

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

## **Komplement 9 in Amyloidablagerungen**

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

vorgelegt von

**Annelie Lux**

aus **Güstrow**

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Baron

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.07.2023

gez.: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

(Vorsitzender der Prüfungskommission)



1.5.1 Fibrilläre Proteine.....	22
1.5.2 Nicht-fibrilläre Proteine .....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	23
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Ethikvotum .....	24
2.2 Patientenkollektiv .....	24
2.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kitsystem.....	25
2.4 Chemikalien und Antikörper .....	26
2.5 Histologie und Immunhistochemie.....	27
2.6 Klassifizierung der Amyloidosen .....	27
2.7 Bestimmung spezifischer Proteine innerhalb der Amyloidablagerungen.....	27
2.8 Nachweis immunreaktiver Zellen.....	28
2.9 Software und Auswertung .....	28
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 Immunhistochemische Färbung am Gesamtkollektiv .....	28
3.1.1 Nachweis von Komplement 9 .....	34
3.1.2 Nachweis von Apolipoprotein E .....	35
3.1.3 Nachweis von Caspase 3.....	36
3.1.4 Nachweis von Komplement 3 .....	37
3.2 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen .....	38
3.2.1 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen im Myokard .....	40
3.2.2 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen in der Niere.....	42
3.2.3 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen in der Haut .....	43
3.2.4 Weitere Auffälligkeiten.....	43
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1 Komplement 9 ist ubiquitär angereichert .....	45
4.2 Amyloid führt zum Zelltod.....	46
4.3 Proteomics bei Amyloidosen.....	47

4.4	Einschränkungen der Studie .....	48
4.5	Ausblick.....	49
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	63
7.2	Tabellenverzeichnis .....	64
7.3	Eidesstattliche Erklärung.....	65
7.4	Danksagung .....	66
7.5	Publikation.....	67

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Serum Amyloid A-Amyloidose
AD	Alzheimer Erkrankung
AH	Schwerketten-Amyloidose
aHUS	Atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
AIns	Insulin-Amyloidose
AL	Leichtketten-Amyloidose
APAF1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid-precursor-protein</i>
ATTR	Transthyretin-Amyloidose
ATTRwt	Wildtyp Transthyretin-Amyloidose
A $\beta$	$\beta$ -Amyloidose
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma-protein</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Cas3	Caspase 3
CFH	Komplement Faktor H
CFHR	<i>Complement factor H related peptide</i>
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
C3	Komplement 3
C3G	C3-Glomerulopathie

C3GN	C3-Glomerulonephritis
C3NeF	C3-nephritischer Faktor
C9	Komplement 9
DDD	<i>Dense deposit disease</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HLP III	Typ III Hyperlipoproteinämie
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IAPP	Inselzellenamyloidprotein
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
MACPF	<i>Membrane-attack-complex-perforin domain</i>
MBL	Mannose-bindendes Lektin
mRNA	Boten-RNA
PNS	Peripheres Nervensystem
PRF1	Perforin 1
SAP	Serum-Amyloid-P
TCC	<i>Terminal complement complex</i>

TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

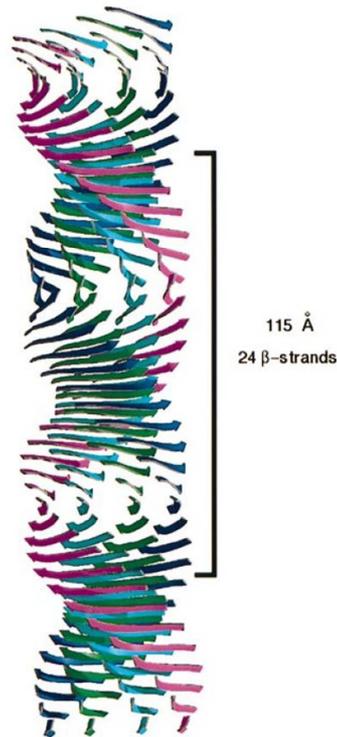
## 1.1 Amyloid und Amyloidosen

### 1.1.1 Definition und strukturelle Charakteristika

Die Bezeichnung Amyloid drückt einen Komplex aus abnorm veränderten Proteinen und Polysacchariden aus, welcher sich sowohl intrazellulär als auch extrazellulär im Gewebe ablagern kann (Benson et al., 2020; Chiti & Dobson, 2017). Rudolph Virchow führte den Begriff „Amyloid“ zum ersten Mal im Jahr 1854 ein und beschrieb damit eine pathologische stärkeähnliche Substanz mit der Annahme, dass es Cellulose oder Stärke sei (Benson et al., 2020).

Erkrankungen, bei welchen es zu solchen Amyloidablagerungen kommt und folge dessen auch zu Veränderungen der Gewebe- und Organfunktion bis hin zum Organversagen, werden als Amyloidosen zusammengefasst. Die Amyloidosen werden zu den Konformationskrankheiten gezählt, denn ursächlich für die Entstehung dieser Amyloidablagerungen ist die Ausbildung von körpereigenen, fehlgefalteten und unlöslichen Polypeptidaggregaten, die sich durch eine besondere Konformation auszeichnen - der  $\beta$ -Faltblattstruktur (Merlini & Bellotti, 2003). Amyloidosen sind bisher in Menschen und anderen Wirbeltieren gefunden worden. Diese können sowohl lokal als auch systemisch in Erscheinung treten. Aktuell sind 22 Proteine als Ursache für eine lokale Amyloidose und 18 Proteine für eine systemische Amyloidose identifiziert, wobei vier Amyloidproteine (AL, AH, APrP, ACal) beide Formen auslösen können (Benson et al., 2020).

Der Hauptbestandteil der Amyloidablagerung ist die Proteinfibrille, auch Amyloidfibrille genannt. Sie bestimmt viele der Haupteigenschaften der Amyloidablagerung und ihrer dazugehörigen Erkrankung, unter anderem das Verhalten über Widerstandsfähigkeit, Aussaat und Abbau (Benson et al., 2018). Die Fibrille wird aus dem Amyloidvorläuferprotein gebildet. Derzeit sind 36 solcher Proteine bekannt, die zur Ausbildung von Amyloid im Menschen fähig sind (Benson et al., 2020). Die reife Amyloidfibrille, mit einem Durchmesser von etwa 10-12 nm und von unterschiedlicher Länge, durchläuft eine Reihe von Bildungsreaktionen. Schlussendlich entsteht ein polymeres Konstrukt, indem das Proteinrückgrat eine Cross- $\beta$ -Struktur ausbildet und den Kern der Fibrille bildet (Meinhardt & Fändrich, 2009). Das Konstrukt besteht aus einem oder mehreren Amyloidprotofilamenten, den  $\beta$ -Faltblättern (Meinhardt & Fändrich, 2009). Innerhalb dieser Faltblätter sind die  $\beta$ -Stränge parallel zueinander, aber senkrecht zur Hauptfibrillenachse ausgerichtet. Die  $\beta$ -Stränge interagieren über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen miteinander. Durch die Verdrehung der einzelnen  $\beta$ -Stränge kommt es zur helikalen Windung der  $\beta$ -Faltblätter (Chiti & Dobson, 2017; Meinhardt & Fändrich, 2009; Sunde et al., 1997) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Das Modell eines Amyloidfilaments. Vier  $\beta$ -Faltblätter (blau, grün, türkis, rot) verlaufen parallel zur Fibrillenachse, die einzelnen  $\beta$ -Stränge jedoch senkrecht dazu. Die helikale Windung der Protofilamente entsteht aus der Verdrehung der einzelnen  $\beta$ -Stränge, wobei die helikale Achse mit der Hauptfibrillenachse übereinstimmt. Eine Helixwiederholung mit einer Länge von 115 Å besteht aus 24  $\beta$ -Strängen (Sunde et al., 1997). Nachdruck mit Genehmigung von Sunde et al., 1997, Copyright Elsevier.

Die unverzweigte Fibrille besitzt zudem eine hohe Affinität zu Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin (Meinhardt & Fändrich, 2009). Um nun als Amyloid charakterisiert werden zu dürfen, müssen die folgenden drei Merkmale vorliegen: die Fibrillenstruktur, die  $\beta$ -Faltblattstruktur und die Eigenschaft bezüglich der Anfärbbarkeit (Chiti & Dobson, 2017).

Abgesehen von dem Amyloidvorläuferprotein gibt es weitere Komponenten, die den Fibrillen aufgelagert sind und somit in den Amyloidablagerungen anzutreffen sind. Zu nennen sind vor allem die Amyloid-Signaturproteine, die an der Amyloidogenese beteiligt sind. Hierzu zählen Serum-Amyloid-P (SAP), Apolipoprotein AI, Apolipoprotein AIV, Apolipoprotein E (ApoE) und Heparansulfat (Benson et al., 2020). Des Weiteren lassen sich Substrate der extrazellulären Matrix wie Vitronectin, Kollagen Typ IV und Laminin regelmäßig in den Ablagerungen nachweisen (Benson et al., 2020; Merlini & Bellotti, 2003; Vrana et al., 2009). Bisher ist aber nicht vollständig geklärt, wie diese einzelnen nicht-amyloidogenen Proteine mit den Ablagerungen in Bezug stehen und wie sie die Pathogenese der Amyloidose beeinflussen.

## 1.1.2 Übersicht der Amyloidproteine und Nomenklatur

Die bis ins Jahr 2020 identifizierten Amyloidproteine können der Tabelle 1 entnommen werden. Die Anzahl der bekannten Amyloidproteine ist eine unbeständige Zahl. Die Nomenklatur der Amyloidproteine ergibt sich aus der Kombination aus einem „A“ für Amyloid und des sich anschließenden Suffix, bestehend aus der Abkürzung des amyloidogenen Vorläuferproteins. Zum Beispiel AL als Kennzeichnung des amyloidogenen Vorläuferproteins Immunglobulinleichtkette (L) und AL-Amyloidose als die dazugehörige Erkrankung. Zusätzliche Bezeichnungen, beispielsweise für einen Wildtyp (wt) oder Mutationsvarianten (v), können ergänzt werden (z.B. ATTRwt) (Benson et al., 2020).

**Tabelle 1:** Übersicht der im Menschen vorkommenden Amyloidproteine und deren Vorläuferproteine. Stand 2020 (Benson et al., 2020).

<b>Amyloid-protein</b>	<b>Vorläuferprotein</b>	<b>S/L</b>	<b>E/H</b>	<b>Zielorgan/Erkrankung</b>
AL	Immunglobulinleichtkette	S, L	E,H	Alle Organe außer ZNS
AH	Immunglobulinschwerkette	S, L	E	Alle Organe außer ZNS
AA	Serum Amyloid A	S	E	Alle Organe außer ZNS
ATTR	Transthyretin, Wildtyp	S	E	Herz, Lunge, Ligamente, Sehnscheiden
	Transthyretin, Mutationsvarianten	S	H	PNS, ANS, Herz, Auge, Leptomeningen
A $\beta$ 2M	$\beta$ 2-Mikroglobulin, Wildtyp	S	E	Muskoskelettales System
	$\beta$ 2-Mikroglobulin, Mutationsvarianten	S	H	ANS
AApoAI	Apolipoprotein A-I, Mutationsvarianten	S	H	Herz, Leber, Niere, PNS, Hoden, Larynx, Haut
AApoAII	Apolipoprotein A-II, Mutationsvarianten	S	H	Niere
AApoAIV	Apolipoprotein A-IV, Wildtyp	S	E	Niere, Knochenmark
AApoCII	Apolipoprotein C-II, Mutationsvarianten	S	H	Niere
AApoCIII	Apolipoprotein C-III, Mutationsvarianten	S	H	Niere
AGel	Gelsolin, Mutationsvarianten	S	H	PNS, Kornea
ALys	Lysozym, Mutationsvarianten	S	H	Niere
ALECT2	Leukozyten-chemotaktischer Faktor 2	S	E	Niere
AFib	Fibrinogen $\alpha$ , Mutationsvarianten	S	H	Niere
ACys	Cystatin C, Mutationsvarianten	S	H	PNS, Haut
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
A $\alpha$ Syn	$\alpha$ -Synuclein	L	E	ZNS
ATau	Tau	L	E	ZNS

APrP	Prionenprotein, Wildtyp	L	E	CJD, tödliche Schlaflosigkeit
	Prionenprotein, Mutationsvarianten	L	H	CJD, GSS-Syndrom, tödliche Schlaflosigkeit
	Prionenprotein, Mutationsvariante	S	H	PNS
ACal	(Pro)Calcitonin	L	E	Medulläres Schilddrüsen- karzinom
AIAPP	Inselzellenamyloidprotein (Amylin)	L	E	Langerhans'sche Inselzellen, Insulinom
AANF	Atrialer natriuretischer Faktor	L	E	Herzvorhof
APro	Prolaktin	L	E	Hypophysenprolaktinom, Hypophyse im Alter
AIns	Insulin	L	E	Iatrogene lokale Injektionen
ASPC	Surfactant-assoziiertes Protein C	L	E	Lunge
AGal7	Galaktin 7	L	E	Haut
ACor	Korneodesmosin	L	E	Verhorntes Plattenepithel, Haarfollikel
AMed	Laktadherin, Medin	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 Tumore
ASem1	Semenogelin 1	L	E	Samenblasen
AEnf	Enfurvitide	L	E	Iatrogen
ACatK	Kathepsin K	L	E	Tumor-assoziiert

Legende: ANS = Autonomes Nervensystem, CJD = Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, E = Erworben, GSS = Gerstmann-Sträussler-Scheinker, H = Hereditär, L = Lokal, PNS = Peripheres Nervensystem, S = Systemisch, ZNS = Zentrales Nervensystem.

### 1.1.3 Pathophysiologie der Amyloidogenese

Die Amyloidausbildung ist von multifaktorieller Genese. Die Basis bildet die pathologische Fehlfaltung der Proteine und Peptide. Nachfolgend kommt es zu einer Aggregation dieser Proteine, gekennzeichnet durch eine verringerte Faltungsstabilität und einer gesteigerten Neigung, mehr als einen Konformationszustand einzunehmen (Merlini & Bellotti, 2003; Röcken & Eriksson, 2009). Nach Abschluss der Proteinsynthese befindet sich das native Protein in einem dynamischen Gleichgewicht (Merlini & Bellotti, 2003). Je nach Faltungseigenschaften kann das Protein nun zur Aggregation neigen. Liegt ein instabiler Faltungszustand vor, ist das Risiko zur Proteinaggregation erhöht. Umgekehrt bedeutet dies, je stabiler der Faltungszustand, desto geringer die Aggregationsneigung (Röcken & Eriksson, 2009).

Die Einnahme des pathologischen Konformationszustandes bei Amyloidosen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen und wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Im Folgenden sind einige Beispiele genannt. (1) Ursächliche Proteine für hereditäre Amyloidosen können ihren Zustand der Fehlfaltung durch Mutationen, im Sinne von *Änderungen der Aminosäuresequenz*, erworben haben (Buxbaum & Tagoe, 2000). (2) Einige Amyloidproteine besitzen eine *altersbedingte intrinsische Bereitschaft* zur Fehlfaltung (z.B. Transthyretin) (Saraiva, 2001). (3) Eine stets erhöhte *Konzentration des Vorläuferproteins im Serum* (z.B.  $\beta$ 2-Mikroglobulin) kann die Entstehung einer Amyloidose steigern (Verdone et al., 2002). (4) Die pathologische Konformation kann durch eine modifizierte *proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins* bedingt sein (z.B.  $\beta$ -Amyloid-Vorläuferprotein, APP) (McLaurin et al., 2000). (5) Eine dem Alter geschuldete *Dezimierung der Chaperon-Moleküle*, die für die Rekrutierung der abzubauenen Proteine verantwortlich sind, begünstigt den Krankheitsprozess (Chiti & Dobson, 2017). (6) Weitere Faktoren, die eine Fehlfaltungsbegünstigende Rolle einnehmen, sind ein niedriger pH-Wert, eine erhöhte Temperatur, Oxidation und Metallionen (Merlini & Bellotti, 2003).

#### 1.1.4 Diagnostik der Amyloidosen

Die Amyloid-Diagnostik erfolgt auf Grundlage der Histologie und hat einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose, da diese mitunter stark vom Erkrankungsstadium abhängt. Aus diesem Grund ist eine möglichst schnelle und akkurate Diagnostik so wichtig. Bei klinischem Verdacht muss eine Gewebeprobe des Patienten bioptisch gesichert werden. Das zu untersuchende Gewebe wird in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Am 2  $\mu$ m dicken Paraffinschnitt erfolgt die Kongorot-Färbung nach Puchtler, die den Goldstandard der Diagnostik darstellt (Puchtler et al., 1962). Anschließend erfolgt die polarisationsmikroskopische Betrachtung. Amyloid und dessen Ablagerungen zeigen eine anomale Polarisationsfarbe von orange-gelb-rot bis hin zu grün-türkis-blau, je nach Färbeprotokoll und Ausrichtung der Fibrillen (Benson et al., 2020; Howie & Brewer, 2009). Die Polarisationsfarbe kann nur bei maximaler Helligkeit der Lichtquelle im Dunkelfeld sichtbar gemacht werden. Dazu muss der Polarisator (ein Polarisationsfilter zwischen der Lichtquelle und dem Präparat) orthogonal zum Analysator (ein Polarisationsfilter zwischen dem Präparat und dem Betrachter) ausgerichtet werden. Durch die manuelle Bewegung des Polarisators oder Analysators durch den Betrachter können nun die optischen Eigenschaften des Amyloids ausgenutzt und die anomale Polarisationsfarbe erzeugt werden (Röcken & Eriksson, 2009). Das Färbeergebnis der Kongorot-Färbung und nachfolgend auch die Intensität der Polarisationsfarbe sind abhängig vom Amyloidtyp (Röcken, 2018).

Die Kongorot-Färbung ist jedoch mit einer geringen Sensitivität gekennzeichnet, vor allem bei Vorliegen von nur geringen Mengen an Amyloid. Demzufolge ist diese Form der Diagnostik limitiert.

Wird hingegen die Schichtdicke von 2-5 µm auf 5-10 µm erhöht, kann die Sensitivität gesteigert werden, ferner auch mit der Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop. Hier zeigt sich eine gelb-orange Fluoreszenz (Linke, 2000). Ein weiterer Farbstoff zur Verbesserung der Sensitivität ist das h-FTAA (*heptamer formyl thiophene acetic acid*). Er ist hochsensitiv und das bereits bei einer geringeren Amyloidbelastung, wo die Kongorot-Färbung noch negativ ausfällt (Sjölander et al., 2016). Zudem lässt sich die Erkrankung schon in früheren Stadien der Amyloidbildung bis hin zu prä-amyloidogenen Ablagerungen diagnostizieren (Hahn et al., 2017; Sjölander et al., 2016).

Eine biochemische Möglichkeit für die Identifizierung einer Amyloidose ist die bildgebende Massenspektrometrie (MSI = Mass Spectrometry Imaging). Am Institut für Pathologie in Kiel wurden amyloidhaltige FFPE Gewebeschnitte mittels MALDI-IMS MSI (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging with ion mobility separation*) und einem Peptidfilter (MDIC-Filter) untersucht. Es stellte sich heraus, dass dieses Verfahren für die Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen geeignet ist (Winter et al., 2017).

### **1.1.5 Klassifikation der Amyloidosen**

Ist die histologische Diagnostik erfolgt, muss die vorliegende Amyloidose klassifiziert werden. Auch diese Klassifikation sollte zügig und akkurat erfolgen, denn der jeweilige Typ der Amyloidose entscheidet das therapeutische Vorgehen. Um die Amyloidose zuordnen zu können, muss das zugrunde liegende amyloidogene Protein identifiziert werden. Dazu finden Methoden der Immunhistologie und der Proteinbiochemie ihre Anwendung. In Fällen von hereditärer Amyloidose kommt zusätzlich die Molekularpathologie zum Einsatz (Röcken et al., 2006).

