). An evaluation of gender, obesity, age and diabetes mellitus as risk factors for carpal tunnel syndrome. *Clin Neurophysiol*, 113(9), 1429-1434.
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., Plante-Bordeneuve, V., Barroso, F. A., Merlini, G., Obici, L., Scheinberg, M., Brannagan, T. H., 3rd, Litchy, W. J., Whelan, C., Drachman, B. M., Adams, D., Heitner, S. B., Conceicao, I., Schmidt, H. H., Vita, G., Campistol, J. M., Gamez, J., Gorevic, P. D., Gane, E., Shah, A. M., Solomon, S. D., Monia, B. P., Hughes, S. G., Kwoh, T. J., McEvoy, B. W., Jung, S. W., Baker, B. F., Ackermann, E. J., Gertz, M. A. & Coelho, T. (2018). Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 379(1), 22-31.
- Billinton, N. & Knight, A. W. (2001). Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem*, 291(2), 175-197.
- Cano, N. J. (2002). Metabolism and clinical interest of serum transthyretin (prealbumin) in dialysis patients. *Clin Chem Lab Med*, 40(12), 1313-1319.
- Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 75, 333-366.
- Chiti, F. & Dobson, C. M. (2017). Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem*, 86, 27-68.
- Chung, C. M., Connors, L. H., Benson, M. D. & Walsh, M. T. (2001). Biophysical analysis of normal transthyretin: implications for fibril formation in senile systemic amyloidosis. *Amyloid*, 8(2), 75-83.
- Clement, C. G. & Truong, L. D. (2014). An evaluation of congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum Pathol*, 45(8), 1766-1772.
- Conceicao, I., Gonzalez-Duarte, A., Obici, L., Schmidt, H. H., Simoneau, D., Ong, M. L. & Amass, L. (2016). "Red-flag" symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 21(1), 5-9.



- Devoto, G., Gallo, F., Marchello, C., Racchi, O., Garbarini, R., Bonassi, S., Albalustri, G. & Haupt, E. (2006). Prealbumin serum concentrations as a useful tool in the assessment of malnutrition in hospitalized patients. *Clin Chem*, 52(12), 2281-2285.
- Elghetany, M. T., Saleem, A. & Barr, K. (1989). The congo red stain revisited. *Ann Clin Lab Sci*, 19(3), 190-195.
- Ericzon, B. G., Wilczek, H. E., Larsson, M., Wijayatunga, P., Stangou, A., Pena, J. R., Furtado, E., Barroso, E., Daniel, J., Samuel, D., Adam, R., Karam, V., Poterucha, J., Lewis, D., Ferraz-Neto, B. H., Cruz, M. W., Munar-Ques, M., Fabregat, J., Ikeda, S., Ando, Y., Heaton, N., Otto, G. & Suhr, O. (2015). Liver transplantation for hereditary transthyretin amyloidosis: after 20 years still the best therapeutic alternative? *Transplantation*, 99(9), 1847-1854.
- Eriksson, M., Buttner, J., Todorov, T., Yumlu, S., Schonland, S., Hegenbart, U., Kristen, A. V., Dengler, T., Lohse, P., Helmke, B., Schmidt, H. & Rocken, C. (2009). Prevalence of germline mutations in the ttr gene in a consecutive series of surgical pathology specimens with attr amyloid. *Am J Surg Pathol*, 33(1), 58-65.
- Fandrich, M. (2012). Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol Biol*, 421(4-5), 427-440.
- Faria, T. Q., Almeida, Z. L., Cruz, P. F., Jesus, C. S., Castanheira, P. & Brito, R. M. (2015). A look into amyloid formation by transthyretin: aggregation pathway and a novel kinetic model. *Phys Chem Chem Phys*, 17(11), 7255-7263.
- Gertz, M. A., Benson, M. D., Dyck, P. J., Grogan, M., Coelho, T., Cruz, M., Berk, J. L., Plante-Bordeneuve, V., Schmidt, H. H. J. & Merlini, G. (2015). Diagnosis, prognosis, and therapy of transthyretin amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*, 66(21), 2451-2466.
- Gioeva, Z., Urban, P., Meliss, R. R., Haag, J., Axmann, H. D., Siebert, F., Becker, K., Radtke, H. G. & Rocken, C. (2013). ATTR amyloid in the carpal tunnel ligament is frequently of wildtype transthyretin origin. *Amyloid*, 20(1), 1-6.
- Goncalves, I., Alves, C. H., Quintela, T., Baltazar, G., Socorro, S., Saraiva, M. J., Abreu, R. & Santos, C. R. (2008). Transthyretin is up-regulated by sex hormones in mice liver. *Mol Cell Biochem*, 317(1-2), 137-142.
- Gregorini, G., Izzi, C., Obici, L., Tardanico, R., Rocken, C., Viola, B. F., Capistrano, M., Donadei, S., Biasi, L., Scalvini, T., Merlini, G. & Scolari, F. (2005). Renal apolipoprotein A-I amyloidosis: a rare and usually ignored cause of hereditary tubulointerstitial nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 16(12), 3680-3686.
- Hammarstrom, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T. & Kelly, J. W. (2002). Sequence-dependent denaturation energetics: a major determinant in amyloid disease diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 4, 16427-16432.
- Hammarstrom, P., Simon, R., Nystrom, S., Konradsson, P., Aslund, A. & Nilsson, K. P. (2010). A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry*, 49(32), 6838-6845.
- Hawkins, P. N., Ando, Y., Dispenzeri, A., Gonzalez-Duarte, A., Adams, D. & Suhr, O. B. (2015). Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med*, 47(8), 625-638.
- Herlenius, G., Wilczek, H. E., Larsson, M., Ericzon, B. G. & Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant, R. (2004). Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the familial amyloidotic polyneuropathy world transplant registry. *Transplantation*, 77(1), 64-71.