Mithilfe von immunhistochemischen Antikörper-Färbungen gegen die verschiedenen Amyloidproteine können diese identifiziert werden. Ein strukturiertes Vorgehen ist dafür ratsam. Die Deutsche Gesellschaft für Amyloid-Krankheiten e.V. gibt dazu Empfehlungen heraus. Die häufigsten potenziell systemischen Amyloidosen, zu denen die AA-, AApoAI-, AFib-, AL-, Alys- und ATTR-Amyloidose gezählt werden, sollten geprüft werden. Zudem ist es nicht zweckmäßig, eine systemische Amyloidose auf streng lokale Amyloidproteine zu testen. Des Weiteren empfiehlt die Gesellschaft die Testung auf Amyloid-P-Komponente. Dies ermöglicht die Abgrenzung der AL- und AH-Amyloidose von der Leicht- und Schwerkettenablagerungskrankheit (Röcken et al., 2006). Die Immunhistochemie weist aber ebenso Defizite auf. Nicht für jedes Amyloidprotein ist ein spezifischer Antikörper vorhanden (Dogan, 2017).

Die zweifelsfreie Identifizierung des Amyloidproteins kann jedoch lediglich mit proteinbiochemischen Methoden erreicht werden. Dazu muss das Protein initial aus dem Gewebe extrahiert und nachfolgend in seine Primärstruktur sequenziert werden. Diese Verfahren finden derzeit noch keine Anwendung in

der breiten Routinediagnostik und bleibt wenigen spezialisierten Zentren vorbehalten (Röcken & Eriksson, 2009).

Eine zusätzliche Möglichkeit für die Klassifikation von Amyloidosen ist die Molekularpathologie. Sie ermöglicht den Nachweis einer hereditären Amyloidose. Sowohl die histologische Diagnostik als auch die immunhistologische und proteinbiochemische Klassifikation müssen zuvor erfolgt sein. Ist ein Amyloidprotein identifiziert, welches einer hereditären Amyloidose zugeordnet werden kann (siehe Tabelle 1), kann nun auf genetischer Ebene die zu Grunde liegende Mutation gesichert werden (Röcken & Eriksson, 2009).

## 1.2 Apolipoprotein E

### 1.2.1 Grundlagen der Apolipoproteine und Apolipoprotein E

Apolipoproteine sind Bestandteile der Lipoproteine (Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL, HDL). Sie stellen deren Proteinanteil dar. Die Funktion der Lipoproteine besteht im Transport der Lipide zu den verschiedenen Organsystemen. Der Apolipoproteinanteil unterscheidet sich in den verschiedenen Lipoproteinen - mit abnehmender Größe und zunehmender Dichte nimmt der Proteinanteil zu. Apolipoproteine sind von amphiphilem Charakter und interagieren einerseits mit ihrer hydrophoben Aminosäurekette mit den Lipiden des Lipoproteins, und treten andererseits mit ihrer hydrophilen Domäne in Wechselwirkung mit der wässrigen Umgebung des Blutplasmas (Gotto et al., 1986).

Das Apolipoprotein E ist ein unter den Lipoproteinen austauschbares Apolipoprotein und steht in Assoziation mit den cholesterinreichen Lipoproteinen - den Chylomikronen und deren Resten (Remnants), VLDLs und HDLs (Kockx et al., 2018). Die Hauptfunktion liegt in der Regulierung des Lipidgehalts im Plasma und im Gewebe, womit ApoE eine zentrale Stellung im Fettstoffwechsel einnimmt. Es fungiert als Ligand für die Bindung der Lipoproteine an die Zelloberflächenrezeptoren der verschiedenen Zielorgane (Weisgraber, 1994). Zu den Zellrezeptoren und Zielproteinen gehören unter anderem die LDL-Rezeptoren (Mahley, 1988), LRP-Rezeptoren (*LDL receptor-related protein*) (Kowal et al., 1989) und Heparansulfat-Proteoglykane (Ji et al., 1993). Synthetisiert und sezerniert wird es neben der Leber, dem Hauptsyntheseort, auch im zentralen und peripheren Nervensystem (Namba et al., 1991), in Makrophagen (Mahley, 1988), im Fettgewebe und weiteren Organen (Huang & Mahley, 2014).

Apolipoprotein E ist laut immunhistochemischen Studien und Extraktionsstudien ein ubiquitärer und regelmäßiger Bestandteil in allen Amyloidablagerungen (Gallo et al., 1994), wenngleich es kein fibrilläres Protein beschreibt. Die Wissenschaft ist sich einig, dass ApoE prinzipiell ein wesentlicher

Modulator in der Amyloidogenese ist und Einfluss auf die Eigenschaften der Amyloidproteine und der Fibrillenbildung nimmt.

### 1.2.2 ApoE-Polymorphismus und dessen klinischer Bezug

Aufgrund dessen, dass ApoE eine so einflussreiche Rolle im Lipidmetabolismus einnimmt, ist es verständlich, dass es bei Veränderungen im ApoE-Gen folglich zu gravierenden Veränderungen mit Krankheitswert kommen kann.

Das ApoE-Gen liegt auf dem Chromosom 19 (Dong et al., 1994) und das exprimierte Protein besteht aus 299 Aminosäuren (Buxbaum & Tagoe, 2000). Dieses Gen weist einen genetischen Polymorphismus auf, wodurch drei Hauptisoformen (ApoE2, ApoE3 und ApoE4) entstehen (Dong et al., 1994; Weisgraber et al., 1981). Die Isoformen werden von den drei Allelen  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  und  $\epsilon_4$  kodiert, aus denen drei homozygote (Apo E2/E2, Apo E3/E3, Apo E4/E4) als auch drei heterozygote Phänotypen (Apo E2/E3, Apo E2/E4, Apo E3/E4) resultieren. Die häufigste Isoform, das ApoE3 (Utermann et al., 1980), besitzt an Position 112 die Aminosäure Cystein und an Position 158 die Aminosäure Arginin. ApoE2 besitzt an beiden Positionen Cystein und ApoE4 an beiden Positionen Arginin (Weisgraber et al., 1981). Durch die Auswechslung von nur einer dieser Aminosäuren werden die Struktur und die Funktion des ApoE stark verändert und die entstehenden Isoformen unterscheiden sich folge dessen in ihrer Bindungsaffinität an den Zellrezeptoren. Während ApoE3 und ApoE4 eine ähnliche Bindungsaffinität zum Rezeptor aufweisen, ist diese bei ApoE2 stark verringert (Weisgraber et al., 1982) (siehe Abbildung 2).

Durch den Polymorphismus und der resultierenden Isoformen lässt sich das Risiko für bestimmte Erkrankungen erklären. Das Vorkommen der ApoE2-Homozygotie (E2/E2) steht in starker Assoziation mit der Typ III Hyperlipoproteinämie (HLP III). Die Patienten zeigen erhöhte Werte von Triglyzeriden und Cholesterol im Plasma (Mahley & Rall, 2000). Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch nicht, dass jede ApoE2-Homozygotie in der HLP III endet.

Zahlreiche Studien haben die Wechselwirkung zwischen den kardiovaskulären und atherogenen Risikofaktoren, der ApoE4-Homozygotie (E4/E4) und der Alzheimer-Erkrankung (*Alzheimer's Disease*, AD) dargelegt (Beeri et al., 2006; Farrer et al., 1997; Hofman et al., 1997; Van Bockxmeer & Mamotte, 1992). Beispielsweise sind senile amyloidhaltige Plaques, deren Grundgerüst aus dem A $\beta$ PP-Vorläuferprotein besteht, charakteristisch für das alternde Gehirn des AD-Patienten (Buxbaum & Tagoe, 2000). Der ApoE-Genotyp allein betrachtet stellt einen gravierenden Risikofaktor für die AD dar, denn das Vorliegen der ApoE4-Isoform konnte signifikant mit dem Grad der Ausprägung der A $\beta$ -Ablagerung in Gefäßen und Plaques in Verbindung gebracht werden (Schmechel et al., 1993). Die A $\beta$ -Akkumulation zeigt also Isoform-spezifische Unterschiede. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass ApoE4 unter bestimmten Bedingungen schneller und effektiver an A $\beta$  binden kann als ApoE2 oder ApoE3 (Hashimoto et al., 2012) und dass ApoE4 die spontane Fibrillenbildung von A $\beta$  fördert (Wisniewski et al., 1994). Alles in allem konnte bisher aufgezeigt werden, dass der ApoE-Polymorphismus maßgeblich in die Amyloidbildung eingreift.

### Apolipoprotein E Isoforms

	E4 ←	E3	→ E2
<b>Allelic frequency:</b>	15%	77%	8%
<b>Sequence differences:</b>	Arg-112 Arg-158	Cys-112 Arg-158	Cys-112 Cys-158
<b>Receptor binding:</b>	100%	100%	<2%
<b>Associated disorder:</b>	Alzheimer's Disease	"Normal"	Type III Hyperlipoproteinemia

**Abbildung 2:** Übersicht über die Apolipoprotein E-Isoformen. Arg = Arginin, Cys = Cystein, E2 = ApoE2, E3 = ApoE3, E4 = ApoE4 (Huang & Mahley, 2014). Nachdruck mit Genehmigung von Huang & Mahley, 2014, Copyright Elsevier.

## 1.3 Das Komplementsystem

### 1.3.1 Grundlagen, Struktur und Funktion des Komplementsystems

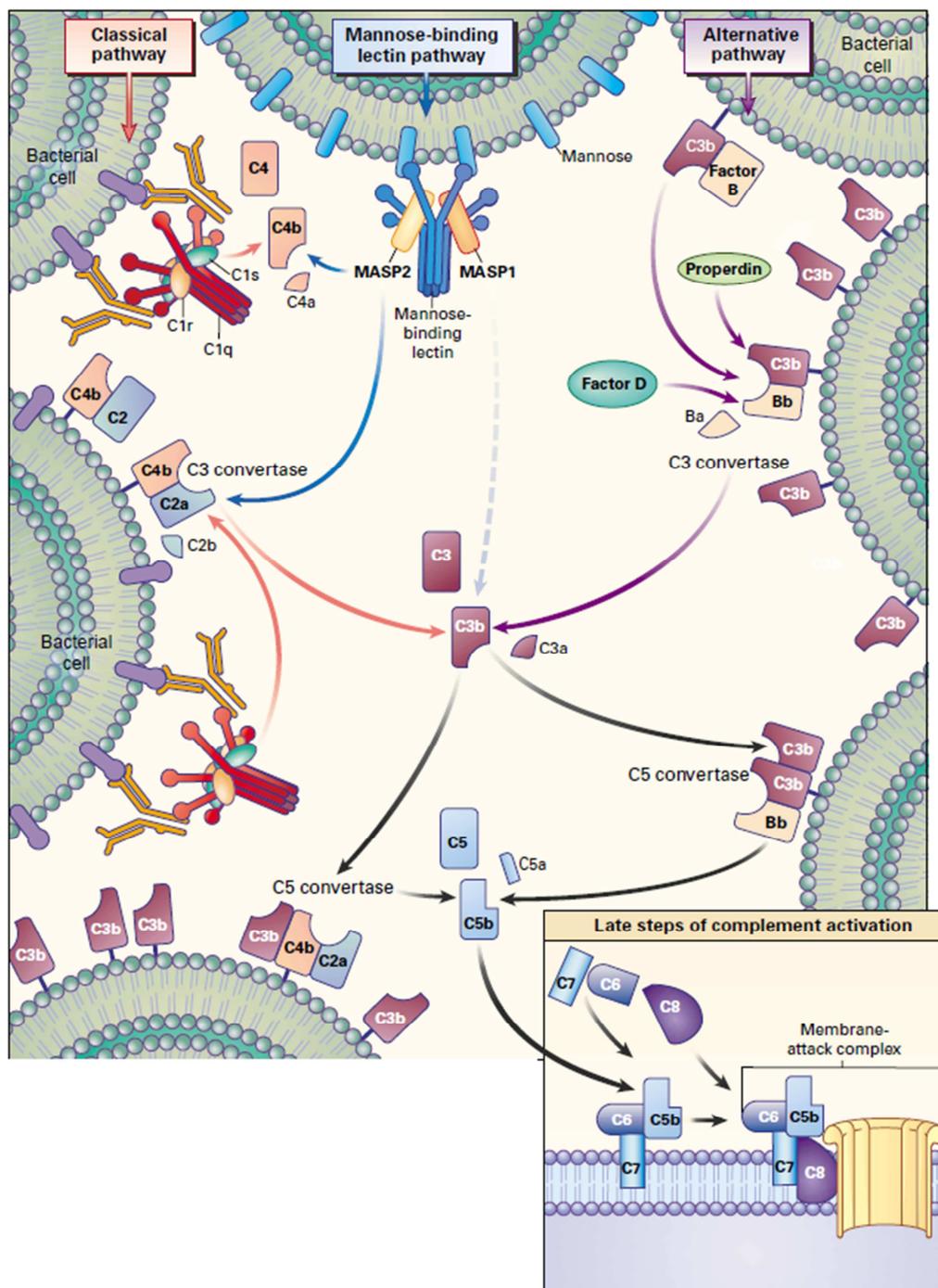
Den Ausdruck „Komplement“ verdankt dieses Abwehrsystem dem deutschen Mediziner Paul Ehrlich. „Komplement“ ersetzt den von Hans Buchner und Jules Bordet eingeführten Begriff „Alexine“ (griechisch „alexin“ = abwehren), welcher für Komponenten des Blutserums steht, die die Abwehr von Bakterien ermöglicht (Kaufmann, 2008). Ehrlich verdeutlicht, dass „Komplement“ einen unspezifischen, hitzelabilen Faktor darstellt, der die Wirkung der Antikörper-vermittelten Lyse der Bakterien ergänzt, demnach komplementierte (Kaufmann, 2008).

Das Komplementsystem ist ein Eckpfeiler der angeborenen und unspezifischen Immunabwehr (Walport, 2001), genauer gesagt der humoralen Sequenz dieses Systems. Es soll verschiedene Antigene, schnell erkennen und auf sie reagieren, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide auf der Oberfläche von Bakterien. Um die Erreger jedoch vollkommen eliminieren zu können, muss das

Komplementsystem eng mit der spezifischen Abwehr, also den Antikörpern und B- und T-Lymphozyten, zusammenarbeiten. Das Komplementsystem besteht aus einer Mehrzahl von Proteinen, Rezeptoren, Membranproteinen und löslichen Plasmaproteinen, den sogenannten Komplementfaktoren (C1 – C9) (Shin et al., 1996). Die zuletzt genannten neun Komplementfaktoren befinden sich als Zymogene in inaktiver Form im Blut und die Aktivierung dieser Vorläuferenzyme erfolgt über kaskadenartig ablaufende proteolytische Spaltungen. Die Aktivierung führt wiederum zur Ausbildung von Enzymkomplexen bis hin zur Ausbildung eines lytischen, ringförmigen Membranangriffkomplexes (MAC, *membrane attack complex*). Der MAC ist ein Transmembrankanale (Shin et al., 1996). Durch seinen amphiphilen Charakter (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1982) kann er mit seinen hydrophoben Anteilen in die Lipiddoppelschicht der Zellwände inserieren und mit seinen hydrophilen Anteilen einen Kanal bilden, der einen irreversiblen Verlust der Membranintegrität der Zelle verursacht und schließlich zum Zelltod durch Nekrose führt (Papadimitriou et al., 1994). Damit wird das Ziel des Komplementsystems, sprich die Eliminierung von Bakterien und anderen pathogenen Mikroorganismen, erreicht. Diese lytische Zerstörung von Pathogenen durch den MAC stellt jedoch nicht die einzige Aufgabe des Komplementsystems dar. Zu seinen abwehrenden Effektorfunktionen werden weiterhin die Beseitigung von Immunkomplexen, die Rekrutierung von Entzündungszellen und die Opsonierung von fremdem und autoantigenem Material gezählt. Darüber hinaus ist das Komplementsystem in diversen anderen biologischen Vorgängen wie der Organregeneration, Hämatopoese, Angiogenese und dem Lipidstoffwechsel beteiligt (Ricklin et al., 2010). Diese Vielseitigkeit hat zur Folge, dass dem Komplementsystem augenblicklich mehr als eine Abwehrfunktion zugesprochen werden muss und es eine herausragende Stellung im menschlichen Organismus einnimmt.

### **1.3.2 Aktivierung des Komplementsystems**

Wie eingangs erwähnt, müssen die neun Komplementfaktoren beteiligt bzw. kaskadenartig aktiviert werden. Dieser Prozess kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen: (1) der klassische Weg, (2) der Mannose-bindende Lektinweg und (3) der alternative Weg (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Die drei Aktivierungswege des Komplementsystems (Walport, 2001). Erläuterungen siehe Text. Nachdruck mit Genehmigung von Walport, 2001, Copyright Massachusetts Medical Society.

Im Folgenden gebe ich einen Überblick über die drei Möglichkeiten der Aktivierung:

(1) Beim klassischen Weg bindet die sechsköpfige Untereinheit C1q vom Komplementfaktor C1 an die Fc-Untereinheit eines mit dem Antigen-gebundenen Antikörper vom Typ IgG oder IgM. Weitere mögliche Aktivatoren, abgesehen von Antikörpern, sind unter anderem virale Hüllmembranen, C-

reaktives Protein, Myelin oder auch DNA (Shin et al., 1996). Durch diese Bindung werden die zwei anderen C1-Untereinheiten C1r und C1s aktiviert. C1s spaltet daraufhin C4 in C4a und C4b. C4a fungiert als Anaphylatoxin und das membrangebundene C4b führt die Kaskade fort, indem es mit Faktor C2 interagiert. C4b und C2a bilden zusammen die klassische C3-Konvertase C4b2a. Damit ist der Endpunkt des klassischen Weges erreicht.

(2) Analog zum klassischen Weg existiert der Mannose-bindende Lektinweg, der ebenfalls nur bei Mustererkennung aktiviert wird, aber antikörperunabhängig. Das Mannose-bindende Lektin (MBL) bindet an terminale Mannose-Gruppen des Pathogens. Aufgrund der homologen Struktur des MBLs zu C1q (Walport, 2001), katalysieren die aktivierten Serinproteasen MASP-1 und MASP-2 (*mannose-binding lectin-associated proteases 1 and 2*) dieselben Reaktionen wie auch im klassischen Weg. Aus diesem Grund entsteht auch hier die klassische C3-Konvertase C4b2a.

(3) Der alternative Weg setzt die Kaskade ebenfalls ohne Beteiligung von Antikörpern in Gang. Eine Rolle spielen die Proteine C3, Faktor B, D, H, I und P (Pangburn, 1988). In dieser Sequenz kommt es zu einer direkten Aktivierung des Komplementfaktors C3. Ermöglicht wird dies einerseits durch die hydrolytisch aktivierte Form C3(H<sub>2</sub>O), die in Folge einer spontanen Reaktion von H<sub>2</sub>O mit der reaktiven Thioestergruppe im C3-Molekül entsteht (Shin et al., 1996) und andererseits durch Oberflächenstrukturen u.a. von Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten (Pangburn, 1988). Aufgrund der spontanen Hydrolyse des C3, ist der alternative Weg stets leicht aktiv. Das aus der C3-Spaltung entstandene Spaltprodukt C3b bindet an die Aktivatoroberflächen. Faktor B lagert sich an und mit Hilfe der Serinprotease Faktor D kann C3b nun Faktor B spalten. Nachfolgend bilden C3b und das Fragment Bb einen Komplex, die alternative C3-Konvertase C3bBb. Dieser Enzymkomplex wird durch Faktor H und I gehemmt. Faktor P (Properdin) hingegen stabilisiert ihn und bildet mit ihm den C3bBbP-Komplex. Mögliche Aktivatoren dieses Weges sind Zymosan, Myelin, Kunststoffoberflächen, Endotoxin oder auch andere Oberflächenstrukturen von Bakterien und Tumorzellen (Pangburn, 1988).