- Howie, A. J., Brewer, D. B., Howell, D. & Jones, A. P. (2008). Physical basis of colors seen in congo red-stained amyloid in polarized light. *Lab Invest*, 88(3), 232-242.
- Hoy, S. M. (2018). Patisiran: first global approval. *Drugs*, 78(15), 1625-1631.
- Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T. & Kelly, J. W. (2004). Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry*, 43(23), 7365-7381.
- Ingenbleek, Y. & Young, V. (1994). Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr*, 14, 495-533.
- Iskra, T., Mizia, E., Musial, A., Matuszyk, A. & Tomaszewski, K. A. (2013). Carpal tunnel syndrome - anatomical and clinical correlations. *Folia Med Cracov*, 53(2), 5-13.
- Kelenyi, G. (1967a). On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J Histochem Cytochem*, 15(3), 172-180.
- Kelenyi, G. (1967b). Thioflavin S fluorescent and congo red anisotropic stainings in the histologic demonstration of amyloid. *Acta Neuropathol*, 7(4), 336-348.
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R. & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol*, 151(3), 229-238.
- Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L. & Fink, A. L. (2001). Is congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem*, 276(25), 22715-22721.
- Klingstedt, T. & Nilsson, K. P. (2011). Conjugated polymers for enhanced bioimaging. *Biochim Biophys Acta*, 1810(3), 286-296.
- Klingstedt, T., Aslund, A., Simon, R. A., Johansson, L. B., Mason, J. J., Nystrom, S., Hammarstrom, P. & Nilsson, K. P. (2011). Synthesis of a library of oligothiophenes and their utilization as fluorescent ligands for spectral assignment of protein aggregates. *Org Biomol Chem*, 9(24), 8356-8370.
- Klingstedt, T., Blechschmidt, C., Nogalska, A., Prokop, S., Haggqvist, B., Danielsson, O., Engel, W. K., Askanas, V., Heppner, F. L. & Nilsson, K. P. (2013a). Luminescent conjugated oligothiophenes for sensitive fluorescent assignment of protein inclusion bodies. *Chembiochem*, 14(5), 607-616.
- Klingstedt, T., Shirani, H., Aslund, K. O., Cairns, N. J., Sigurdson, C. J., Goedert, M. & Nilsson, K. P. (2013b). The structural basis for optimal performance of oligothiophene-based fluorescent amyloid ligands: conformational flexibility is essential for spectral assignment of a diversity of protein aggregates. *Chemistry*, 19(31), 10179-10192.
- Koike, H., Misu, K., Sugiura, M., Iijima, M., Mori, K., Yamamoto, M., Hattori, N., Mukai, E., Ando, Y., Ikeda, S. & Sobue, G. (2004). Pathology of early- vs late-onset TTR met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, 63(1), 129-138.
- Krebs, M. R., Bromley, E. H. & Donald, A. M. (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol*, 149(1), 30-37.
- Kristen, A. V., Brokbals, E., Aus dem Siepen, F., Bauer, R., Hein, S., Aurich, M., Riffel, J., Behrens, H. M., Kruger, S., Schirmacher, P., Katus, H. A. & Rocken, C. (2016). Cardiac amyloid load: a prognostic and predictive biomarker in patients with light-chain amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*, 68(1), 13-24.
- Kuci, H., Ebert, M. P. & Rocken, C. (2007). Anti-lambda-light chain-peptide antibodies are suitable for the immunohistochemical classification of AL amyloid. *Histol Histopathol*, 22(4), 379-387.
- Lam, N. & Thurston, A. (1998). Association of obesity, gender, age and occupation with carpal tunnel syndrome. *Aust N Z J Surg*, 68(3), 190-193.