#### Gemeinsame Endstrecke

Alle drei Wege führen zur Ausbildung einer C3-Konvertase, ein Enzym zur Spaltung von C3. Damit stellt C3 das Zentrum der Kaskade dar und dessen Spaltung leitet die exekutive terminale Sequenz des Komplementsystems ein. Das Spaltprodukt C3b fungiert einerseits als Opsonin und bindet andererseits an die jeweilige C3-Konvertase und bildet nun die C5-Konvertase C4b2a3b und/oder C3bBb3b. Dieser Enzymkomplex ist für die Spaltung von C5 verantwortlich. C5a ist analog zu C3a und C4a ein Anaphylatoxin. C5b bildet durch konsequente Bindung von weiteren sechs Komponenten - C6, C7, C8 $\alpha$ , C8 $\beta$ , C8 $\gamma$ , C9 - den MAC (Dudkina et al., 2016). Damit ist der MAC ein Multi-Protein-Komplex, der den lytischen porenformierenden Teil des Komplementsystems repräsentiert. Das Wirkspektrum des Komplementsystems geht aber über den MAC und dessen lytischer Aktivität hinaus. Beispiele für

weitere Wirkmechanismen sind (1) Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten durch die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a, C4a, C5a, (2) Opsonierung durch C3- und C4-Fragmente (Markieren der Pathogene), (3) Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen durch C3- und C4-Fragmente (Walport, 2001).

### **1.3.3 Komplementfaktor C9**

Das Protein C9 ist ein Polypeptid mit einer Primärstruktur aus 537 Aminosäuren. Seinen amphiphilen Aufbau und der damit verbundenen Fähigkeit in die Membran der Zielzellen einzudringen verdankt C9 seinem Carboxyl-Terminus (C-Terminus) aus vor allem hydrophoben Aminosäuren und dem Amino-Terminus (N-Terminus) aus hauptsächlich hydrophilen Aminosäuren (DiScipio et al., 1984).

Der Komplementfaktor C9 ist zur Umstrukturierung seiner eigenen globulären Proteinstruktur imstande (Stanley & Herz, 1987). Dies ermöglicht C9 sich in Lipiddoppelmembranen einzufügen, die einen präformierten C5b-8-Komplex enthalten (Hadding & Müller-Eberhard, 1969). Die erste Transmembranregion (TMH1) des C9-Monomers ist befähigt, eine Konformationsänderung auszuüben, sobald dieses C9-Monomer vom C5b8-Komplex rekrutiert wurde (Spicer et al., 2018). Das ermöglicht die unidirektionale und sequentielle Bindung weiterer C9-Monomere an dem nun ringförmig wachsendem MAC. Es ist gezeigt worden, dass es dabei zu einer symmetrischen Polymerisation von 22 C9-Monomeren kommt (Dudkina et al., 2016). Damit verkörpert C9 das zentrale Element des MAC.

### **1.3.4 Klinische Bedeutung des Komplementsystems**

Durch die Komplexität und Effektivität des Systems wird unverkennbar, dass eine effiziente Kontrolle notwendig ist, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Regulierung der Komplementkaskade unterliegt einem sensitiven Gleichgewicht. Auf der einen Seite steht die effektive Abwehr von Eindringlingen und dem gegenüber steht der Schutz vor exzessiver Komplementaktivierung mit der Folge der Zerstörung körpereigener Strukturen. Gerät dieses Gleichgewicht aus dem Ruder und kommt es zu einer dysregulierten und unkontrollierten Aktivierung, kann das Komplementsystem ursächlich für diverse Erkrankungsbilder sein.

### 1.3.4.1 Verbindung zwischen dem Komplementsystem, Amyloid und der Alzheimer-Erkrankung

Die AD zeigt unterschiedliche morphologische Charakteristika, wie die zerebralen  $\beta$ -amyloidhaltigen Plaques, die zerebrovaskulären Amyloidablagerungen und die neurofibrillären Bündel (Buxbaum & Tagoe, 2000). Diverse Studien konnten immunhistochemisch C1q, C3- und C4-Fragmente und Komponenten des klassischen Komplementweges im Hirngewebe von Alzheimerpatienten nachweisen (Eikelenboom & Stam, 1982; Ishii & Haga, 1984; McGeer et al., 1989). Und dass diese Proteine nicht nur über eine defekte Blut-Hirn-Schranke dorthin gelangt sind, zeigte sich in darauffolgenden *in-situ*-Hybridisierungsstudien. Die dortigen Beobachtungen wie ein erhöhtes Vorkommen von mRNA für C3 und C4 (Walker & McGeer, 1992) und für C1q (Fischer et al., 1995) in AD-Gehirnen, sind beweisend für eine hochregulierte lokale Synthese dieser Komplementproteine. Eine Metaanalyse von *Krance et al.* aus dem Jahr 2019 fasst die Beobachtungen einer Reihe von Studien bezüglich der Komplementkaskade und AD zusammen und zeigt eine grundsätzlich erhöhte Komplementaktivität im Zentralnervensystem (ZNS) von Alzheimerpatienten, vor allem durch das einheitliche, vermehrte Vorhandensein von Clusterin, ein Inhibitor des terminalen Komplementweges, und einem signifikantem, jedoch weniger beständigen Anstieg von C3 im Liquor (Krance et al., 2019).

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, gibt es auch andere Substrate als Antikörper zur Aktivierung des klassischen Komplementweges.  $\beta$ -Amyloid und SAP sind solche Substrate. Unter physiologischen Bedingungen kann  $\beta$ -Amyloid durch Bindung an die globuläre Region des C1q die Kaskade ins Rollen bringen (Tacnet-Delorme et al., 2001), auch ohne Beteiligung von Antikörpern. Dabei sind die unterschiedlichen Peptide, die beim Zerschneiden des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entstehen, unterschiedlich effektiv in deren Aktivierung der Komplementkaskade. A $\beta$ 1-42 ist wirkungsvoller als A $\beta$ 1-40 (Jiang et al., 1994). Die Komplementaktivierung via SAP wird ebenfalls über die Bindungsstelle an der globulären Region des C1q-Fragments vermittelt (Nauta et al., 2003; Roumenina et al., 2006).

All diese Ergebnisse der vergangenen Studien über die Aktivierung des Komplementsystems via  $\beta$ -Amyloid und über die erhöhte lokale Synthese von Komplementproteinen in AD-Gehirnen rechtfertigen die Hypothese einer Beteiligung von Amyloid und Komplement an der Pathogenese von AD.

### 1.3.4.2 Komplement in der Nephrologie

Ein weiterer Bereich, wo das Komplementsystem eine große Bedeutung aufweist, ist die Nephrologie. Zu nennen sind hier Erkrankungen wie das atypische hämolytisch-urämische Syndrom (aHUS), die C3-Glomerulopathien (C3G) und auch die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Sie stehen in

Assoziation mit einem überaktiven alternativen Pathway. Beim aHUS sorgen verschiedene genetische Anomalien im Komplementsystem für diese Überaktivität. Eine bedeutende Rolle übt das CFH-Gen aus, welches für Faktor H kodiert und eine hemmende Wirkung auf die alternative C3-Konvertase mit sich bringt (Pangburn, 1988). Pathogene Mutationen, Polymorphismen und Autoantikörper in Hinsicht auf diesen Faktor sind häufige Beobachtungen beim aHUS (Noris et al., 2010). Die unkontrollierte Aktivierung der Komplementkaskade bei den C3G mit seinen Subtypen, der membranösen C3G (*dense deposit disease*, DDD) und der C3-Glomerulonephritis (C3GN), ist vor allem durch das Vorhandensein des C3-nephritischen Faktors (C3NeF) gekennzeichnet (Sethi et al., 2012). C3NeF ist ein Autoantikörper gegen die alternative C3-Konvertase C3bBb, der für dessen Stabilisierung sorgt und die biologische Halbwertszeit verlängert (Appel et al., 2005). Wesentliches Merkmal der DDD ist die in der Elektronenmikroskopie sichtbare typische elektronendichte C3-Ablagerung im Mesangium und entlang der glomerulären Basalmembran (GBM), als auch die ausbleibenden Immunglobulin-Färbungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie (Sethi et al., 2009). Ebenso sind Komponenten des terminalen Komplementkomplexes (*terminal complement complex*, TCC) und C9 einheitlich vertreten (Sethi et al., 2009). Hinsichtlich der Pathophysiologie der FSGS konnte in der Studie von *Huang et al.* aus dem Jahr 2020 gezeigt werden, dass auch bei diesem Erkrankungsbild das Komplementsystem wesentlich beteiligt ist. Die Studie zeigt eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen von C3a, C5a und C5b-9 im Plasma und Urin bei Patienten mit FSGS. Zudem korrelierte der C5b-9-Spiegel mit der Proteinurie, der renalen Dysfunktion und der interstitiellen Fibrose (Huang et al., 2020).

Werden nun all diese Befunde zusammen betrachtet, lassen sie auf eine Beteiligung der Komplementaktivierung bei Nierenerkrankungen schließen. Dies hat beeinträchtigende Entzündungsprozesse zur Folge und eine fortschreitende Schädigung der Glomeruli.

### **1.3.5 Charakteristische Ähnlichkeit des Membranangriffskomplexes mit anderen Strukturen**

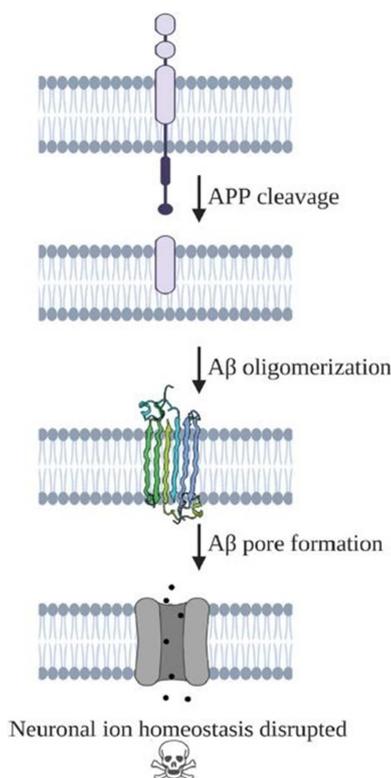
Der Membranangriffskomplex ist mit seinem ringförmigen, kanalartigen Aufbau und seiner lytischen Funktionsweise außergewöhnlich. Als Auslöser für die Membraninstabilität der Zielzelle nimmt er eine entscheidende Stellung im Programm des Zelltodes ein. Der Charakter seiner Vorgehensweise wird bei weiteren Elementen registriert. Im Folgenden werden zwei Strukturen vorgestellt, die eine gewisse Ähnlichkeit mit dem MAC aufweisen.

### 1.3.5.1 Oligomer-Hypothese

Anstelle der bisherigen Annahme, die Amyloidbildung sei ein Zwei-Zustands-Prozess, deuten vergangene Studien auf einen weitaus komplexeren Prozess der Amyloidentstehung hin. Die Studien lieferten unter anderem diese Ergebnisse: (1) Amyloidfibrillen diverser amyloidogener Proteine sind auch im Gewebe von Personen ohne eine Amyloiderkrankung zu finden (Dickson et al., 1992), (2) nach therapeutischer Beseitigung der Amyloidplaques kommt es zu keiner Verbesserung der klinischen Symptome der AD und (3) die klinischen Symptome korrelieren vielmehr mit dem Auftreten der neurofibrillären Bündel als mit den A $\beta$ -Plaques (Harrison & Owen, 2016; Makin, 2018). Diese Beobachtungen geben Anlass, die ursprüngliche Hypothese der Pathogenese der Amyloidfibrillen zu überdenken. Sie erklären möglicherweise die Diskrepanz zwischen dem Amyloidgehalt im Hirngewebe und dem Ausbruch oder der Schwere der Erkrankung. Die neue Hypothese der Amyloidentstehung wird Oligomer-Hypothese genannt und leitet einen Wendepunkt ein. Sie charakterisiert lösliche Oligomere als vorübergehende Zwischenprodukte in der Amyloidentstehung, wobei sie Stoffwechselveränderungen, Toxizität und Zelltod verursachen (Ke et al., 2020). Untersuchungen an A $\beta$ 1-40- und A $\beta$ 1-42-Peptiden zeigten eine Kinetik mit Bildung und darauffolgendem Verschwinden dieser A $\beta$ -Protofibrillen (Walsh et al., 1997), die somit als oligomere, präfibrilläre Zwischenprodukte gedeutet werden. Diese verschiedenen Oligomere der amyloidogenen Proteine weisen vielfältige Unterschiede in ihrer Struktur und Dynamik auf (Sun et al., 2019), anders als die gemeinsame Cross- $\beta$ -Struktur aller Amyloidfibrillen (siehe Abschnitt 1.1.1). Zudem zeigen sie ein abgeschwächtes Bindungsverhalten zu amyloidspezifischen Farbstoffen wie Thioflavin (Younan & Viles, 2015), was auf eine fehlende Cross- $\beta$ -Faltblattstruktur hinweisen könnte.

Die Amyloid-Oligomere, die eine gewisse Zytotoxizität aufweisen, sind lediglich die ringförmigen, porenartigen Oligomere. Sie konnten bei den meisten Amyloidvorläuferproteinen erfasst werden und sind eigenständige Amyloidstrukturen, die sich von den Amyloidfibrillen unterscheiden (Ke et al., 2020). Funktionell betrachtet, üben sie eine kanal- und porenbildende Aktivität auf Membranen aus und ziehen eine Permeabilitätssteigerung mit sich, was am Beispiel des Inselzellenamyloidproteins (IAPP) (Anguiano et al., 2002) und dem A $\beta$ -Amyloidprotein (Arispe et al., 1994) gezeigt werden konnte. Die Folge ist der Verlust des homöostatischen Gleichgewichts der Zelle durch die veränderten Ionenkonzentrationen über der Membran.

Die Oligomer-Hypothese legt nahe, dass die kanal- und porenartigen Formationen die primäre Ursache für die Toxizität und den Zelltod sind. Essentiell sind diese Resultate ebenfalls für die Erforschung der AD. Es existieren zunehmend Hinweise, dass die in die Membran eingebetteten A $\beta$ -Oligomere die Neurotoxizität bei Alzheimerpatienten auslöst (Ciudad et al., 2020; Lasagna-Reeves et al., 2011) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Schema der möglichen Neurotoxizität durch Aβ-Oligomere. Nach der Spaltung des Amyloidvorläuferproteins (APP) verbleibt Aβ1-42 in der Zellmembran. Durch Selbstassemblierung kommt es zur Ausbildung von Tetrameren und Oktameren, welche reich an β-Strukturen sind. Ein Aβ1-42-Tetramer mit seinen vier verschiedenen Untereinheiten ist abgebildet. Die Interaktion der hydrophilen Ränder mit Lipidschwänzen sorgt für eine Neugestaltung der Lipidkopfgruppen und die Formation von lipidstabilisierten Poren. Diese Poren sind verantwortlich für die veränderte zelluläre Ionenhomöostase (Darling & Shorter, 2020). Nachdruck mit Genehmigung von *Darling & Shorter, 2020*, Copyright Elsevier.

### 1.3.5.2 Perforin 1/ MACPF

Weiterhin muss Perforin 1 (PRF1) erwähnt werden, wenn es um die Struktur- und Funktionsgleichheit zum MAC geht. Den Namen verdankt es seiner Funktion: es „perforiert“ die Membran der Zielzelle. Perforin 1 zählt zu den zytolytischen Proteinen, welches in Vesikeln von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und Natürlichen Killerzellen gespeichert wird. Nach Freisetzung aus diesen Zellen wird es in die Zellmembran der Zielzelle eingebettet und induziert an dieser Stelle durch Aggregation seiner Monomere eine Porenbildung mit bis zu 20 nm Durchmesser (Liu et al., 1995), funktionell also ähnlich zum MAC, der auch als Transmembrankanal fungiert (siehe Abschnitt 1.3.1). Somit agiert PRF1 ebenso als Auslöser für eine gesteigerte Permeabilität und den Verlust der Membranintegrität. Zusätzlich können Granzyme, die sich in der Granula der CTL befinden, durch die Perforinpore in die Zelle eindringen, womit zusätzlicher Schaden angerichtet wird (Masson & Tschopp, 1987). Die Folge ist das Absterben der Zelle. Perforin 1 und MAC unterscheiden sich jedoch

dahingehend, dass sie unterschiedliche Formen des Zelltodes einleiten, PRF1 die Apoptose (Baran et al., 2009) und MAC die Nekrose (Papadimitriou et al., 1994), und dass sie verschiedene Zielpathogene ansteuern, wobei PRF1 virusinfizierte Zellen und Tumorzellen bekämpft und MAC extrazelluläre Bakterien (McCormack et al., 2013).

Strukturell bieten PRF1 und MAC auch Ähnlichkeiten. Perforin 1 zeigt eine Domäne, die sie mit den terminalen Komplementkomponenten C6, C7, C8 $\alpha$ , C8 $\beta$  und C9 gemeinsam hat. Diese Domäne weist eine beachtliche Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf (Liu et al., 1995; Lowrey et al., 1989) und bekommt daher die Bezeichnung MACPF, stehend für „*membrane-attack-complex-perforin domain*“. Vertreter dieser MACPF-Proteinfamilie, die über C6-C9 und Perforin hinausgehen, sind nicht nur im Menschen vertreten. Auch Bakterien nutzen diese Domäne (Kadota et al., 2004; Xu et al., 2010). Zusätzlich zeigen PRF1 und MAC aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten eine immunologische Kreuzreaktivität (Tschopp et al., 1986).

Eine Verbindung von PRF1 zu den Amyloid-Oligomeren aus Abschnitt 1.3.5.1 ist ebenfalls gezeigt worden. Der Antikörper A11, spezifisch für Amyloid-Oligomere, detektierte sowohl PRF1 als auch  $\alpha$ -Hämolysin, ein porenbildendes bakterielles Toxin (Yoshiike et al., 2007). So schließt sich der Kreis innerhalb der hier genannten porenbildenden Proteine C6-C9, PRF1 und den Amyloid-Oligomeren. Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten und funktionelle Gemeinsamkeiten in der Art und Weise der Membranpermeabilisation auf.

## 1.4 Apoptose und Rolle der Caspase 3

### 1.4.1 Grundlagen der Apoptose und Caspasen

Eine zweite Form des Zelltodes ist die Apoptose. Diese ist im Gegensatz zur Nekrose eine physiologische Form des Zelltodes. Die Apoptose ist genetisch programmiert, wird streng kontrolliert eingeleitet und führt gezielt zum Absterben einzelner geschädigter, funktionsunfähiger, entarteter und/oder überflüssiger Zellen, ohne das angrenzende Gewebe zu schädigen oder eine Entzündung auszulösen (McIlwain et al., 2013). Zellen, die nicht mehr repariert werden können und dem Körper gefährlich werden könnten, werden beseitigt und bewahren ihn vor Schaden. Es gibt verschiedene Ursachen, die zum apoptotischen Zelltod führen, die sowohl von außen als auch aus dem Zellinneren kommen können. Dazu zählen unter anderem das Fehlen von Wachstumsfaktoren (Deckwerth & Johnson, 1993), die Immunüberwachung zur Kontrolle des Tumorstwachstums oder auch DNA-Schäden, induziert durch Chemotherapeutika oder andere exogene Ursachen (Boatright & Salvesen, 2003). Aus diesem Grund gibt es auch verschiedene Wege der Induktion einer Apoptose.

Die Caspasen sind ein zentraler Bestandteil der Apoptose. Caspase ist ein Akronym für „Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen“ und spiegelt den Wirkmechanismus dieser speziellen Enzyme wider. Im aktiven Zentrum der Enzyme befindet sich ein Cysteinrest und die Spaltung der Proteine erfolgt am carboxyterminalen Ende von Aspartatresten (Poreba et al., 2013). Jede Caspase wird als Zymogen, die inaktive Enzymvorstufe, synthetisiert und ist in gesunden Zellen aufzufinden. Vor ihrer Funktionstüchtigkeit muss es in ihre aktive Form überführt werden. Dies erfolgt durch Proteolyse, eine enzymatische Spaltung, oder einen Prozess der Dimerisierung (Zusammenlagerung) (Boatright & Salvesen, 2003). Bis dato sind zwölf humane Caspasen bekannt (Salvesen & Ashkenazi, 2011). Die Durchnummerierung der Caspasen erfolgt auf Basis der zeitlichen Entdeckung (Alnemri et al., 1996). Doch nicht alle zwölf Caspasen sind an der Apoptose beteiligt. Hier spielen nur die Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen eine wesentliche Rolle. Initiatorcaspasen werden durch bestimmte Trigger aktiviert und leiten die Apoptose ein. Zu ihnen gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10 (McIlwain et al., 2013; Salvesen & Ashkenazi, 2011). Ihre Aufgabe besteht in der Spaltung der Effektorcaspasen mittels limitierter Proteolyse, um diese zu aktivieren und funktionsfähig zu machen. Die Effektorcaspasen sind die ausführenden Elemente in der Apoptose und besitzen die Fähigkeit einerseits zur Aktivierung weiterer Effektorcaspasen und Proteasen und andererseits zur Spaltung der zelleigenen Strukturproteine und der DNA, womit der Zelltod herbeigeführt wird. Zu diesen Effektorcaspasen werden die Caspasen 3, 6 und 7 gezählt (McIlwain et al., 2013).