- Linke, R. P. (2000). Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using congo red fluorescence. *Virchows Arch*, 436(5), 439-448.
- Marcus, A., Sadimin, E., Richardson, M., Goodell, L. & Fyfe, B. (2012). Fluorescence microscopy is superior to polarized microscopy for detecting amyloid deposits in congo red-stained trephine bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*, 138(4), 590-593.
- Matsushima, M., Yabe, I., Tsuda, M., Sakakibara, M., Shimamura, T. & Sasaki, H. (2017). Amyloid polyneuropathy and myocardial amyloidosis 10 years after domino liver transplantation from a patient with a transthyretin ser50arg mutation. *Intern Med*, 56(23), 3231-3235.
- Maurer, M. S., Schwartz, J. H., Gundapaneni, B., Elliott, P. M., Merlini, G., Waddington-Cruz, M., Kristen, A. V., Grogan, M., Witteles, R., Damy, T., Drachman, B. M., Shah, S. J., Hanna, M., Judge, D. P., Barsdorf, A. I., Huber, P., Patterson, T. A., Riley, S., Schumacher, J., Stewart, M., Sultan, M. B., Rapezzi, C. & Investigators, A.-A. S. (2018). Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 379(11), 1007-1016.
- McDiarmid, M., Oliver, M., Ruser, J. & Gucer, P. (2000). Male and female rate differences in carpal tunnel syndrome injuries: personal attributes or job tasks? *Environ Res*, 83(1), 23-32.
- Meinhardt, J. & Fandrich, M. (2009). [Structure of amyloid fibrils]. *Pathologe*, 30(3), 175-181.
- Merlini, G. & Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*, 349(6), 583-596.
- Miamed.Amboss. (2017). Lernkapitel: Karpaltunnelsyndrom [Online im Internet]. URL: <https://amboss.miamed.de/library#xid=sR0tof&term=Karpaltunnel> [Stand 14.11.2017 um 10:39 Uhr]
- Misumi, Y., Narita, Y., Oshima, T., Ueda, M., Yamashita, T., Tasaki, M., Obayashi, K., Isono, K., Inomata, Y. & Ando, Y. (2016). Recipient aging accelerates acquired transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. *Liver Transpl*, 22(5), 656-664.
- Mondelli, M., Giannini, F. & Giacchi, M. (2002). Carpal tunnel syndrome incidence in a general population. *Neurology*, 58(2), 289-294.
- Nakagawa, M., Sekijima, Y., Yazaki, M., Tojo, K., Yoshinaga, T., Doden, T., Koyama, J., Yanagisawa, S. & Ikeda, S. (2016). Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidosis. *Amyloid*, 23(1), 58-63.
- Nilsson, K. P. (2009). Small organic probes as amyloid specific ligands--past and recent molecular scaffolds. *FEBS Lett*, 583(16), 2593-2599.
- Nilsson, K. P., Hammarstrom, P., Ahlgren, F., Herland, A., Schnell, E. A., Lindgren, M., Westermark, G. T. & Inganas, O. (2006). Conjugated polyelectrolytes--conformation-sensitive optical probes for staining and characterization of amyloid deposits. *Chembiochem*, 7(7), 1096-1104.
- Nilsson, K. P., Herland, A., Hammarstrom, P. & Inganas, O. (2005). Conjugated polyelectrolytes: conformation-sensitive optical probes for detection of amyloid fibril formation. *Biochemistry*, 44(10), 3718-3724.
- Nilsson, K. P., Ikenberg, K., Aslund, A., Fransson, S., Konradsson, P., Rocken, C., Moch, H. & Aguzzi, A. (2010). Structural typing of systemic amyloidoses by luminescent-conjugated polymer spectroscopy. *Am J Pathol*, 176(2), 563-574.