Zur Vollständigkeit soll noch erwähnt werden, dass die dritte Gruppe von Caspasen, die inflammatorischen Caspasen, ihre Funktion in der Immunantwort auf mikrobielle Pathogene ausübt. Zu diesen inflammatorischen Caspasen werden die Caspasen 1, 4, 5 und 12 gezählt (Jiménez Fernández & Lamkanfi, 2015).

## 1.4.2 Aktivierung der Apoptose

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Apoptose einzuleiten. In dieser Arbeit wird nur kurz auf den extrinsischen und den intrinsischen Weg eingegangen (siehe Abbildung 5).

Der intrinsische Pathway, auch mitochondrialer Pathway genannt, wird durch zellinterne Faktoren ausgelöst. Eine entscheidende Rolle nehmen die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie ein (Green & Reed, 1998). Nach zellulärem Stress und DNA-Schäden (z.B. durch Chemotherapeutika) werden diese Proteine vom Tumorsuppressor p53 transkriptionell reguliert - intrazelluläre proapoptotische Proteine wie Bax (*Bcl-2 associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*) werden vermehrt exprimiert und antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 (*B-cell-lymphoma-protein*) hingegen vermindert. Diese Proteine sind Teil der Signaltransduktion am Mitochondrium und regulieren sie. Die proapoptotischen Proteine sorgen für eine Porenbildung in der äußeren

Mitochondrienmembran und der damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytoplasma. Cytochrom C bildet mit APAF1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), ATP (Adenosintriphosphat) und der gebundenen Procaspase 9 das Apoptosom. Dieser Komplex ist für die Aktivierung der Caspase 9 verantwortlich. In dessen Folge kann die Kaskade und Aktivierung der nachgeschalteten Effektorcaspasen in Gang gesetzt werden (McIlwain et al., 2013).

Der extrinsische Pathway wird durch extrazelluläre Einflüsse angesteuert. In diesem Pathway nehmen Rezeptor-Liganden-Komplexe eine entscheidende Rolle ein. Liganden wie TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) oder der FasL (Fas-Ligand) von zytotoxischen T-Zellen binden an die Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie, auch Todesrezeptoren genannt. Die membranständigen Rezeptoren leiten das zytotoxische Signal ins Zellinnere weiter und lösen die apoptotische Kettenreaktion ein. Es kommt zu einer Rekrutierung des FADD-Moleküls (*Fas-associated protein with death domain*) und zu einem Zusammenschluss dieses Moleküls mit der Procaspase 8 zum DISC (*death-inducing signaling complex*). Dieser Komplex sorgt für die Generierung großer Mengen aktiver Caspase 8, die dann die Caspasenkaskade über die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 fortführt. Caspase 8 nimmt eine Sonderstellung in der Kaskade ein, denn sie ist nicht nur Teil des extrinsischen Weges, sondern vermittelt auch den intrinsischen Pathway. Dies ermöglicht sie durch die Aktivierung von BID (*BH3 interacting domain death agonist*) zum proapoptotischen tBID (*truncated BID*). Daraufhin transloziert das gesplattene tBID zu den Mitochondrien, setzt Cytochrom C aus dem Intermembranraum frei und verstärkt den intrinsischen Stimulus (McIlwain et al., 2013).

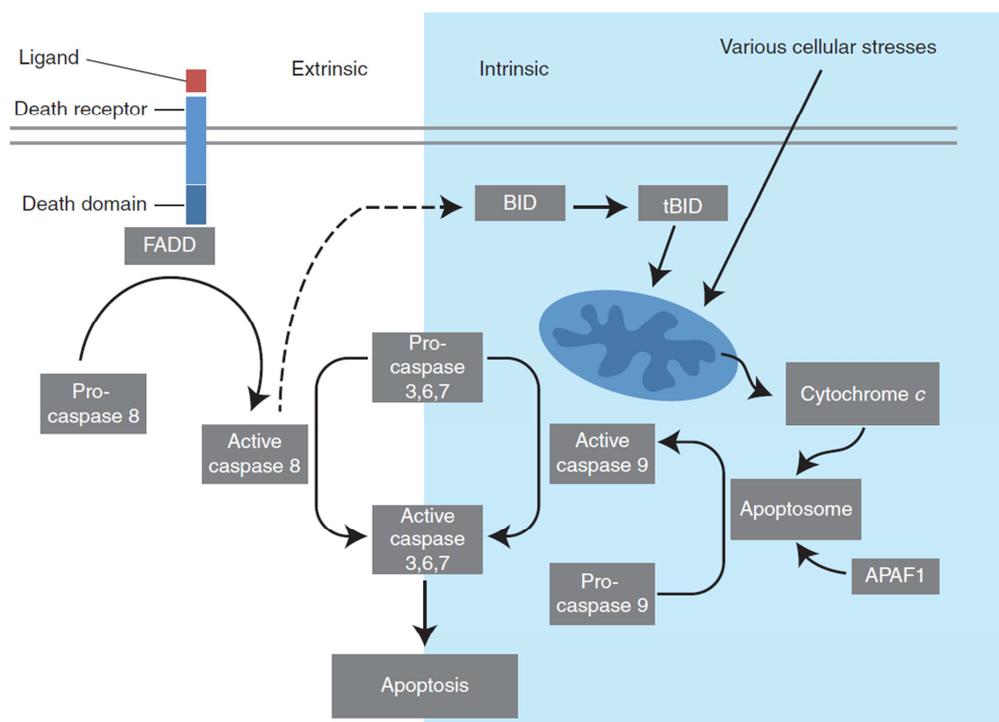
Das Protein Granzym B ist ebenfalls fähig die Apoptose auszulösen. Durch das porenformierende Perforin (siehe Abschnitt 1.3.5.2) kann Granzym B aus den CTLs ins Zytosol einströmen und über zwei verschiedene Vorgänge den programmierten Zelltod herbeizuführen. (1) Es ist direkt in der Lage die Procaspasen 3 und 7 zu aktivieren und (2) es ist befähigt das proapoptotische Protein BID zu tBID zu aktivieren und somit die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zu ermöglichen (Rousalova & Krepela, 2010). Damit ist der Weg für einen gezielten Zelltod geebnet.

#### Gemeinsame Endstrecke

Beide genannten Wege konvergieren in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Der extrinsische Weg mittels Caspase 8 und der intrinsische Weg via Caspase 9. Nun kann die eigentliche phänotypische Ausprägung der Apoptose beginnen. In dieser terminalen Sequenz spalten die Effektorcaspasen und die von ihnen aktivierten Enzyme (z.B. DNasen) die zelleigenen Proteine und bauen sie ab. Zu den über 300 Substraten (Choudhary et al., 2015) zählen unter anderem Zellorganellen, Zytoskelett, Reparaturenzyme der DNA und die DNA selbst. Die Konsequenz des apoptotischen Prozesses ist die Schrumpfung der Zelle, das Lösen der Zelle aus dem Zellverband und

die Fragmentierung der Zellorganellen in sogenannte Apoptosekörper, das *Blebbing* (McIlwain et al., 2013). Parallel dazu diffundiert Phosphatidylserin, welches physiologisch an der Membranninnenseite lokalisiert ist, von der inneren in die äußere Schicht der Lipiddoppelmembran. Damit dient es der Zellkommunikation mit den Makrophagen, die dieses Membranprotein erkennen und das Signal zur Phagozytose der Apoptosekörper erhalten (Fadok et al., 2001). Das Endziel ist erreicht. Die geschädigte Zelle ist vernichtet und richtet gegenüber dem Organismus keinen Schaden mehr an. Würde es nun an Apoptose-beteiligten Proteinen und Strukturen fehlen, könnten kranke Zellen nicht abgeräumt werden und das Risiko zur Entartung ist gesteigert.

Innerhalb der gesamten Caspasenkaskade nimmt Caspase 3 die bestimmende Rolle unter allen Caspasen ein, denn ihre exekutive Fähigkeit ist für den Großteil der apoptotischen Prozesse verantwortlich. Deshalb zählt der Nachweis von gespaltener aktiver Caspase 3 auch als universeller Marker für das Absterben einer Zelle durch Apoptose (Crowley & Waterhouse, 2016).



**Abbildung 5:** Extrinsischer und intrinsischer Pathway der Apoptose (McIlwain et al., 2013). Erläuterungen siehe Text. Nachdruck mit Genehmigung von *McIlwain et al., 2013*, Copyright Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## 1.5 Das Amyloid-Proteom

Der Begriff Proteom wurde 1994 durch Marc Wilkins eingeführt und beschreibt es als „*PROTEin complement expressed by a genOME*“ (Wilkins et al., 1996). Es stellt den gesamten Proteingehalt einer Zelle oder eines Gewebes zu einem definierten Zeitpunkt dar, wobei dieser Proteingehalt durch Wechselwirkungen und posttranslationale Veränderungen dynamisch ist und innerhalb verschiedener Gewebe desselben Organismus unterschiedlich sein kann (Aslam et al., 2017; Wilkins et al., 1996). Mithilfe von Massenspektrometrie kann dieses Proteom untersucht und identifiziert werden (Dogan, 2017).

Amyloidablagerungen sind ein Gemisch aus Proteinen und stellen ein Proteom dar. Neben dem fibrillären Amyloid-spezifischen Protein sind mehrere andere Proteine in den Ablagerungen vorzufinden. Dies erklärt die Vielfältigkeit und Komplexität der Pathogenese dieser Erkrankung. In verschiedenen Proteom-Studien konnten diese zusätzlichen Proteine, wie SAP, ApoE, ApoAI, ApoAIV (Vrana et al., 2009), Vitronektin (Winter et al., 2015) und Clusterin (Mollee et al., 2016) identifiziert werden. Eine umfassende Darlegung des Amyloid-Proteoms bietet die systematische Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2021 von *Gottwald und Röcken*.

### 1.5.1 Fibrilläre Proteine

Das fibrilläre Amyloidprotein ist jenes Protein, welches den vorliegenden Amyloidtyp bestimmt. Von den 36 bekannten fibrillären Proteinen (Stand 2020) konnten die Untersuchungen am Amyloid-Proteom eine Vielzahl dieser Amyloidproteine identifizieren (Dasari et al., 2020; Gottwald & Röcken, 2021). Der proteomische Ansatz bietet somit ein sich kontinuierlich entwickelndes Verfahren zur Diagnostik und Klassifizierung der Amyloidosen.

### 1.5.2 Nicht-fibrilläre Proteine

Die Proteomdaten der letzten Jahre aus der Übersichtsarbeit *Gottwald und Röcken, 2021* beschrieben zahlreiche menschliche Proteine, die regelmäßig in Amyloidproben von Herz, Niere und subkutanem Fettgewebe vorkommen. Unter anderem werden die Amyloid-Signaturproteine ApoE und SAP dazu gezählt. Sie konnten in über 90% der Proben nachgewiesen werden. Aber auch die Komplementproteine C3 und C9 konnten in insgesamt 82% und 67% detektiert werden, vor allem in den Gewebeproben der Niere (Gottwald & Röcken, 2021). Des Weiteren ergab das Amyloid-Proteom ein gehäuftes Vorkommen von Regulatoren des Komplementsystems, *complement factor H related peptide 1* und *5* (CFHR1 und CFHR5) (Gottwald & Röcken, 2021; Kourelis et al., 2020). Der

Vergleich mit weiteren Studien deutet darauf hin, dass das Auftreten der Proteine des Komplementsystems stark vom Amyloidtyp abhängt (Brambilla et al., 2013; Kourelis et al., 2020).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Amyloidosen sind eine Gruppe von komplexen Erkrankungen mit einem variablen Verteilungsmuster, unterschiedlicher Symptomausprägung und einer bislang nicht vollständig geklärten Pathogenese. Diese Umstände erschweren maßgeblich die Diagnostik und die anschließende Therapie dieser Erkrankung. Bisher bekannt sind die pathologische Aggregation des fibrillären Amyloidvorläuferproteins, das ubiquitäre Vorkommen von sogenannten „*amyloid signature proteins*“ und die Beteiligung diverser anderer Komponenten aus dem Gewebeverband und auch aus dem Serum. Diese weiteren Komponenten sind möglicherweise ebenfalls verursachend für die Organtoxizität, zusätzlich zu den großen Mengen an fibrillären, amyloidogenen Ablagerungen. Jedoch besteht eine lückenhafte Kenntnis über all diese zusätzlichen Proteine. Eine vollständige Aufklärung aller beteiligten Proteine könnte das Verständnis über die Ätiopathogenese der Amyloidosen verbessern und damit auch die Diagnostik, Therapie und Prognose.

Ausgangspunkt dieser Studie war ein Zufallsbefund. Anti-C9-Antikörper werden in der Obduktionspathologie verwendet, um frühe Stadien z.B. ischämischer Einzelzellnekrosen im Herzen nachzuweisen. Dabei fiel auf, dass nicht nur Einzelzellmyolysen eine Immunreaktion eingingen, sondern auch die im Herzen enthaltenen Amyloidablagerungen. Ausgehend von dieser Beobachtung war eine Literaturrecherche durchgeführt worden. Diese belegte die oben bereits ausgeführte putative Bedeutung des Komplementsystems bei Amyloidosen, wobei die Datenlage bezüglich der extrazerebralen Amyloidosen noch rudimentär war. Um diese Wissenslücke zu füllen, wurde die hier vorliegende Studie durchgeführt. Dabei sollten die folgenden Hypothesen überprüft werden:

- 1) Komplement 9 liegt ubiquitär, spezifisch und räumlich in extrazerebralen Amyloidablagerungen angereichert vor, unabhängig vom Amyloidtyp und unabhängig von der Gewebelokalisation.
- 2) Amyloid kann in angrenzenden und eingeschlossenen Zellen zum Zelltod führen, sowohl in Form von einer Nekrose und/oder Apoptose.

Die aus dieser Abhandlung abgeleiteten Erkenntnisse sollen zukünftig einen Beitrag zur Aufklärung weiterer pathophysiologischer Mechanismen leisten und neue Ansätze zu Zielstrukturen der Diagnostik liefern, sodass die Diagnostik und Therapie der Amyloiderkrankung frühzeitiger gestellt und eingeleitet werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ethikvotum

Die Auswertung der Daten erfolgte in anonymisierter Form. Eine Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission des UKSH, Campus Kiel liegt vor (Referenznummer D 581-585/15; D 469/18).

### 2.2 Patientenkollektiv

Amyloidhaltige FFPE Gewebeproben von insgesamt 118 Patienten aus den Jahren 2016 bis 2018 dienten als Patientenkollektiv für die Untersuchung von Prävalenz und Verteilung von ApoE, C9, Cas3 und partiell C3. Die Gewebeproben entstammen dem Amyloid Register der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, wobei die interstitiellen Amyloidablagerungen innerhalb des Kollektivs unterschiedlich ausgeprägt waren. Die histologische Untersuchung und Klassifizierung der Proben wurde zuvor durch einen Pathologen vorgenommen. Einziges Auswahlkriterium für die Aufnahme in das Kollektiv war der histologisch gesicherte Nachweis von Amyloid mit der typischen anomalen Polarisationsfarbe (siehe Abschnitt 1.1.4). Eine Zusammenfassung des Kollektivs im Hinblick auf erhobene Patientendaten ist in Tabelle 2 dargestellt (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Demografische Patientendaten

<b>Patienten</b>	<b>n (%)</b>
Gesamt	118 (100)
Männer	77 (65,3)
Frauen	41 (34,7)
<b>Alter [Jahre] bei Diagnosestellung</b>	<b>Mittelwert</b>
Gesamt	67,3
Männer	67,0
Frauen	67,9

Die in dieser Studie gewählten Gewebeproben enthalten folgende acht Amyloidtypen: AA (n = 10), AIns (n = 4), AL $\kappa$  (n = 21), AL $\lambda$  (n = 42), ATTR (n = 35), A $\beta$  (n = 3), gemischt (n = 1) und nicht klassifizierbar (n = 2). Sie entstammen folgender Organ- und Gewebetypen: Herz (n = 28), Niere (n = 21), Haut (n = 14), Synovialis des Karpaltunnels (n = 10), Fett- und Bindegewebe (n = 7), Gastrointestinaltrakt (n = 7), Ligament des Karpaltunnels (n = 7), Leber (n = 6) und Lunge (n = 5). Aufgrund der geringen Probenanzahl aus der Harnblase, Konjunktiva, Lymphknoten, Mundwinkel,

Nasopharynx, Nervus suralis, Oropharynx und dem Ringband wurden diese zu der Kategorie „Andere“ zusammengefasst. Tabelle 3 fasst die Amyloid- und Gewebetypen der untersuchten Fallserien zusammen (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Zuordnung der 118 Patientenproben nach Amyloidtyp und Organ-/Gewebeart.

	Amyloidtyp								Gesamt
	AA	AIns	ALκ	ALλ	ATTR	Aβ	Gemischt	Nicht klassifiziert	
Organ/Gewebe									
Herz	1	0	6	11	10	0	0	0	<b>28</b>
Niere	4	0	3	12	2	0	0	0	<b>21</b>
Haut	0	0	6	6	1	0	0	1	<b>14</b>
Synovialis des Karpaltunnels	0	0	0	0	10	0	0	0	<b>10</b>
Fett- und Bindegewebe	1	4	0	1	1	0	0	0	<b>7</b>
GIT	4	0	0	2	1	0	0	0	<b>7</b>
Ligament des Karpaltunnels	0	0	0	0	7	0	0	0	<b>7</b>
Leber	0	0	3	3	0	0	0	0	<b>6</b>
Lunge	0	0	1	1	2	0	1	0	<b>5</b>
Andere	0	0	2	6	1	3	0	1	<b>13</b>
<b>Gesamt</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>42</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>118</b>

Legende: Andere = Zentrales Nervensystem (n = 3); Harnblase (n = 2); Oropharynx (n = 2); Konjunktiva, Lymphknoten, Mundwinkel, Nasopharynx, Nervus suralis, Ringband (n = 1). GIT = Gastrointestinaltrakt.

## 2.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kitsystem

Für die Bearbeitung und Auswertung der Gewebeproben wurden die nachfolgenden labortechnischen Geräte und Verbrauchsmaterialien angewendet: Leica Mikrotom (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Tissue-Tek Prisma Färbeautomat und Tissue-Tek Film Eindeckautomat (beide Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, Kalifornien, USA), Leica Bond Max Färbeautomat (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) und 24 mm x 50 mm Deckgläser (LABSolute, Renningen, Deutschland), Micro Slides Objektträger 76 mm x 26 mm (Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland), Leica Apex Bond Superior Adhäsionsobjektträger 75,5 mm x 25,5 mm (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 (ZEISS Microscopy, Hamburg, Deutschland), Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), NanoZoomer 2.0RS (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) und das Kitsystem Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland).

## 2.4 Chemikalien und Antikörper

Der Farbstoff Kongorot wurde bei Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) und Hämatoxylin Gill No.3 wurde bei Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Die monoklonalen Antikörper gegen AA-Amyloid und  $\beta$ -Amyloid, und die polyklonalen Antikörper gegen Kappa-Leichtkette, Lambda-Leichtkette und Amyloid-P-Komponente erhielt ich von der Firma DAKO (Hamburg, Deutschland). BioGenex (San Ramon, Kalifornien, USA) lieferte den monoklonalen Antikörper gegen Insulin. Die polyklonalen Antikörper AK3, AL1 (Schönland et al., 2012), AL7 (Schönland et al., 2012) und TTR3 (Gioeva et al., 2013) sind nicht-kommerziell erhältliche Antikörper und wurden von Pineda (Berlin, Deutschland) hergestellt.

Zudem wurden die monoklonalen Antikörper gegen ApoE und C3 von Abcam (Berlin, Deutschland), der monoklonale Antikörper gegen C9 von Biozol (Eching, Deutschland) und der monoklonale Cas3-Antikörper von Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA) verwendet.

**Tabelle 4:** Eingesetzte Antikörper für die Klassifikation des Amyloids und den Nachweis der untersuchten Proteine.

Antikörper	K/N	M/P	Quelle
Amyloid-P-Komponente	K	P	Dako, Hamburg, Deutschland
AA-Amyloid	K	M	Dako, Hamburg, Deutschland
A $\beta$ -Amyloid	K	M	Dako, Hamburg, Deutschland
Kappa-Leichtkette	K	P	Dako, Hamburg, Deutschland
Lambda-Leichtkette	K	P	Dako, Hamburg, Deutschland
Insulin	K	M	BioGenex, San Ramon, CA, USA
AK3	N	P	Pineda, Berlin, Deutschland
AL1	N	P	Pineda, Berlin, Deutschland
AL7	N	P	Pineda, Berlin, Deutschland
TTR3	N	P	Pineda, Berlin, Deutschland
ApoE	K	M	Abcam, Berlin, Deutschland
C3	K	M	Abcam, Berlin, Deutschland
Cleaved Cas3	K	M	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
C9	K	M	Biozol, Eching, Deutschland

Legende: AK =  $\kappa$ -Leichtketten-Antikörper, AL =  $\lambda$ -Leichtketten-Antikörper, ApoE = Apolipoprotein E, Cas3 = Caspase 3, C3 = Komplement 3, C9 = Komplement 9, K = kommerziell, M = monoklonal, N = nicht kommerziell, P = polyklonal, TTR = Anti-Transthyretin-Antikörper.

## 2.5 Histologie und Immunhistochemie

Alle Proben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Von den jeweiligen Paraffinblöcken wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und einerseits für die Hämatoxylin-Eosin-/ und Kongorot-Färbung auf Assistent Micro Slides Objektträger und andererseits für die Immunhistochemie auf Leica Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie gefärbt und mit entsprechenden Deckgläsern (siehe Abschnitt 2.2) eingedeckt.

## 2.6 Klassifizierung der Amyloidosen

Die Amyloidablagerungen wurden zuvor mithilfe der Kongorot-Färbung und der Polarisationsmikroskopie nachgewiesen (siehe Abschnitt 1.1.4). Die anschließende Klassifikation der Amyloidablagerungen erfolgte immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen AA-Amyloid (Verdünnung 1:2000), β-Amyloid (1:50) und Insulin (1:500), sowie polyklonalen Antikörpern gegen Amyloid-P-Komponente (1:2000), Kappa-Leichtkette (1:100.000), Lambda-Leichtkette (1:14.000) und nicht-kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern gegen Transthyretin (TTR3, 1:2000), Lambda-Leichtkette (AL1: 1:250; AL7: 1:200). Die Durchführung des voll automatisierten Färbeprotokolls erfolgte am Leica Bond-Max Färbeautomaten unter Zuhilfenahme des Kompakt-Polymer Detektionssystems Leica Bond Polymer Refine Detection. Für die Zugänglichkeit des jeweiligen Antikörpers zu seinem Epitop wurde nach Herstelleranweisung die Bond Epitope Retrieval Solution 1 (ER1) und Bond Epitope Retrieval Solution 2 (ER2) angewandt.

## 2.7 Bestimmung spezifischer Proteine innerhalb der Amyloidablagerungen

Mittels der Leerschnitte der FFPE Gewebeproben aus dem Archiv des Amyloid Registers konnten die bisher klassifizierten Gewebeschnitte auf das Vorkommen von ApoE, Cas3, C3 und C9 untersucht werden. Dazu kam der Leica Bond Max Färbeautomat erneut zum Einsatz. Die durchgeführte immunhistochemische Färbung erfolgte mit den kommerziell erhältlichen monoklonalen Maus-Antikörpern gegen ApoE (Verdünnung 1:10.000), C3 (1:400), C9 (1:400) und dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Cas3 (1:100).

Um eine Gleichwertigkeit zu gewährleisten, wurden alle Gewebeschnitte nachfolgend mit dem Zeiss Axioplan 2-Mikroskop mit zusätzlicher Fluoreszenzeinrichtung betrachtet und bewertet. Die zusätzliche Fluoreszenzeinrichtung erlaubte es mir, im Kongorot gefärbten Schnitt die Verteilung und

den Gehalt an Amyloid besser abschätzen zu können. Die Bewertung der Immunreaktion erfolgte anschließend durch das Abgleichen der immunhistologisch gefärbten Areale mit den Amyloidablagerungen. Dokumentiert wurde der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Areale, welcher deckungsgleich mit dem gesicherten Amyloid-Areal war. Dies erfolgte durch Abschätzen der Fläche in 5%-Schritten. Damit wurde das Ausmaß der Immunmarkierung deutlich. Die Farbtintensität der Immunreaktion wurde ebenfalls bewertet und eingestuft in abwesend (0), schwach (1+), moderat (2+) oder stark (3+). Die Intensität 0 wurde als negativ bewertet und die Intensitäten von 1+ bis 3+ wurden als positiv angesehen.

## **2.8 Nachweis immunreaktiver Zellen**

Eine Suche nach einzelnen positiv mit C9- und Caspase 3-gefärbten Zellen folgte. Auch hier wurde das Zeiss Axioplan 2-Mikroskop mit zusätzlicher Fluoreszenzeinrichtung verwendet. Folgende Kategorisierung wurde vorgenommen: Amyloid-assoziierte Zellen, nicht Amyloid-assoziierte Zellen, keine positiven Zellen. Amyloid-assoziierte Zellen sind festgelegt als Zellen, die entweder in der Amyloidablagerung selbst oder amyloidnah zu finden waren.

## **2.9 Software und Auswertung**

Die Erfassung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe von Microsoft Excel Version 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Sie wurde ebenfalls für die hier aufgeführten Tabellen, Kreisdiagramme und Balkendiagramme verwendet, wobei letztere zusätzlich mit der Vektor-Grafik-Software Inkscape 1.0.1 (Free Software Foundation, Boston, Massachusetts, USA) bearbeitet wurden. SPSS Version 25 (International Business Machines, Armonk, New York, USA) diente der deskriptiven Auswertung der Resultate dieser Studie. Die Variablen wurden in Form einer Kategorie in Absolutzahlen sowie Prozentsätze ausgedrückt.

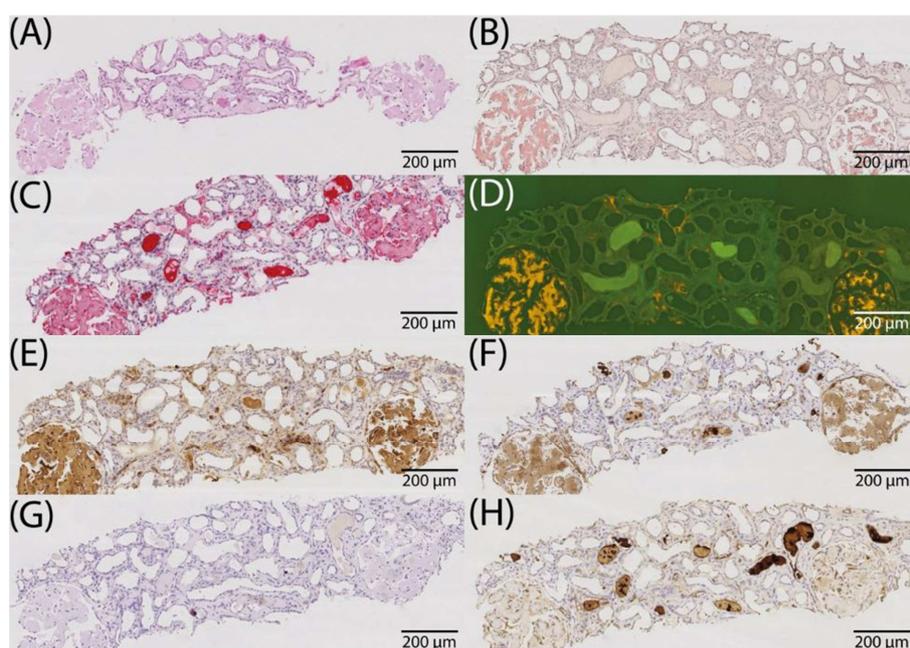
# **3 Ergebnisse**

## **3.1 Immunhistochemische Färbung am Gesamtkollektiv**

Für die immunhistochemische Untersuchung konnten insgesamt 118 Proben aus Resektaten und Biopsien einbezogen werden. Alle 118 (= 100%) Proben wiesen Amyloidablagerungen auf, was zunächst unter dem Polarisationsmikroskop mittels der Kongorot-Färbung und anschließend noch

fluoreszenzmikroskopisch geprüft und bestätigt wurde. Eine Gegenüberstellung der Amyloidtypen zur histoanatomischen Lokalisation des Gesamtkollektivs ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die am häufigsten untersuchten Amyloidosen waren die vom Typ AL (n = 63) und ATTR (n = 35), während die Herz- (n = 28) und Nierenbiopsien (n = 21) die häufigsten Gewebe- und Organtypen darstellten. Von den 118 Proben des Gesamtkollektivs waren alle Proben bezüglich der ApoE- und C9-Immunfärbung auswertbar. Für die Cas3-Untersuchung lagen 114 auswertbare Proben zur Verfügung und für C3 55 Proben.

Die Amyloidablagerungen zeigten eine homogene ApoE- und C9-Immunfärbung (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung der Routinediagnostik und der vier untersuchten Proteine am Beispiel einer renalen AL $\kappa$ -Amyloidose. Hämatoxylin-Eosin (A), Kongorot im Durchlichtmikroskop (B), Antikörper gegen  $\kappa$ -Leichtkette (C), Kongorot im Fluoreszenzmikroskop (D), Antikörper gegen Apolipoprotein E (E), Antikörper gegen Komplement 9 (F), Antikörper gegen Caspase 3 (G), Antikörper gegen Komplement 3 (H). Originalvergrößerung 10x (Lux et al., 2021).

Die Tabellen 5 und 6 präsentieren eine differenzierte Aufstellung über die Anzahl der Fälle, welche eine positive Immunreaktion der Zielproteine innerhalb der Amyloidablagerungen aufzeigten. Komplement 9 konnte in nahezu allen Proben nachgewiesen werden. Innerhalb der Amyloidablagerungen zeigten 117 (99,2%) Fälle eine C9-positive immunhistochemische Reaktion. Eine einzige Myokardbiopsie vom ATTR-Amyloidtyp wies keinerlei Immunfärbung mit C9 auf, wobei diese Probe bei ApoE, Cas3 und C3 ebenfalls keine Anfärbung aufzeigte. Ein solch hoher

Nachweis, wie es bei C9 der Fall war, wurde bei keinem der anderen drei untersuchten Proteine gefunden. Apolipoprotein E erreichte ein Vorkommen in 112 (94,9%), Cas3 in 22 (19,3%) und C3 in 20 (36,4%) der auswertbaren Fälle. Die ApoE-Immunreaktion blieb in lediglich sechs Fällen aus. Zwei dieser Fälle waren einer kardialen und renalen AL $\kappa$ -Amyloidose zugehörig, zwei Fälle einer kardialen und renalen AL $\lambda$ -Amyloidose und weitere zwei Fälle stammten von einem Karpaltunnelligament und einer Lungenbiopsie, beide vom ATTR-Amyloidtyp. Die Mehrheit der insgesamt 22 positiven Cas3-Fälle gehörten einerseits dem ATTR-Amyloidtyp (n = 13) an und andererseits entstammten sie dem Myokard (n = 12).

Um das Ausmaß der Immunfärbung zu beurteilen, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil der gefärbten Amyloidfläche bestimmt, welche mit den Antikörpern gegen ApoE, Cas3, C3 und C9 reagierte (siehe Abbildungen 7 und 8).

**Tabelle 5:** Fallzahlen der positiven Immunreaktion von Apolipoprotein E, Caspase 3, Komplement 3 und Komplement 9 innerhalb der Amyloidablagerungen. Auflistung nach Amyloidtyp.

	Positivität innerhalb der Amyloidablagerungen							
	ApoE		Cas3		C3		C9	
Positiv [n]	Valide	n (%)	Valide	n (%)	Valide	n (%)	Valide	n (%)
AA	10	10 (100)	10	2 (20)	1	0 (0)	10	10 (100)
AIns	4	4 (100)	4	0 (0)	4	0 (0)	4	4 (100)
Al $\kappa$	21	19 (91)	20	3 (15)	7	4 (57)	21	21 (100)
Al $\lambda$	42	40 (95)	40	4 (10)	18	6 (33)	42	42 (100)
ATTR	35	33 (94)	35	13 (37)	22	8 (36)	35	34 (97)
A $\beta$	3	3 (100)	3	0 (0)	1	1 (100)	3	3 (100)
Gemischt	1	1 (100)	-	- -	1	1 (100)	1	1 (100)
Nicht klassifiziert	2	2 (100)	2	0 (0)	1	0 (0)	2	2 (100)
<b>Gesamt</b>	<b>118</b>	<b>112 (95)</b>	<b>114</b>	<b>22 (19)</b>	<b>55</b>	<b>20 (36)</b>	<b>118</b>	<b>117 (99)</b>

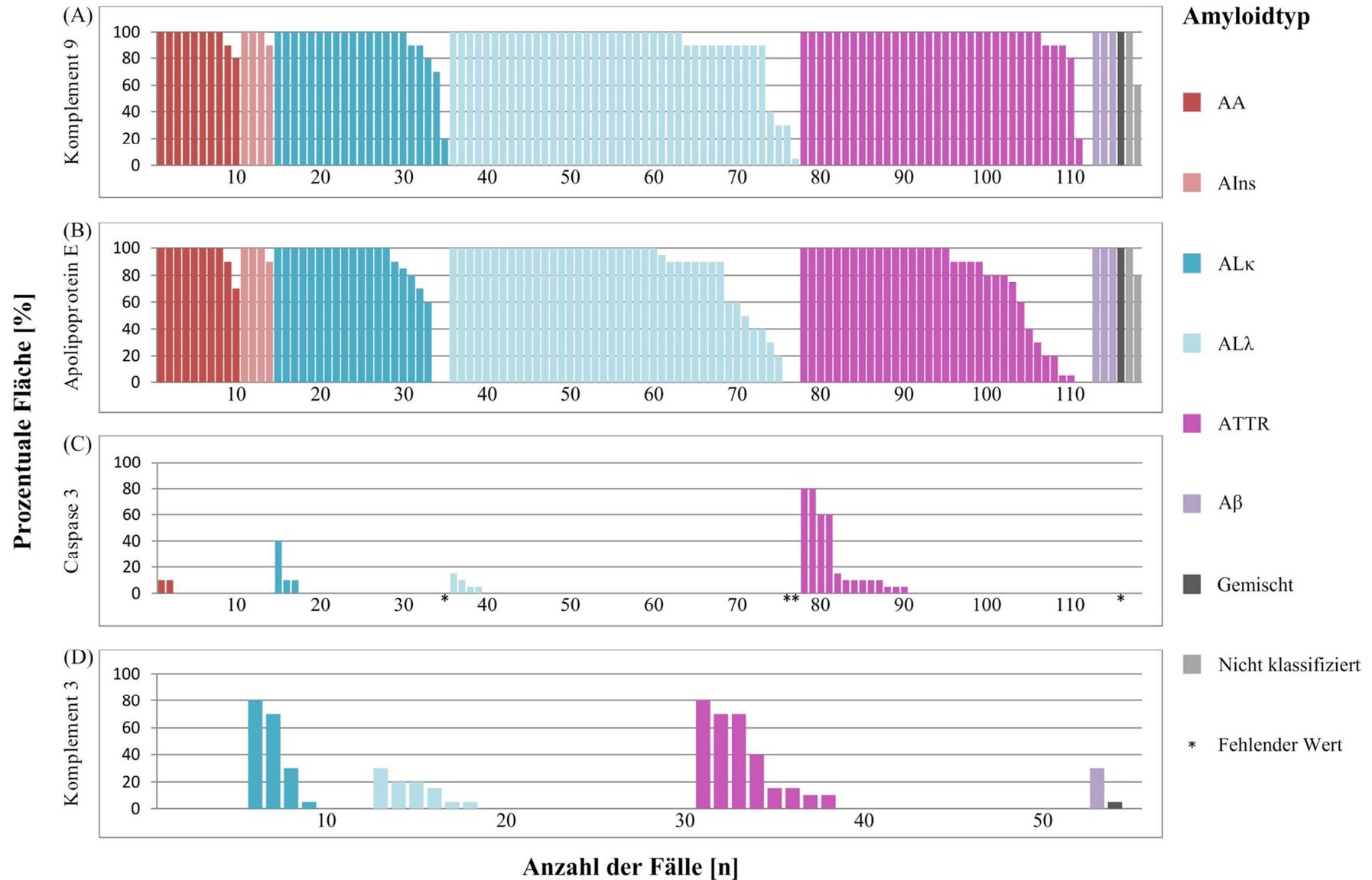
Legende: Valide = Anzahl der auswertbaren Proben. ApoE = Apolipoprotein E, Cas3 = Caspase 3, C3 = Komplement 3, C9 = Komplement 9.

**Tabelle 6:** Fallzahlen der positiven Immunreaktion von Apolipoprotein E, Caspase 3, Komplement 3 und Komplement 9 innerhalb der Amyloidablagerungen. Auflistung nach Organ- und Gewebetyp.