- Nordstrom, D. L., DeStefano, F., Vierkant, R. A. & Layde, P. M. (1998). Incidence of diagnosed carpal tunnel syndrome in a general population. *Epidemiology*, 9(3), 342-345.
- Nystrom, S., Back, M., Nilsson, K. P. R. & Hammarstrom, P. (2017). Imaging amyloid tissues stained with luminescent conjugated oligothiophenes by hyperspectral confocal microscopy and fluorescence lifetime imaging. *J Vis Exp*(128).
- Patel, K. S. & Hawkins, P. N. (2015). Cardiac amyloidosis: where are we today? *J Intern Med*, 278(2), 126-144.
- Puchtler, H. & Sweat, F. (1965). Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 13(8), 693-694.
- Puchtler, H., Sweat, F. & Levine, M. (1962). On the binding of congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem*, 10(3), 355-364.
- Puchtler, H., Waldrop, F. S. & Valentine, L. S. (1973). Fluorescence microscopic distinction between elastin and collagen. *Histochemie*, 35(1), 17-30.
- Quintas, A., Vaz, D. C., Cardoso, I., Saraiva, M. J. & Brito, R. M. (2001). Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J Biol Chem*, 276(29), 27207-27213.
- Quintela, T., Alves, C. H., Goncalves, I., Baltazar, G., Saraiva, M. J. & Santos, C. R. (2008). 5Alpha-dihydrotestosterone up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroid plexus via an androgen receptor independent pathway. *Brain Res*, 1229, 18-26.
- Rapezzi, C., Riva, L., Quarta, C. C., Perugini, E., Salvi, F., Longhi, S., Ciliberti, P., Pastorelli, F., Biagini, E., Leone, O., Cooke, R. M., Bacchi-Reggiani, L., Ferlini, A., Cavo, M., Merlini, G., Perlini, S., Pasquali, S. & Branzi, A. (2008). Gender-related risk of myocardial involvement in systemic amyloidosis. *Amyloid*, 15(1), 40-48.
- Rocken, C. & Eriksson, M. (2009). [Amyloid and amyloidoses]. *Pathologe*, 30(3), 182-192.
- Rocken, C. & Sletten, K. (2003). Amyloid in surgical pathology. *Virchows Arch*, 443(1), 3-16.
- Rocken, C., Ernst, J., Hund, E., Michels, H., Perz, J., Saeger, W., Sezer, O., Spuler, S., Willig, F., Schmidt, H. H. & Deutsche Gesellschaft fur Amyloid-Krankheiten e. V. (2006). [Interdisciplinary guidelines on diagnosis and treatment for extracerebral amyloidoses--published by the german society of amyloid diseases (www.amyloid.de)]. *Dtsch Med Wochenschr*, 131(27 Suppl 2), 45-66.
- Rocken, C., Schwotzer, E. B., Linke, R. P. & Saeger, W. (1996). The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice. *Histopathology*, 29(4), 325-335.
- Sattler, J. B., Klußmann, A., Arnold-Schulz-Gahmen, B., Vasterling, A., Wagner, H. & Hartmann, B. (2014). S1-Leitlinie: Händigkeit - Bedeutung und Untersuchung. URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/002-017.html>. [Stand 15.05.2018 um 20:44 Uhr]
- Scarpioni, R., Ricardi, M., Albertazzi, V., De Amicis, S., Rastelli, F. & Zerbini, L. (2016). Dialysis-related amyloidosis: challenges and solutions. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 9, 319-328.
- Schonland, S. O., Hegenbart, U., Bochtler, T., Mangatter, A., Hansberg, M., Ho, A. D., Lohse, P. & Rocken, C. (2012). Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood*, 119(2), 488-493.