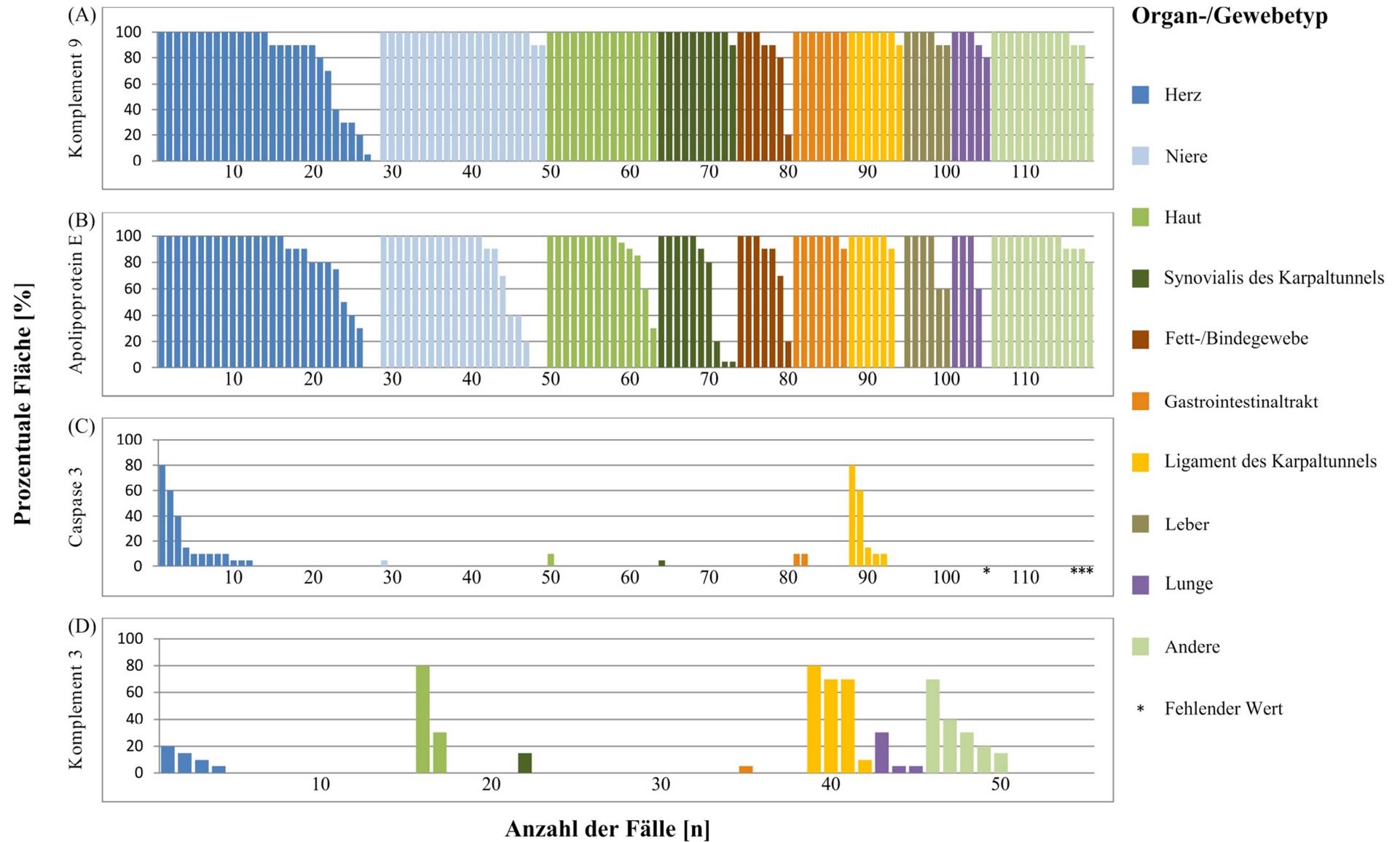
	Positivität innerhalb der Amyloidablagerungen							
	ApoE		Cas3		C3		C9	
Positiv [n]	Valide	n (%)	Valide	n (%)	Valide	n (%)	Valide	n (%)
Herz	28	26 (93)	28	12 (43)	12	4 (33)	28	27 (96)
Niere	21	19 (91)	21	1 (5)	3	0 (0)	21	21 (100)
Haut	14	14 (100)	14	1 (7)	6	2 (33)	14	14 (100)
Synovialis des Karpaltunnels	10	10 (100)	10	1 (10)	8	1 (13)	10	10 (100)
Fett- und Bindegewebe	7	7 (100)	7	0 (0)	5	0 (0)	7	7 (100)
GIT	7	7 (100)	7	2 (29)	4	1 (25)	7	7 (100)
Ligament des Karpaltunnels	7	6 (86)	7	5 (71)	4	4 (100)	7	7 (100)
Leber	6	6 (100)	6	0 (0)	-	- -	6	6 (100)
Lunge	5	4 (80)	4	0 (0)	3	3 (100)	5	5 (100)
Andere	13	13 (100)	10	0 (0)	10	5 (50)	13	13 (100)
<b>Gesamt</b>	<b>118</b>	<b>112 (95)</b>	<b>114</b>	<b>22 (19)</b>	<b>55</b>	<b>20 (36)</b>	<b>118</b>	<b>117 (99)</b>

Legende: Andere = Harnblase, Konjunktiva, Lymphknoten, Mundwinkel, Nasopharynx, Nervus suralis, Oropharynx, Ringband. Valide = Anzahl der auswertbaren Proben. ApoE = Apolipoprotein E, Cas3 = Caspase 3, C3 = Komplement 3, C9 = Komplement 9, GIT = Gastrointestinaltrakt.

**Abbildung 7:** Der Anteil der immungefärbten Fläche von Komplement 9 (A), Apolipoprotein E (B), Caspase 3 (C) und Komplement 3 (D) im Verhältnis zu den Amyloidablagerungen (entsprechend 100%). Darstellung entsprechend des Amyloidtyps. Jeder Balken entspricht einem Fall (Lux et al., 2021).



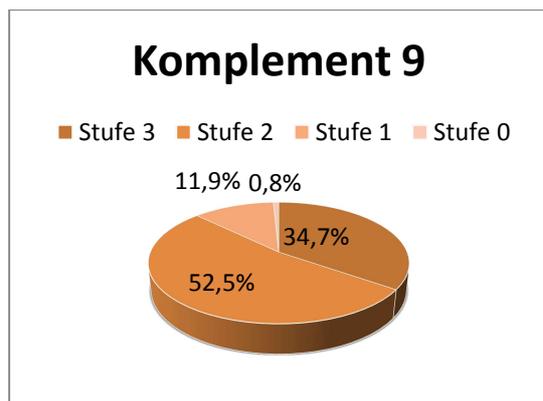
**Abbildung 8:** Der Anteil der immungefärbten Fläche von Komplement 9 (A), Apolipoprotein E (B), Caspase 3 (C) und Komplement 3 (D) im Verhältnis zu den Amyloidablagerungen (entsprechend 100%). Darstellung entsprechend des Organ- und Gewebetyps. Jeder Balken entspricht einem Fall (Lux et al., 2021).



### 3.1.1 Nachweis von Komplement 9

Der immunhistochemische Nachweis von C9 innerhalb des Amyloids gelang in 117 (99,2%) Fällen. Unter den vier Zielproteinen war es das am häufigsten nachgewiesene Protein. Auch in Bezug auf den Flächenanteil war der Nachweis von C9 führend. Die Abbildungen 7A und 8A fassen den prozentualen Flächenanteil aller 118 Fälle zusammen. Bei 89 (75,4%) der 118 Fälle war die gesamte Fläche des Amyloids immunreaktiv für C9 (vollständige Abdeckung; 100%). Diese Fälle setzen sich aus acht (80%) AA-, drei (75%) AIns-, 16 (76,2%) AL $\kappa$ -, 28 (66,7%) AL $\lambda$ -, 29 (82,9%) ATTR-, drei (100%) A $\beta$ -Amyloidosen als auch einer (100%) gemischten und einer (50%) nicht-klassifizierbaren Amyloidose zusammen. Hinsichtlich der Gewebelokalisationen wiesen sowohl alle Proben der Haut als auch des Gastrointestinaltraktes (je 100%) diese vollständige Immunfärbung der gesamten Amyloidablagerung auf. Bei 20 weiteren Fällen konnte C9 in ca. 80-90% der Amyloidfläche nachgewiesen werden, sodass insgesamt 109 (92,4%) Fälle eine Übereinstimmung der C9-Immunreaktion mit der Amyloidfläche von 80% oder mehr aufzeigten. Diese Kongruenz von  $\geq 80\%$  war bei allen Fällen der AA-, AIns-, A $\beta$ - und gemischten Amyloidose (je 100%) zu sehen. Die Fälle der AL $\kappa$ - und AL $\lambda$ -Amyloidosen erreichten diese  $\geq 80\%$ -Deckungsgleichheit in 19 von 21 (AL $\kappa$ ) und 38 von 42 (AL $\lambda$ ) Fällen (beide 90,5%), ATTR-Amyloidosen in 33 (94,3%) von 35 Fällen und die nicht-klassifizierbaren Amyloidtypen in einem (50%) von zwei Fällen. In Anbetracht des anatomischen Ursprungs wurde die räumliche Anreicherung von C9 innerhalb der Amyloidfläche von mindestens 80% in allen Biopsien der Niere, der Leber, der Lunge und auch des Karpaltunnels, sowohl Synovialis als auch Ligament, gefunden (je 100%). Lediglich die Herzbiopsien (21 von 28; 75%), das Fett- und Bindegewebe (6 von 7; 85,7%) und die Proben der Kategorie „Andere“ (12 von 13; 92,3%) erreichten niedrigere Werte. Außerhalb der Amyloidablagerungen konnte in keinem der Fälle eine C9-Immunfärbung beobachtet werden. Der Durchschnitt des deckungsgleichen C9-Anteils aller Proben in Bezug zu der Amyloidfläche betrug 92,8%.

Zusätzlich wurde zu jedem Fall die Intensität der Immunfärbung dokumentiert. Die Abbildung 9 visualisiert diese Ergebnisse in einem Kreisdiagramm. Eine Intensität von Stufe 3 erlangten 41 (34,7%) Fälle. Mit 62 (52,5%) Fällen erzielten mehr als die Hälfte die Stufe 2 und lediglich 14 (11,9%) Fälle konnten der Farbtintensität Stufe 1 zugeordnet werden. In einem (0,8%) Fall kam es zu keiner Immunreaktion (Stufe 0). Somit lag der Durchschnitt der Farbtintensität der C9-Immunreaktion aller 118 Biopsien bei 2,21.



**Abbildung 9:** Farbintensität der Immunreaktion von Komplement 9.

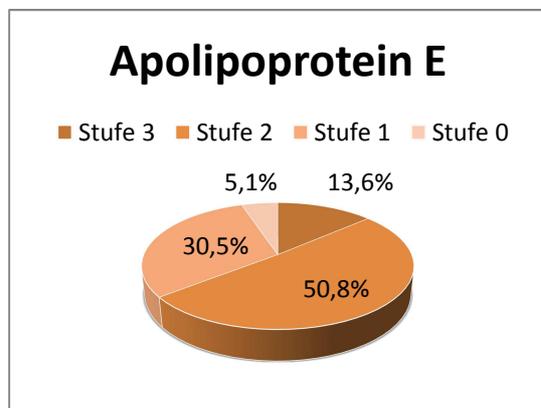
Anhand der immunhistochemischen Untersuchung der Häufigkeit und räumlichen Verteilung von C9 kann das Fazit gezogen werden, dass C9 ein regelhafter Bestandteil von Amyloid ist und die Hypothese der spezifischen Anreicherung, unabhängig von Amyloid- und Gewebetyp, bestätigt wird.

### 3.1.2 Nachweis von Apolipoprotein E

ApoE konnte in 112 (94,9%) Fällen innerhalb der Amyloidablagerungen nachgewiesen werden. Eine graphische Darstellung des ApoE-positiven prozentualen Anteils an der Amyloidfläche ist in den Abbildungen 7B und 8B dargestellt. Eine vollständige (100%) räumliche Übereinstimmung der gesamten Amyloidfläche mit ApoE zeigten 73 (61,9%) Proben. Zusammengesetzt sind diese Fälle aus acht (80%) AA-, drei (75%) AIns-, 14 (66,7%) ALκ-, 25 (59,5%) ALλ-, 18 (51,4%) ATTR-, drei Aβ-Amyloidosen (100%) als auch einem (100%) Fall der gemischten und einem (50%) Fall der nicht-klassifizierbaren Amyloidose. Angesichts der Lokalisationen gab es kein Gewebe, bei dem die gesamte Probenanzahl innerhalb der Amyloidablagerungen vollständig ApoE-positiv gefärbt war. Die 80%-Mindestübereinstimmung erreichten 94 (79,7%) Fälle, inklusive der 73 Proben mit der 100%igen Übereinstimmung. Alle Proben der AIns- und Aβ-Amyloidosen erzielten diese Kongruenz von  $\geq 80\%$ , ebenfalls die Proben der gemischten und nicht-klassifizierbaren Amyloidosen. Die AA-Amyloidosen wiesen eine solche Übereinstimmung in neun von zehn (90,0%), ALκ in 17 von 21 (81,0%), ALλ in 33 von 42 (78,6%) und ATTR in 25 von 35 (71,4%) Fällen auf. In keinem der 118 Fälle wurde eine ApoE-Immunreaktion außerhalb der Amyloidablagerungen beobachtet. Der Durchschnitt des deckungsgleichen ApoE-Anteils des gesamten Kollektivs im Vergleich zu der Amyloidfläche betrug 83,9%.

Die Ermittlung der Färbintensität der ApoE-Immunfärbung ergab die folgenden Ergebnisse (siehe Abbildung 10). Eine Farbintensität von Stufe 3 zeigten 16 (13,6%) Fälle, Stufe 2 60 (50,8%) Fälle und

die Stufe 1 36 (30,5%) Fälle. In sechs (5,1%) Fällen kam es zu keiner Immunreaktion. Die daraus resultierende Durchschnittsintensität aller 118 Proben betrug 1,73. Damit war die immunhistochemische Färbung gegen ApoE weniger intensiv ausgeprägt als die Färbung gegen C9.



**Abbildung 10:** Farbintensität der Immunreaktion von Apolipoprotein E.

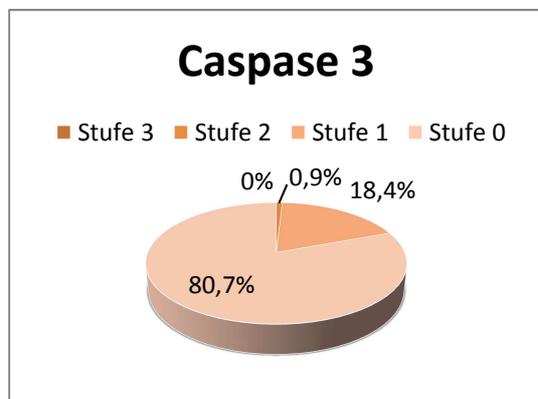
Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass ApoE ubiquitär im Amyloid vorkommt und spezifisch angereichert wird. Somit bestätigen die Resultate dieser Untersuchung die bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Erkenntnisse, dass ApoE ein Amyloid-Signaturprotein ist.

### 3.1.3 Nachweis von Caspase 3

Die mikroskopische Untersuchung der Cas3-Immunreaktion ergab ein Vorkommen in 22 (19,3%) Biopsien. Die Abbildungen 7C und 8C veranschaulichen den prozentualen Anteil der Cas3-Immunfärbung im Amyloid. Eine 100%ige Übereinstimmung von Cas3 und Amyloid lag in keinem Fall vor. Der höchste Grad der Übereinstimmung lag bei 80%, der allerdings nur in zwei (1,8%) Fällen erreicht wurde. Einer dieser Fälle stammte aus einer Herzbiopsie, der andere von einem Resektat des Karpaltunnelligaments, jedoch beide vom ATTR-Amyloidtyp. Insgesamt zeigten 107 (93,9%) der 114 Proben eine maximale C3-Anfärbung von 10% der Amyloidfläche. Jedoch verhielt sich die Mehrheit der Cas3-auswertbaren Fälle (n = 92; 80,7%) keinerlei Immunreaktion, weder innerhalb des Amyloids noch an anderer Lokalisation des Präparats. Damit lag der Durchschnitt des flächendeckenden Cas3-Anteils aller validen Proben bei 4,2%.

Die geringe Häufigkeit des Nachweises von Cas3 spiegelt sich auch in den Farbintensitäten der Anti-Cas3-Immunfärbung wider (siehe Abbildung 11). Keine der 114 Proben erreichte eine Farbintensität von Stufe 3 und auch nur ein (0,9%) Fall demonstrierte eine Intensitätsstufe von 2. Immerhin konnten

21 (18,4%) Fälle mit der Färbestufe 1 identifiziert werden. Keinerlei Immunfärbung zeigten 92 (80,7%) Fälle. Aus den Werten lässt sich eine Durchschnittsintensität von 0,2 ermitteln, die damit auffällig weit unter den Werten von C9 und ApoE lag.



**Abbildung 11:** Farbintensität der Immunreaktion von Caspase 3.

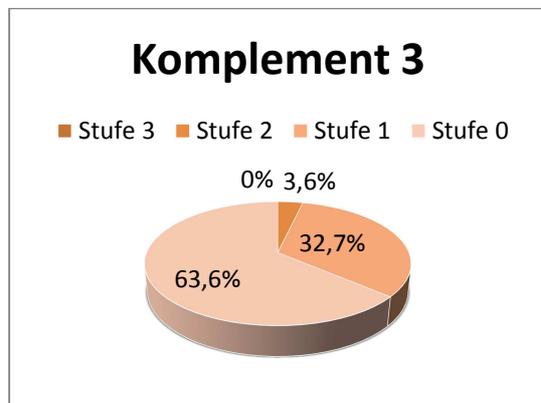
Aus den Daten lässt sich ableiten, dass Caspase 3 ein im Amyloid selten vorkommendes Protein ist, das auch nur einen Bruchteil der Amyloidablagerung abdeckt. Es besteht kein ubiquitäres Auftreten, geschweige denn eine spezifische Anreicherung im Amyloid.

### 3.1.4 Nachweis von Komplement 3

In 20 (36,4%) der 55 auf C3 untersuchten Fälle fand sich eine Immunreaktion innerhalb des Amyloids. In den Abbildungen 7D und 8D sind diese 55 Fälle graphisch dargestellt. Es gab keine Probe, die eine vollständige Übereinstimmung der C3-Immunreaktion mit dem Amyloid aufwies. Wie bei Cas3, gab es nur bei zwei (3,6%) Fällen eine maximale Deckung von 80% der Amyloidfläche. Diese Fälle stammen aus einer Biopsie der Haut vom AL $\kappa$ -Typ und aus einem Resektat des Karpaltunnelligaments vom ATTR-Typ. Eine mit dem Amyloid übereinstimmende Deckung von maximal 10% zeigten 41 (74,5%) Fälle, wobei die Mehrheit der Proben (n = 35; 63,6%) wiederum keine Immunreaktion mit dem gegen C3 gerichteten Antikörper zeigten. Außerhalb der Amyloidablagerungen war in keinem Fall eine C3-Immunreaktion nachweisbar. Damit lag der Durchschnitt des flächendeckenden C3-Anteils bei 11,4%.

Die Dokumentation der Intensität der C3-Immunfärbung ist in Abbildung 12 dargestellt. Es wurde keine Probe mit der Farbintensität von Stufe 3 detektiert. Lediglich zwei (3,6%) Proben erreichten eine

Intensität von Stufe 2 und 18 (32,7%) Proben eine Intensität von Stufe 1. Bei 35 (63,6%) Proben blieb die Immunfärbung gänzlich aus. Somit lag der Durchschnitt aller Intensitäten der 55 Biopsien bei 0,4.



**Abbildung 12:** Farbintensität der Immunreaktion von Komplement 3.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass C3 nicht regelhaft im Amyloid nachweisbar ist und somit keine spezifische Anreicherung vorliegt.

### 3.2 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen

Ergänzend zu den prozentualen positiv gefärbten Arealen wurden die Proben auch auf eine zelluläre Immunreaktion innerhalb der Amyloidablagerungen oder in dessen Nähe untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk der Begutachtung auf C9 und Cas3 - die Proteine, die eine übergeordnete Rolle in den Mechanismen des Zelltodes spielen. Diese Ergebnisse zu den positiv immunreaktiven Amyloid-assoziierten Zellen sind in den Tabellen 7 und 8 festgehalten.

**Tabelle 7:** Fallzahlen immunreaktiver Zellen, aufgelistet nach Amyloidtyp. Prozentzahlen gerundet.

	Caspase 3				Komplement 9			
		Alle positiven Zellen	Amyloid-assoziiert	Nicht Amyloid-assoziiert		Alle positiven Zellen	Amyloid-assoziiert	Nicht Amyloid-assoziiert
Positiv [n]	Valide	n (%)	n (%)	n (%)	Valide	n (%)	n (%)	n (%)
AA	10	4 (40)	3 (30)	2 (20)	10	2 (20)	1 (10)	1 (10)
AIns	4	3 (75)	3 (75)	0 (0)	4	1 (25)	0 (0)	1 (25)
ALκ	20	4 (20)	3 (15)	2 (10)	21	5 (24)	4 (19)	1 (5)
ALλ	40	9 (23)	4 (10)	5 (13)	42	7 (17)	5 (12)	4 (10)
ATTR	35	2 (6)	2 (6)	0 (0)	35	6 (17)	5 (14)	1 (3)
Aβ	3	3 (100)	3 (100)	1 (33)	3	1 (33)	0 (0)	1 (33)
Gemischt	-	- -	- -	- -	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Nicht klassifiziert	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	1 (50)	1 (50)	0 (0)
<b>Gesamt</b>	<b>114</b>	<b>25 (22)</b>	<b>18 (16)</b>	<b>10 (9)</b>	<b>118</b>	<b>23 (20)</b>	<b>16 (14)</b>	<b>9 (8)</b>

Legende: Valide = Anzahl der auswertbaren Proben.

**Tabelle 8:** Fallzahlen immunreaktiver Zellen, aufgelistet nach Organ- und Gewebetyp. Prozentzahlen gerundet.

	Caspase 3			Komplement 9				
		Alle positiven Zellen	Amyloid-assoziiert	Nicht Amyloid-assoziiert		Alle positiven Zellen	Amyloid-assoziiert	Nicht Amyloid-assoziiert
Positiv [n]	Valide	n (%)	n (%)	n (%)	Valide	n (%)	n (%)	n (%)
Herz	28	5 (18)	5 (18)	1 (4)	28	5 (18)	5 (18)	0 (0)
Niere	21	5 (24)	0 (0)	5 (24)	21	5 (24)	2 (10)	5 (24)
Haut	14	3 (21)	2 (14)	1 (7)	14	2 (14)	1 (7)	1 (7)
Synovialis des Karpaltunnels	10	1 (10)	1 (10)	0 (0)	10	1 (10)	1 (10)	0 (0)
Fett- und Bindegewebe	7	3 (43)	3 (43)	0 (0)	7	1 (14)	0 (0)	1 (14)
GIT	7	4 (57)	3 (43)	2 (29)	7	2 (29)	1 (14)	1 (14)
Ligament des Karpaltunnels	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Leber	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Lunge	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5	1 (20)	1 (20)	0 (0)
Andere	10	4 (40)	4 (40)	1 (10)	13	5 (39)	4 (31)	1 (8)
<b>Gesamt</b>	<b>114</b>	<b>25 (22)</b>	<b>18 (16)</b>	<b>10 (9)</b>	<b>118</b>	<b>23 (20)</b>	<b>16 (14)</b>	<b>9 (8)</b>

Legende: GIT = Gastrointestinaltrakt, Andere = Harnblase, Konjunktiva, Lymphknoten, Mundwinkel, Nasopharynx, Nervus suralis, Oropharynx, Ringband. Valide = Anzahl der auswertbaren Proben.

Komplement 9-positive Zellen wurden in insgesamt 23 (19,5%) Fällen des gesamten Kollektivs nachgewiesen, unabhängig davon, ob sie einen räumlichen Bezug zum Amyloid aufweisen. Nur in 16 (13,6%) Proben wiesen die C9-positiven Zellen eine räumliche Nähe zum Amyloid auf. Positiv gefärbte Cas3-Zellen waren in 25 (21,9%) der bewertbaren 114 Proben vorzufinden. Dabei standen bei 18 (15,8%) Proben die Cas3-Zellen in räumlicher Nähe zum Amyloid.

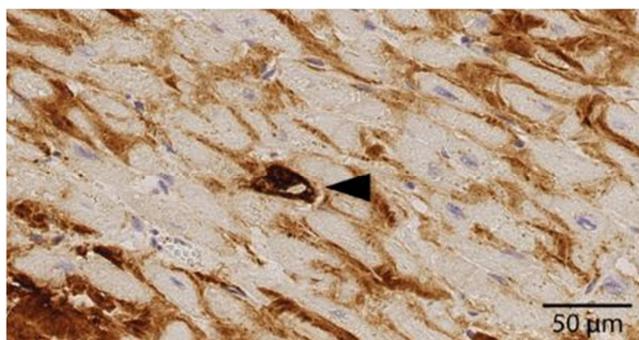
Aufgrund der teils geringen Fallzahlen einiger Amyloid- und Gewebetypen, werden im Folgenden nur Aussagen zu der AL- und ATTR-Amyloidose bzw. zu den Biopsien des Herzens, der Niere und der Haut getroffen.

### 3.2.1 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen im Myokard

In den nachfolgend beschriebenen Myokardproben wurden Amyloidablagerungen stets extrazellulär nachgewiesen.

### Komplement 9

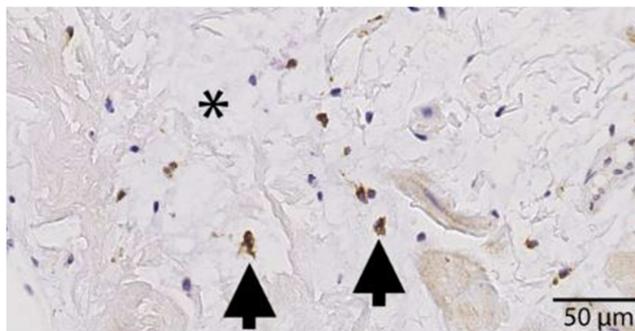
In den untersuchten Myokardproben fanden sich C9-positive Zellen in einem (16,7%) von sechs AL $\kappa$ -, einem (9,1%) von elf AL $\lambda$ - und drei (30%) von zehn ATTR-Amyloidablagerungen. Das entspricht fünf (18,5%) der 27 untersuchten AL- und ATTR-Proben im Herzen. In allen dieser fünf Proben befanden sich diese Zellen in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Amyloid. In vier der fünf Proben befanden sich diese Zellen unmittelbar innerhalb der Amyloidablagerungen. Sie lagen als Einzelzellen vor und die immunhistochemische Anfärbung zeigte sich im Zytoplasma der Kardiomyozyten (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Exemplarische Darstellung eines Komplement 9-immunreaktiven Kardiomyozyten (Pfeilspitze) umschlossen von Komplement 9-immunreaktiven ATTR-Amyloidablagerungen. Anti-Transthyretin-Antikörper, Hämalaun-Kernfärbung; Originalvergrößerung 400x (Lux et al., 2021).

### Caspase 3

In allen Herzproben, bei denen auch Cas3-positive Zellen nachgewiesen wurden, standen die Zellen unmittelbar im räumlichen Bezug zum Amyloid (siehe Abbildung 14). Diese Proben machten 18,5% (n = 5) aller untersuchten kardialen AL- und ATTR-Amyloidosen aus. Die immunhistochemische Färbung zeigte sich bei den Einzelzellen stets perinukleär. Die folgenden Zahlen reflektieren die Aufteilung dieser fünf zellulären immunreaktiven Proben: eine (16,7%) von sechs AL $\kappa$ -, drei (27,3%) von elf AL $\lambda$ - und eine (10%) von zehn ATTR-Amyloidosen.



**Abbildung 14:** Exemplarische Darstellung Caspase 3-immunreaktiver Kardiomyozyten (Pfeile) innerhalb der AL $\lambda$ -Amyloidablagerungen (Sternchen). Anti-Caspase 3-Antikörper, Hämalaun-Kernfärbung; Originalvergrößerung 400x (Lux et al., 2021).

### 3.2.2 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen in der Niere

In den nun dargestellten Proben der Niere wurden die Amyloidablagerungen stets glomerulär und interstitiell beobachtet. Keiner der Fälle zeigte eine positive Kongorot-Färbung der Tubulusanschnitte.

#### Komplement 9

Alle C9-positiven Zellen waren Tubulusepithelzellen. In den Biopsien der Niere konnte generell in vier (33,3%) von zwölf AL $\lambda$ -Amyloidosen eine zelluläre C9-Anfärbung nachgewiesen werden. Allerdings zeigte keiner dieser vier Fälle immunreaktive C9-Zellen innerhalb des Amyloids, jedoch zwei (16,7%) von ihnen mit spärlich positiven Einzelzellen in dessen Nähe. In den anderen beiden Fällen lagen diese Zellen amyloidfern und wurden deshalb auch nicht mit dem Amyloid räumlich in Verbindung gebracht. Die drei untersuchten Proben vom AL $\kappa$ -Amyloidtyp stellten einen Fall mit wenigen, diffus verteilten Einzelzellen dar, die in keinem Zusammenhang mit dem Amyloid gebracht werden konnten. In den zwei ATTR-Proben waren weder amyloidnah noch amyloidfern positive C9-Zellen nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur zwei (11,8%) der 17 geprüften renalen AL- und ATTR-Proben immunreaktive C9-Zellen in Amyloidnähe enthielten, wobei diese beiden Fälle eine AL $\lambda$ -Amyloidose aufwiesen.

#### Caspase 3

Keines der Nierenpräparate enthielt Amyloid-assoziierte Cas3-positive Zellen. Es wurden ausschließlich positive Zellen fern der Amyloidablagerungen aufgefunden. Auch in dieser Immunfärbung konnten diese Zellen als Tubulusepithelzellen identifiziert werden. Diese befanden sich in einem (33,3%) der drei AL $\kappa$ -Proben und in drei (25%) der zwölf AL $\lambda$ -Amyloidosen. Die zwei ATTR-Präparate enthielten keine Cas3-immunreaktiven Zellen.

### 3.2.3 Caspase 3- und Komplement 9-immunreaktive Zellen in der Haut

In den nun beschriebenen Hautproben präsentierten sich die Amyloidablagerungen lediglich in der Dermis, wobei die dort liegenden Talgdrüsen nicht vom Amyloid befallen waren.

#### Komplement 9

In den Hautproben ließen sich C9-positive Zellen innerhalb der Amyloidablagerung in einer (16,7%) von sechs AL $\kappa$ -Proben nachweisen. Dort konnten wenige zytoplasmatisch angefärbte Zellen in Form einer kleinen Ansammlung beobachtet werden. Nur eine einzige ATTR-Probe der Haut lag vor. In dieser konnte lediglich eine Zellansammlung von C9-positiven Drüsenzellen im Endstück der Talgdrüse gefunden werden, welche jedoch amyloidfern und somit nicht Amyloid-assoziiert auftrat. Die sechs AL $\lambda$ -Proben zeigten in keinem Bereich des Gewebeausschnittes eine zelluläre C9-Positivität. In der Gesamtheit zeigt sich demnach nur eine (7,7%) von 13 AL- und ATTR-Proben mit C9-immunreaktiven Zellen in Amyloidnähe. Diese Probe entsprach einer AL $\kappa$ -Amyloidose.

#### Caspase 3

Cas3-positive Zellen fanden sich im Bereich des Amyloids in insgesamt zwei (15,4%) von 13 Hautproben vom Typ AL und ATTR. Bezogen auf die AL-Amyloid-Fälle entsprach dies jeweils eine (16,7%) der sechs AL $\kappa$ - und AL $\lambda$ -Biopsien. Die AL $\kappa$ -Probe wies eine zytoplasmatische Cas3-Immunreaktion in einer kleinen Zellansammlung auf. Die AL $\lambda$ -Probe präsentierte ihre Amyloid-assoziierten Zellen in Form von perinukleär gefärbten Cas3-Einzelzellen. Eine weitere AL $\lambda$ -Probe wies amyloidferne, global verteilte immunreaktive Zellen im Endstück der Talgdrüsen auf. In der einzigen ATTR-Probe wurden keine Cas3-positiven Zellen gefunden.

### 3.2.4 Weitere Auffälligkeiten

Erstaunlich war die Beobachtung von Amyloid-assoziierten Cas3-positiven Zellen beim A $\beta$ - und AIns-Typ als auch bei den untersuchten AA-Amyloidosen im Gastrointestinaltrakt. Alle drei (100%) A $\beta$ -Amyloidosen aus dem ZNS zeigten positive Zellen in den Wänden der von Amyloid betroffenen Gefäße. Im Fett- und Bindegewebe befanden sich in drei (75%) der vier AIns-Amyloidosen Cas3-positive Zellen in direkter Nachbarschaft zum Amyloid. Ein identisches Aufkommen von 75% wurde in den drei der vier Proben der Magen- und Dickdarmschleimhaut mit AA-Amyloid erfasst. Diese Fälle deuten auf ein erhöhtes Vorkommen von Cas3-positiven Zellen in A $\beta$ -Proben des ZNS, AIns-Proben des Fett- und Bindegewebes und in AA-Proben des Gastrointestinaltraktes hin.

Anhand dieser Daten ist der Zelltod in Form von Einzelzellnekrosen und Apoptosen belegt. Aufgrund des Nachweises in nur wenigen Fällen scheinen es seltene Ereignisse zu sein.

## 4 Diskussion

Die beiden aufgestellten Hypothesen dieser hier vorliegenden Studie konnten bestätigt werden:

- 1) Komplement 9 ist ubiquitär, spezifisch und räumlich in Amyloidablagerungen angereichert, unabhängig vom Amyloidtyp und unabhängig von der Gewebelokalisation.
- 2) Amyloid kann in angrenzenden und eingeschlossenen Zellen zum Zelltod führen, sowohl in Form von einer Einzelzellnekrose als auch in Form einer Apoptose.

Die Pathogenese der Amyloidosen ist ein bis heute nicht vollständig aufgeklärter, multifaktorieller Prozess. Neben der Amyloidfibrille, die durch krankheitsspezifische Fehlfaltung des Amyloid-Vorläuferproteins gebildet wird, sind weitere nicht-fibrilläre Komponenten wie beispielsweise SAP und ApoE regelmäßig in allen Amyloidtypen vorzufinden (Benson et al., 2020; Merlini & Bellotti, 2003; Vrana et al., 2009). Diese zusätzlichen Bestandteile beeinflussen möglicherweise das Ablagerungsverhalten und die Therapiemöglichkeiten. So verhindert SAP z.B. durch seine hohe proteolytische Resistenz den Abbau von Amyloid (Tennent et al., 1995), kann jedoch als gezielter Angriffspunkt einer Antikörper-basierten Therapie dienen (Bodin et al., 2010; Richards et al., 2015). Dies weist darauf hin, dass einmal gebildetes Amyloid u.U. auch wieder abgebaut werden kann. Große Unklarheit besteht hinsichtlich des Organotropismus der verschiedenen Amyloidproteine. Der äußerst variable Befall von Geweben und Organen (siehe Tabelle 1) führt zu einer großen Vielfalt der klinischen, oft unspezifischen Symptomatik wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Proteinurie, Zeichen der Herzinsuffizienz und Polyneuropathie (Wechalekar et al., 2016). Dieses breite Erscheinungsbild stellt eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung dar. Das Bewusstsein für diese seltene Erkrankung und der Zeitpunkt der Diagnosestellung entscheiden über die Prognose der Erkrankung. Vergangene Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer fortgeschrittenen AL-Amyloidose und hoher kardialer Amyloidbelastung nicht mehr von einer Chemotherapie profitieren (Kristen et al., 2016). Und obwohl sich die Überlebenszeit in den letzten Jahren deutlich verbessert hat, ist die Mortalität in den ersten sechs Monaten immer noch sehr hoch (Muchtar et al., 2017), mutmaßlich durch eine verzögerte Diagnosestellung mitunter durch das Aufsuchen mehrerer Spezialisten. Bei 37% der Patienten dauert es mehr als ein Jahr bis zur Diagnosestellung (Lousada et al., 2015). Je früher die Diagnose jedoch gestellt wird, desto größer ist die Chance für eine geringere Amyloidlast, einen geringeren Organbefall und einen therapeutischen Erfolg. Insofern muss die therapeutische Intervention im frühen Krankheitsstadium das Ziel sein und zum Gegenstand der Forschung gemacht werden, um die Sterblichkeit zu verringern.

Bis heute ist die Kongorot-Färbung der Goldstandard zum Nachweis von Amyloid im Gewebe (Muchtart et al., 2021). Die Sensitivität der Methode ist begrenzt und hängt vom Amyloidtyp, der Amyloidlast, der Schnittdicke und der Erfahrung des/der befundenen Pathologen:in ab. Zusätzlich wächst die Anzahl der identifizierbaren Amyloidproteine stetig und der Konformationswechsel der Amyloidproteine von nativer Gestalt bis zur  $\beta$ -Faltblattstruktur erschwert die Diagnostik. Zudem birgt eine diskrete oder gar prä-amyloidogene Ablagerung die Gefahr, leicht übersehen zu werden. Es ist nachgewiesen, dass Kongorot nicht für die Diagnostik präfibrillärer Strukturen, die bereits eine toxische Schädigung verursachen, geeignet ist (Hahn et al., 2017; Sjölander et al., 2016). Daher muss die histopathologische Diagnostik fortan weiterentwickelt werden.

Die Identifizierung der nicht-fibrillären Bestandteile, die neben dem amyloidogenen Protein regelmäßig in den Ablagerungen anzutreffen sind, kann einen positiven diagnostischen Nutzen mit sich bringen. Ihre Bestimmung in den Ablagerungen kann u.U. eine Amyloiderkrankung im frühen Krankheitsstadium erkennen. Folglich kann eine rechtzeitige Therapie eingeleitet werden. In dieser Studie wurde nun anhand verschiedener Amyloid- und Gewebetypen untersucht, ob C9 diese Rolle einnehmen kann und als Amyloidsignaturprotein geeignet ist.

## 4.1 Komplement 9 ist ubiquitär angereichert

Meine immunhistochemischen Ergebnisse weisen auf eine ubiquitäre, räumliche und spezifische Anreicherung von C9 im Amyloid hin, unabhängig vom Amyloidtyp und der Gewebelokalisation. Komplement 9 konnte in 117 (99,2%) Fällen nachgewiesen werden. Damit wurde C9 häufiger nachgewiesen als ApoE [112 (94,9%) Fälle]. Lediglich in einer einzigen Myokardbiopsie konnte ich kein C9 nachweisen. Außerdem konnte ich zeigen, dass C9 flächendeckend im Amyloid nachweisbar ist mit einem durchschnittlichen Flächenanteil von 92,8% und damit einem um 9% höheren mittleren Flächenanteil als ApoE. Auch die Farbintensität der C9-Immunreaktion lag mit 2,21 über der Intensität von 1,73 der ApoE-Immunreaktion. Mit diesem Ausmaß an Anreicherung und Intensität des immunhistologisch geführten C9-Nachweises überragte C9 alle anderen hier untersuchten Moleküle. Meine Untersuchungsergebnisse stützen die Hypothese, dass C9 an der Amyloidentstehung oder -ablagerung in irgendeiner Form maßgeblich beteiligt ist und sich möglicherweise als diagnostischer Biomarker nutzbar machen lässt. Es ist ein weiteres Amyloidsignaturprotein.

Das Komplementsystem ist in einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt. Hierzu zählen u.a. Nephritiden, neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Shah et al., 2021) und auch Autoimmunerkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis oder der Systemische Lupus erythematoses (Vignesh et al., 2017). Eine Übersichtsarbeit von *Sethi et al.* zeigte beispielhaft das regelmäßige Auftreten von C3 und C9 in C3GN und DDD (Sethi et al., 2013). Basierend auf den vorangegangenen

Beobachtungen und meinen Studienergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Nachweis von Komponenten des Komplementsystems *per se* noch kein Beweis für das Vorliegen von Amyloid ist, jedoch die C9-Immunfärbung als zusätzlicher diagnostischer Marker herangezogen werden kann, insbesondere wenn sehr feine Amyloidablagerungen gesucht werden. Im Wesentlichen präsentiert die C9-Immunhistochemie eine Ergänzung der bisher angewendeten Kongorot-Färbung. Bei diskreten Amyloidablagerungen hilft die C9-Immunfärbung beim Auffinden von Amyloid, das anschließend gezielt in der Kongorot-Färbung polarisationsmikroskopisch bestätigt werden kann.

Meine Ergebnisse unterstützen darüber hinaus die Ergebnisse und Ausführungen früherer Studien bezüglich des ApoE-Nachweises innerhalb von Amyloid. Der häufige Nachweis von ApoE bestätigt seine Rolle als Amyloidsignaturprotein und die Funktion als Indikator für das Vorliegen von Amyloid. Dieses Ergebnis bestätigt auch, dass meine Stichprobe und Fallauswahl repräsentativ war.

Offen bleibt die Frage, warum sich C9 im Amyloid anreichert und ob Amyloid möglicherweise sogar die Komplementkaskade aktiviert. In früheren Studien wurde lediglich der Zusammenhang zwischen Komplement, A $\beta$ -Amyloid und AD untersucht (siehe Abschnitt 1.3.4.1). Nun liefert die Studie von *Treitz et al., 2021* zu dieser Fragestellung erste Ergebnisse. Mithilfe der markierungsfreien Proteomquantifizierung (*label-free quantification, LFQ*) an FFPE Biopsien wurde im Karpaltunnelgewebe, welches nachweislich von ATTR-Amyloid betroffen war, eine Assoziation zum Komplementsystem nachgewiesen. 22 Proteine der Komplementfamilie konnten räumlich und spezifisch in der ATTR-Amyloidose nachgewiesen werden (*Treitz et al., 2022*). Zu diesen nachgewiesenen Komplementproteinen gehören u.a. die Komplementregulatoren CFHR1, CFHR2, CFHR5, CFH und die Komplementfaktoren C1s, C1q, C3, C4, C5, C6, C7, C8 $\alpha$ , C8 $\beta$ , C8 $\gamma$  und C9. Demnach sind alle sieben Komplementproteine vertreten, die den MAC bilden (siehe Abschnitt 1.3.2). Der C9-Nachweis erfolgte in der Studie zusätzlich durch die Immunhistochemie. Diese Erkenntnisse sprechen für ein aktiviertes Komplementsystem im ATTR-Gewebe des Karpaltunnels. Das Komplementsystem scheint demnach in die Pathomechanismen der ATTR-Amyloidose einzugreifen. Mein Studienergebnis spiegelt mit einer C9-Anreicherung in ATTR-Gewebeproben in 34 (97,1%) von 35 Fällen (siehe Abschnitt 3.1) die Ergebnisse der Proteomquantifizierung von *Treitz et al., 2021* wider.