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2011). Prometheus - Lernatlas der Anatomie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Sekijima, Y., Uchiyama, S., Tojo, K., Sano, K., Shimizu, Y., Imaeda, T., Hoshii, Y., Kato, H. & Ikeda, S. (2011). High prevalence of wild-type transthyretin deposition in patients with idiopathic carpal tunnel syndrome: a common cause of carpal tunnel syndrome in the elderly. *Hum Pathol*, 42(11), 1785-1791.
- Sekijima, Y., Wiseman, R. L., Matteson, J., Hammarstrom, P., Miller, S. R., Sawkar, A. R., Balch, W. E. & Kelly, J. W. (2005). The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. *Cell*, 121(1), 73-85.
- Siddiqi, O. K. & Ruberg, F. L. (2018). Cardiac amyloidosis: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Trends Cardiovasc Med*, 28(1), 10-21.
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J. & Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification international society of amyloidosis 2016 nomenclature guidelines. *Amyloid*, 23(4), 209-213.
- Sjolander, D., Bijzet, J., Hazenberg, B. P., Nilsson, K. P. & Hammarstrom, P. (2015). Sensitive and rapid assessment of amyloid by oligothiophene fluorescence in subcutaneous fat tissue. *Amyloid*, 22(1), 19-25.
- Sjolander, D., Rocken, C., Westermark, P., Westermark, G. T., Nilsson, K. P. & Hammarstrom, P. (2016). Establishing the fluorescent amyloid ligand h-FTAA for studying human tissues with systemic and localized amyloid. *Amyloid*, 23(2), 98-108.
- Sorgjerd, K., Klingstedt, T., Lindgren, M., Kagedal, K. & Hammarstrom, P. (2008). Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(4), 1072-1078.
- Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A. & Saraiva, M. J. (2001). Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am J Pathol*, 159(6), 1993-2000.
- Sueyoshi, T., Ueda, M., Jono, H., Irie, H., Sei, A., Ide, J., Ando, Y. & Mizuta, H. (2011). Wild-type transthyretin-derived amyloidosis in various ligaments and tendons. *Hum Pathol*, 42(9), 1259-1264.
- Ueda, M., Ando, Y., Hakamata, Y., Nakamura, M., Yamashita, T., Obayashi, K., Himeno, S., Inoue, S., Sato, Y., Kaneko, T., Takamune, N., Misumi, S., Shoji, S., Uchino, M. & Kobayashi, E. (2007). A transgenic rat with the human ATTR v30m: a novel tool for analyses of ATTR metabolisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 352(2), 299-304.
- Westermark, P., Sletten, K., Johansson, B. & Cornwell, G. G., 3rd. (1990). Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), 2843-2845.
- Winter, M., Tholey, A., Kruger, S., Schmidt, H. & Rocken, C. (2015). Maldi-mass spectrometry imaging identifies vitronectin as a common constituent of amyloid deposits. *J Histochem Cytochem*, 63(10), 772-779.
- Youngstein, T., Gilbertson, J. A., Hutt, D. F., Coyne, M. R. E., Rezk, T., Manwani, R., Quarta, C. C., Lachmann, H. J., Gillmore, J. D., Beynon, H., Goddard, N. & Hawkins, P. N. (2017). Carpal tunnel biopsy identifying transthyretin amyloidosis. *Arthritis Rheumatol*, 69(10), 2051.

## 7 **Anhang**

### 7.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Die Strukturformel von Kongorot, einem sulfonierten Bi-Naphthyl-Azofarbstoff. ....	11
Abbildung 2: Die Strukturformel von ThT als Beispiel für die Benzothiazol-Farbstoffe ThS und ThT. ....	13
Abbildung 3: Die Strukturformel von h-FTAA.....	17
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Amyloidgehalts in jeweils einzelnen ausgewählten Arealen mittels ImageJ.....	33
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Amyloidgehalts im gesamten Gewebe mittels ImageJ. ....	35
Abbildung 6: Der Vergleich zwischen kongorot- und h-FTAA-gefärbten Arealen sowie Negativkontrollen ohne Kongorot- oder h-FTAA-Färbung. ....	40
Abbildung 7: Übersichtsdarstellung des Studiendesigns. ....	42
Abbildung 8: Vergleich von Anti-TTR-, h-FTAA- und Kongorot- Färbung in Serienschnitten des Synovialgewebes des Karpaltunnels.....	43
Abbildung 9: Lineare Regressionsanalyse der Korrelationen zwischen den verschiedenen Färbungen.....	44
Abbildung 10: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Alters in Jahren bei Diagnosestellung, für Männer und Frauen getrennt. ....	46
Abbildung 11: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Amyloidgehalts in Prozent der Kohorte A. ....	46
Abbildung 12: Medianer Amyloidgehalt in Prozent nach Alter in Jahren und getrennt nach Geschlecht.....	47
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung elastischer Fasern in den jeweiligen Färbungen Anti-TTR, Elastica-van-Gieson, h-FTAA und Kongorot in einem Areal ohne Amyloidablagerungen.....	50
Abbildung 14: Exemplarischer Vergleich von Anti-TTR- und Vitronectin-Färbung....	51
Abbildung 15: Posterpräsentation bei der 100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) e.V. in Berlin, 20.05.2016 .....	VI

---

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die im Jahr 2016 bekannten Amyloidproteine.....	3
Tabelle 2: Korrelation der Patienteneigenschaften mit dem Amyloidgehalt. Altersaufteilung anhand des jeweiligen Median.....	48
Tabelle 3: Patienteneigenschaften in der Übersicht. ....	52

### **7.3 Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, Annette Christina Katharina Streit, geb. Hahn, geboren am 21.03.1991 in Preetz, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

---

Ort, Datum

---

Katharina Streit



#### **7.4 Danksagung**

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Röcken. Er hat durch seine Vorlesungen im Studium mein Interesse für die Forschung im Bereich der Pathologie geweckt. Ich möchte ihm für seine allzeit unterstützende Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertation danken, insbesondere für seine unermüdliche Geduld und sein Verständnis für den zeitlichen Ablauf dieser Arbeit.

Herrn Dr. Peter Urban, Herrn Dr. Rolf Rüdiger Meliß sowie allen anderen Einsendern danke ich für die Zusendung der Resektate, ohne deren kollegiales Verhalten das Amyloidregister Kiel nicht so umfangreich und mit epidemiologischer Relevanz aufgestellt wäre.

Vielen Dank an Herrn Prof. Per Hammarström von der Linköping Universität in Schweden für die großzügige Bereitstellung des h-FTAA-Farbstoffs sowie für seine beständige Forschung an LCPs/LCOs und Amyloid. In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn K. Peter R. Nilsson.

Ich möchte dem Team im Proteinlabor des Instituts für Pathologie am UKSH Kiel danken, insbesondere Frau Sandra Krüger für die bereitwillige Anleitung zum selbständigen Arbeiten im Labor und Frau Denisa Hajzeri für das Erstellen der neuen Serienschnitte. Mein Dank gilt auch dem Institut für Hämatopathologie am UKSH Kiel, hier insbesondere Frau Olivera Batic und Frau Charlotte Botz-Von Drathen, für die Organisation eines reibungslosen Ablaufs und für die großzügige Möglichkeit, den Hamamatsu Fluoreszenzscanner etliche Stunden in Beschlag nehmen zu dürfen.

Herrn Dr. Behrens danke ich für die wertvolle Zeit für Diskussionen und die geduldige Anleitung zur statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Frederike Gaudian danke ich für ihre bereitwillige Hilfe bei der graphischen Anpassung der Abbildungen für die Druckversion der Dissertation.

Ich danke meinen Eltern von Herzen für all das Gute, das sie mir mit auf den Weg gegeben haben, und für die Unterstützung in jedweder Lebenssituation.

David Humphreys danke ich für die motivierenden Worte aus der Ferne.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Daniel Streit. Seine beständige Fürsorge ist ein großes Geschenk.

## 7.5 Publikationen

### 7.5.1 Abstract

Mai 2016

Der Pathologe, 2016 Mai;37(Suppl.1):129

**Establishing and validating the fluorescent amyloid ligand h-FTAA (heptamer formyl thiophene acetic acid) to identify amyloid deposits in the carpal tunnel ligament**

K. Hahn<sup>a</sup>, P. Nilsson<sup>b</sup>, P. Hammarstrom<sup>b</sup>, P. Urban<sup>c</sup>, R. Meliß<sup>d</sup>, H.-M. Behrens<sup>a</sup>, C. Röcken<sup>a</sup>

a Department of Pathology, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany;

b IFM-Department of Chemistry, Linköping University, Linköping, Sweden;

c Institute of Pathology and Dermatopathology, Gehrden, Germany;

d Institute of Dermatopathology, Hannover, Germany

## 7.5.2 Kongressbeitrag

## Establishing and validating the fluorescent amyloid ligand h-FTAA (heptamer formyl thiophene acetic acid) to identify amyloid deposits in the carpal tunnel ligament

Katharina Hahn<sup>1</sup>, Peter R. Nilsson<sup>2</sup>, Per Hammarstrom<sup>2</sup>, Peter Urban<sup>3</sup>, Rolf Rüdiger Meliss<sup>4</sup>, Hans-Michael Behrens<sup>1</sup>, Sandra Krüger<sup>1</sup>, Christoph Röcken<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

<sup>2</sup>IFM-Department of Chemistry, Linköping University, Sweden

<sup>3</sup>Institute of Pathology, Gehrden, Germany

<sup>4</sup>Institute of Dermatopathology, Hannover, Germany

### Background

Congo red is not very sensitive for the detection of tiny amyloid spots with the pitfall of staining collagen fibers. h-FTAA is supposed to detect tiny amyloid spots without staining collagen. Here, we aimed to prove the hypothesis that h-FTAA is more sensitive than Congo red for the detection of amyloid.

### Methods

From the Amyloid Registry of the Institute of Pathology, Christian-Albrechts-University, we retrieved 53 formalin-fixed and paraffin-embedded samples from 50 patients with ATTR amyloid of the carpal tunnel ligament. Serial sections were stained with Congo red, h-FTAA (dilution 1:500; 30 min.), and an antibody directed against transthyretin (TTR). Congo red- and h-FTAA-stained sections were mounted using DAPI medium in order to enable scanning using a Hamamatsu scanner (fluorescent light, 40x resolution, 4x exposure time, DAPI as focus filter). Corresponding areas of the three different stains were identified and the amount of amyloid was detected by the color threshold function of Image J. Thresholds were determined by identifying the amount of amyloid in 20 randomly chosen patient samples. The mean value for Congo red and h-FTAA was calculated and then used for all areas of the cohort. The percentage of pixels containing amyloid in relation to the whole chosen area was calculated and compared in between the three different stains.

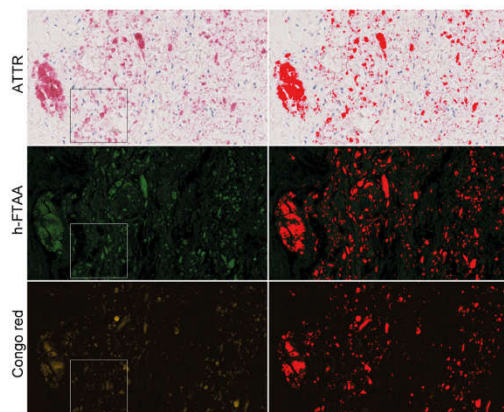


Figure 1: Comparison of TTR-immunostaining, h-FTAA, and Congo red staining in serial sections of the carpal tunnel ligament. The left figure of each dye shows the normal staining, the right figure shows the ImageJ calculation. Not all of the tiny amyloid deposits seen in ATTR and h-FTAA are visible in Congo red stained sections. Original magnifications 200-fold.

### Conclusion

Our study shows that h-FTAA is a highly sensitive method to detect even small amounts of TTR-amyloid in the carpal tunnel ligament. The staining protocol is easy and h-FTAA may be a much more sensitive procedure to detect amyloid at an earlier stage. However it necessitates availability of fluorescence microscopy.

Funding: The study was supported by Grants of the BMBF (GERAMY)

CAU

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Medizinische Fakultät Institut für Pathologie

### Results

Amyloid was found in all samples with a characteristic yellow-green-birefringence and typical fluorescence color after Congo red-staining. Amyloid stained intensely with h-FTAA and an anti-TTR-antibody (Fig. 1, 2). Tiny amyloid deposits were barely visible or not identified by Congo red-staining in comparison with h-FTAA and TTR-immunostaining (Fig. 1, 2). This observation was confirmed by computational quantification of the scanned tissue sections: the highest percentage area was found in TTR-immunostained sections (44%), followed by h-FTAA (31%) and Congo red (26%). The mean amyloid content was 6.7% for TTR, 6.5% for h-FTAA and 3.9% for Congo red. Using linear regression analysis, the results were statistically significant ( $p < 0.001$ ; Fig. 3). The Pearson correlation coefficient was 0.8 (Congo red vs. h-FTAA) and 0.9 (TTR vs. h-FTAA; Fig. 3).

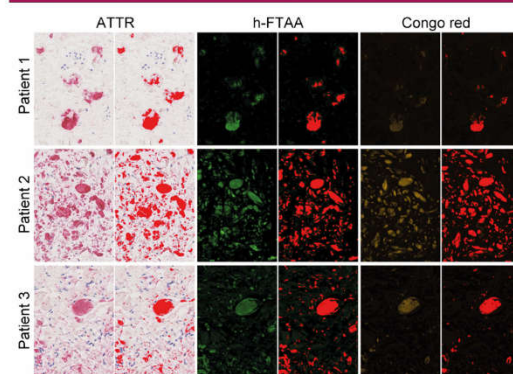


Figure 2: Comparison of TTR-immunostaining, h-FTAA, and Congo red staining in serial sections of the carpal tunnel ligament obtained from three different patients. The first row of each staining, i.e. ATTR, h-FTAA and Congo red, shows regular staining of each dye, the second row shows the ImageJ calculation. It is difficult to see amyloid deposits in Congo red especially if there is a small amount of amyloid present. Original magnifications 200-fold.

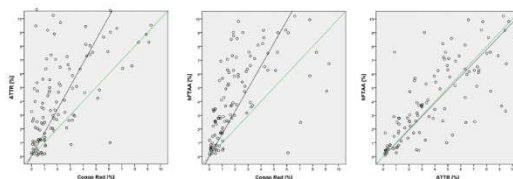


Figure 3: Scatterplots showing the correlation of ATTR vs. Congo red ( $R^2 = 0.508$ , Pearson Correlation = 0.819), h-FTAA vs. Congo red ( $R^2 = 0.343$ , Pearson Correlation = 0.8), and h-FTAA vs. ATTR ( $R^2 = 0.720$ , Pearson Correlation = 0.877). The green line shows the reference line, the black line shows the Fit line for total.

7.5.3 Eigene Originalarbeiten

07.11.2018 (Epub) HaMiPla - Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie, 2018 Sep;50(5):329-334

**Karpaltunnelsyndrom und ATTR-Amyloidose**

Katharina Hahn<sup>1</sup>, Peter Urban<sup>2</sup>, Rolf Rüdiger Meli<sup>2</sup>, Hans-Detlef Axmann<sup>3</sup>, Frank Siebert<sup>3</sup>, Christoph Röcken<sup>1</sup>

1 Institut für Pathologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

2 Institut für Pathologie und Dermatopathologie Hannover

3 Zentrum für Hand- und Fußchirurgie Hannover

23.04.2017 (Epub) Amyloid, the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis, 2017 Jun;24(2):78-86

**Establishing and validating the fluorescent amyloid ligand h-FTAA (heptamer formyl thiophene acetic acid) to identify transthyretin amyloid deposits in carpal tunnel syndrome**

Katharina Hahn<sup>a</sup>, K. Peter R. Nilsson<sup>b</sup>, Per Hammarström<sup>b</sup>, Peter Urban<sup>c</sup>, Rolf Rüdiger Meliss<sup>d</sup>, Hans-Michael Behrens<sup>a</sup>, Sandra Krüger<sup>a</sup>, und Christoph Röcken<sup>a</sup>

a Department of Pathology, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany;

b IFM-Department of Chemistry, Linköping University, Linköping, Sweden;

c Institute of Pathology and Dermatopathology, Gehrden, Germany;

d Institute of Dermatopathology, Hannover, Germany

## **7.6 Akademischer Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf nicht veröffentlicht.