## 4.2 Amyloid führt zum Zelltod

Komplement 9 spielt eine entscheidende Rolle in zytolytischen Prozessen. Es ist ein elementarer Bestandteil des MAC. Die Aktivierung einer Sequenz von Proteinen der Komplementkaskade führt zur Ausbildung einer Multiproteinpore (= MAC), die in die Zellmembran eindringt und den Zelltod verursacht. Der MAC ist das Endprodukt der Komplementkaskade, zu dem die drei verschiedenen

Signalwege unabhängig voneinander hinführen. Jeder dieser Signalwege bewirkt eine Spaltung und Aktivierung vom Komplementfaktor C3, dem Zentrum dieser Proteinkaskade. Nach der C3-Aktivierung führt die Kaskade über weitere Zwischenschritte zur Zelllyse. Es kommt zum Zelltod durch Nekrose (griechisch „nekrosis“ = das Töten), der im Gegensatz zur Apoptose (griechisch „apoptosis“ = abfallen) eine Entzündungsreaktion induziert. Ein Surrogatmarker der Apoptose ist die gespaltene und aktivierte Form der Caspase 3 (Gown & Willingham, 2002; Nagata, 2018). In meiner Arbeit habe ich auch untersucht, ob im Amyloid Einzelzellnekrosen und Apoptosen vorkommen und dazu immunhistologisch das Vorliegen C9- und Cas3-positiver Zellen geprüft. C9- positive Zellen fand ich in 16 Fällen (13,6%) und Cas3- positive Zellen in 18 Fällen (15,8%). Damit kommen Einzelzellnekrosen und Apoptosen im Amyloid vor.

Interessant ist der geringfügig häufigere Nachweis C9- und Cas3-immunreaktiver Amyloid-assoziiierter Zellen in Myokardbiopsaten im Vergleich zum Gesamtkollektiv. 17,9% der Herzbiopsate enthielten C9- und/oder Cas3- positive Zellen im Vergleich zu 13,6% (C9) und 15,8% (Cas3) des Restkollektivs nichtkardialer Gewebeproben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Einzelzellnekrosen und Apoptosen in Amyloidablagerungen vorkommen, aber ein seltenes Ereignis sind und keine Regelmäßigkeit darstellen. Gewebeproben weisen jedoch eine räumliche Begrenzung auf und stellen nur eine zeitliche Momentaufnahme der Erkrankung dar. Deshalb darf der scheinbar selten vorkommende Zellverlust nicht unterbewertet werden. Im Verlauf der Erkrankung kann der Zellverlust, egal ob durch Nekrose oder Apoptose, erheblich sein. Dies ist eine häufige Beobachtung in fortgeschrittenen Krankheitsstadien.

### 4.3 Proteomics bei Amyloidosen

Einige Amyloidosen sind behandelbar. Die Therapieart hängt davon ab, welches Amyloidprotein abgelagert wurde. Da es über 35 verschiedene Amyloidproteine gibt, die zu sehr unterschiedlichen Formen von Amyloidosen mit sehr unterschiedlichen Verläufen und Prognosen führen, kommt der korrekten Identifikation des Amyloidproteins eine große Bedeutung zu. Die Wissenschaft der Proteomik hat in den letzten 15 Jahren die Typisierung der Amyloidosen vorangetrieben. Grundlage dafür ist die Massenspektrometrie. Die Verfahren *laser microdissection* (LMD) und *liquid chromatography* (LC) finden ihren Einsatz. Die LMD sorgt mit der präzisen Zerteilung der Gewebeprobe für eine Fokussierung auf das zu untersuchende Areal. Die LC dient der Trennung der Probe in ihre einzelnen Bestandteile, indem die chemischen und physikalischen Wechselwirkungen der Moleküle berücksichtigt werden. Im komplexen Amyloid-Proteom konnten dank dieser Techniken sowohl das Amyloidprotein als auch Markerproteine identifiziert werden. Die Sensitivität und

Spezifität dieser Methode ist hoch (Vrana et al., 2009). Die Proteomik ermöglicht dem Patienten somit eine individuelle und spezifische Behandlung.

Die Ergebnisse meiner Studie stimmen mit den aktuellen Erkenntnissen der Proteomics hinsichtlich des Amyloid-Proteoms überein. Zum Vergleich dienen u.a. die folgenden zwei Arbeiten. (1) Die Übersichtsarbeit von *Gottwald und Röcken, 2021* beschreibt einen ApoE-Nachweis in jeder Amyloidprobe (100%) und einen C9-Nachweis in 18 (66,7%) von 27 Nierenbiopsien (Gottwald & Röcken, 2021). Ich konnte ApoE in 112 (94,9%) von 118 Fällen nachweisen und C9 in jeder der 21 Nierenproben (100%), unabhängig der Amyloidart (siehe Abschnitt 3.1). (2) Die Studie von *Kourelis et al., 2020* demonstriert eine Überrepräsentation von Komplementproteinen im kardialen ATTR-Proteom, mit Einschluss von C9 und C3 (Kourelis et al., 2020). Meine Studie liefert bezüglich der Komplementproteine in neun (90%) von zehn kardialen ATTR-Proben eine vollständige Übereinstimmung der C9-Immunfärbung mit den Amyloidablagerungen. Lediglich eine kardiale ATTR-Probe wies keinerlei C9-Immunfärbung auf, was auf einen Fehler im Anfärbungsprozess hindeuten könnte.

Alle Erkenntnisse aus bisherigen Studien über Amyloidablagerungen und deren Bestandteile bekräftigen die weitere Erforschung und sorgfältige Aufklärung des Amyloid-Proteoms. Alle beteiligten Proteine müssen entdeckt und auf ihren Einfluss in die Pathomechanismen der Amyloidogenese untersucht werden. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass nicht-fibrilläre Proteine aktive Funktionen in der Initiation und/oder Progression der Krankheit ausüben (Ancsin & Kisilevsky, 1999; Kisilevsky, 2000). Darüber hinaus identifizierte die Proteomik die Korrelation zwischen dem Alter der Patienten mit einer ATTR-Amyloidose und einer erhöhten Konzentration von Komplementproteinen. Des Weiteren sank mit Zunahme des Erkrankungsstadiums auch die Konzentration des CFHR5, ein Inhibitor der Komplementkaskade (Kourelis et al., 2020). Dies sind Belege dafür, dass das Komplementsystem an dem Krankheitsprozess beteiligt sein muss.

## 4.4 Einschränkungen der Studie

Das Gesamtkollektiv dieser Studie beinhaltet verschiedene Amyloidtypen und verschiedene Organ-/Gewebetypen. Die jeweilige Probenanzahl variiert von Typ zu Typ. Folglich ist die Aussagekraft zu den verschiedenen Amyloidtypen und Organ-/Gewebetypen unterschiedlich zu bewerten. Darüber hinaus wurde nur ein räumlicher Anteil des amyloidbelastenden Gewebes untersucht und dies nur zu einem Zeitpunkt. Das hat zur Folge, dass keine Aussage über die Amyloidlast, den Schweregrad oder den Verlauf der Erkrankung getroffen werden kann. Der Prozess der Amyloidbildung kann in dieser Studie nicht vollständig abgebildet werden.

## 4.5 Ausblick

Meine Studie liefert die ersten Ergebnisse über das Vorkommen von C9 in Amyloidablagerungen. Komplement 9 stellt sich in der Immunhistochemie regelmäßig und ubiquitär im Amyloid dar. Somit ist der Nachweis von C9 ein zusätzliches diagnostisches Tool zur bisherigen Routinediagnostik mit der Kongorot-Färbung. Bei diskreten Formen der Amyloidablagerungen, wo die Sensitivität der Kongorot-Färbung nachlässt, stellt die C9-Immunhistochemie eine hochwertige Ergänzung dar.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, dass das Komplementsystem eine pathophysiologische Rolle bei Amyloidosen spielt. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um aufzuklären, inwiefern das Komplementsystem durch das Amyloid aktiviert wird. Das Auftreten von C9 im Amyloid muss in Zukunft über einen längeren Zeitraum erfasst werden. Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Amyloidogenese und der Amyloidlast können hilfreich sein. Dazu eignen sich beispielsweise Tiermodelle. Zusätzlich müssen künftige Studien die möglichen Bindungsmechanismen zwischen C9 und den Amyloidfibrillen prüfen.

Es ist davon auszugehen, dass durch die Erforschung des gesamten Amyloid-Proteoms neue Diagnostika und Therapieziele gefunden werden können.

## 5 Zusammenfassung

Amyloidosen stellen eine Gruppe von Erkrankungen dar, welche durch das Ablagern fehlgefalteter Proteine und Peptide verursacht werden. Sie gehören zu den Konformationskrankheiten. Neben dem Amyloid-spezifischen Fibrillenprotein befinden sich noch weitere nicht-fibrilläre Bestandteile in den Amyloidplaques. Sie spielen in der Amyloidogenese und den Krankheitsprozess eine teilweise gesicherte wichtige Rolle. Patienten mit einer Amyloidose zeigen eine Vielfalt an Symptomen und präsentieren sich klinisch sehr unterschiedlich. Die unspezifischen Symptome lassen nicht sofort an eine Amyloidose denken. Dies hat zur Folge, dass sich der Diagnosezeitpunkt häufig hinauszögert. Der frühzeitige Therapiestart ist jedoch für die Patienten und deren Prognose entscheidend. Deshalb ist eine schnelle und frühzeitige Diagnostik im frühen Krankheitsstadium bei noch geringer Amyloidlast so wichtig. Die Polarisationsmikroskopie an Kongorot-gefärbten Gewebeschnitten ist noch der Goldstandard. Doch wegen eingeschränkter Sensitivität der Kongorot-Färbung bei geringer Amyloidlast gewinnen zunehmend sensitivere Verfahren an Bedeutung. Hierzu zählt auch die Identifikation neuer diagnostischer Zielstrukturen, die helfen, diskrete Amyloidablagerungen nachzuweisen und somit das Ziel einer frühen Diagnosestellung realisieren.

In dieser Studie wurden Amyloidablagerungen immunhistochemisch auf das Vorkommen von C9 untersucht. Antikörperfärbungen gegen ApoE, Cas3 und C3 dienten der Kontrolle. Zusätzlich wurde überprüft, ob Amyloid zum Zelltod führen kann. Das Gesamtkollektiv umfasste 118 amyloidhaltige Proben, welche unterschiedliche Amyloidtypen enthielten und von unterschiedlichen Organen/Geweben stammten. Die FFPE Gewebeschnitte wurden mikroskopisch untersucht und bewertet. Hierbei zeigte sich C9 in 99,2% der 118 Proben und liefert den Beleg für dessen ubiquitäres Vorkommen in Amyloidablagerungen. Apolipoprotein E konnte in 94,9%, Cas3 in 19,3% und C3 in 36,0% der auswertbaren Fälle nachgewiesen werden. Die Intensität der C9-Immunfärbung war mit einem Wert von 2,21 die am stärksten ausgeprägte Immunfärbung aller vier untersuchten Proteine. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass eine mit dem Amyloid-assoziierte Nekrose in 13,6% der Proben und eine Amyloid-assoziierte Apoptose in 15,8% der Proben auftrat.

Die Studie zeigt, dass C9 neben ApoE unabhängig von Amyloid- und Gewebetyp regelhaft und flächendeckend im Amyloid vorkommt und ebenfalls als *amyloid signature protein* gewertet werden muss. Der immunhistologische Nachweis von C9 eignet sich als ergänzendes diagnostisches Verfahren um Amyloidablagerungen zu finden. Die Studie lässt weiterhin darauf schließen, dass Amyloid das Komplementsystem aktiviert. Komplement 9 stellt somit eine neue diagnostische Zielstruktur dar und die Komplementproteine ein Angriffspunkt für die Therapie.

Die Empfehlung dieser Studie liegt in der Etablierung von C9 als neues Amyloid-signaturprotein und die Einführung der C9-Immunhistochemie als Ergänzung zur Routinediagnostik. Zukünftig muss auch

weiterhin an der Amyloid-Zusammensetzung geforscht werden. Eine Aufschlüsselung des gesamten Amyloid-Proteoms sorgt für ein besseres Krankheitsverständnis und hilft, neue Diagnose- und Therapieverfahren zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
- Ancsin JB, Kisilevsky R. The heparin/heparan sulfate-binding site on apo-serum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis. *J Biol Chem* 1999; 274(11): 7172–7181.
- Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT Jr. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* 2002; 41(38): 11338–11343.
- Appel GB, Cook HT, Hageman G, Jennette JC, Kashgarian M, Kirschfink M, Lambris JD, Lanning L, Lutz HU, Meri S, Rose NR, Salant DJ, Sethi S, Smith RJ, Smoyer W, Tully HF, Tully SP, Walker P, Welsh M, Würzner R, Zipfel PF. Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(5): 1392–1403.
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E. The ability of amyloid beta-protein [A beta P (1-40)] to form Ca<sup>2+</sup> channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 747: 256–266.
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* 2017; 55(2): 182–196.
- Baran K, Dunstone M, Chia J, Ciccone A, Browne KA, Clarke CJ, Lukoyanova N, Saibil H, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity* 2009; 30(5): 684–695.
- Beeri MS, Rapp M, Silverman JM, Schmeidler J, Grossman HT, Fallon JT, Purohit DP, Perl DP, Siddiqui A, Lesser G, Rosendorff C, Haroutunian V. Coronary artery disease is associated with Alzheimer disease neuropathology in APOE4 carriers. *Neurology* 2006; 66(9): 1399–1404.
- Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermark P. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 2018; 25(4): 215–219.
- Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermark P. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 2020; 27(4): 217–222.
- Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Terminal membrane C5b-9 complex of human complement: transition from an amphiphilic to a hydrophilic state through binding of the S protein from serum. *J Cell Biol* 1982; 94(3): 755–759.

- Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 725–731.
- Bodin K, Ellmerich S, Kahan MC, Tennent GA, Loesch A, Gilbertson JA, Hutchinson WL, Mangione PP, Gallimore JR, Millar DJ, Minogue S, Dhillon AP, Taylor GW, Bradwell AR, Petrie A, Gillmore JD, Bellotti V, Botto M, Hawkins PN, Pepys MB. Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature* 2010; 468(7320): 93–97.
- Brambilla F, Lavatelli F, Di Silvestre D, Valentini V, Palladini G, Merlini G, Mauri P. Shotgun protein profile of human adipose tissue and its changes in relation to systemic amyloidoses. *J Proteome Res* 2013; 12(12): 5642–5655.
- Buxbaum JN, Tagoe CE. The genetics of the amyloidoses. *Annu Rev Med* 2000; 51: 543–569.
- Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* 2017; 86: 27–68.
- Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2015; 1219: 1–9.
- Ciudad S, Puig E, Botzanowski T, Meigooni M, Arango AS, Do J, Mayzel M, Bayoumi M, Chaignepain S, Maglia G, Cianferani S, Orekhov V, Tajkhorshid E, Bardiaux B, Carulla N. A $\beta$ (1-42) tetramer and octamer structures reveal edge conductivity pores as a mechanism for membrane damage. *Nat Commun* 2020; 11(1): 3014.
- Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016(11).
- Darling AL, Shorter J. Atomic Structures of Amyloid- $\beta$  Oligomers Illuminate a Neurotoxic Mechanism. *Trends Neurosci* 2020; 43(10): 740–743.
- Dasari S, Theis JD, Vrana JA, Rech KL, Dao LN, Howard MT, Dispenzian A, Gertz MA, Hasadsri L, Highsmith E, Kurtin PJ, McPhail ED. Amyloid Typing by Mass Spectrometry in Clinical Practice: a Comprehensive Review of 16,175 Samples. *Mayo Clin Proc* 2020; 95(9): 1852–1864.
- Deckwerth TL, Johnson EM Jr. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol* 1993; 123(5): 1207–1222.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S, Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1992; 13(1): 179–189.

- DiScipio RG, Gehring MR, Podack ER, Kan CC, Hugli TE, Fey GH. Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of human complement component C9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(23): 7298–7302.
- Dogan A. Amyloidosis: Insights from Proteomics. *Annu Rev Pathol* 2017; 12: 277–304.
- Dong L, Wilson C, Wardell MR, Simmons T, Mahley RW, Weisgraber KH, Agard DA. Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* 1994; 269(35): 22358–22365.
- Dudkina NV, Spicer BA, Reboul CF, Conroy PJ, Lukoyanova N, Elmlund H, Law RHP, Ekkel SM, Kondos SC, Goode RJA, Ramm G, Whisstock JC, Saibil HR, Dunstone MA. Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex. *Nat Commun* 2016; 7: 10588.
- Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol* 1982; 57(2-3): 239–242.
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276(2): 1071–1077.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, Van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278(16): 1349–1356.
- Fischer B, Schmoll H, Riederer P, Bauer J, Platt D, Popa-Wagner A. Complement C1q and C3 mRNA expression in the frontal cortex of Alzheimer's patients. *J Mol Med (Berl.)* 1995; 73(9): 465–471.
- Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura N, Ghiso J, Frangione B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am J Pathol* 1994; 145(3): 526–530.
- Gioeva Z, Urban P, Meliss RR, Haag J, Axmann HD, Siebert F, Becker K, Radtke HG, Röcken C. ATTR amyloid in the carpal tunnel ligament is frequently of wildtype transthyretin origin. *Amyloid* 2013; 20(1): 1–6.
- Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128: 3–41.
- Gottwald J, Röcken C. The amyloid proteome: a systematic review and proposal of a protein classification system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2021; 56(5): 526–542.
- Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(4): 449–454.

- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309–1312.
- Hadding U, Müller-Eberhard HJ. The ninth component of human complement: isolation, description and mode of action. *Immunology* 1969; 16: 719–735.
- Hahn K, Nilsson KPR, Hammarström P, Urban P, Meliss RR, Behrens HM, Krüger S, Röcken C. Establishing and validating the fluorescent amyloid ligand h-FTAA (heptamer formyl thiophene acetic acid) to identify transthyretin amyloid deposits in carpal tunnel syndrome. *Amyloid* 2017; 24(2): 78–86.
- Harrison JR, Owen MJ. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis on trial. *Br J Psychiatry* 2016; 208(1): 1–3.
- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM, Hyman BT. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid  $\beta$  peptide. *J Neurosci* 2012; 32(43): 15181–15192.
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997; 349(9046): 151–154.
- Howie AJ, Brewer DB. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron* 2009; 40(3): 285–301.
- Huang J, Cui Z, Gu QH, Zhang YM, Qu Z, Wang X, Wang F, Cheng XY, Meng LQ, Liu G, Zhao MH. Complement activation profile of patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One* 2020; 15(6): e0234934.
- Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* 2014; 72 Pt A: 3–12.
- Ishii T, Haga S. Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol* 1984; 63(4): 296–300.
- Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 1993; 268(14): 10160–10167.
- Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ. beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol* 1994; 152(10): 5050–5059.
- Jiménez Fernández D, Lamkanfi M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biol Chem* 2015; 396(3): 193–203.

- Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(46): 16310–16315.
- Kaufmann SH. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 2008; 9(7): 705-712.
- Ke PC, Zhou R, Serpell LC, Riek R, Knowles TPJ, Lashuel HA, Gazit E, Hamley IW, Davis TP, Fändrich M, Otzen DE, Chapman MR, Dobson CM, Eisenberg DS, Mezzenga R. Half a century of amyloids: past, present and future. *Chem Soc Rev* 2020; 49(15): 5473–5509.
- Kisilevsky R. The relation of proteoglycans, serum amyloid P and Apo E to amyloidosis current status, 2000. *Amyloid* 2000; 7(1): 23–25.
- Kockx M, Traini M, Kritharides L. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *J Mol Med (Berl.)* 2018; 96(5): 361–371.
- Kourelis TV, Dasari SS, Dispenzieri A, Maleszewski JJ, Redfield MM, Fayyaz AU, Grogan M, Ramirez-Alvarado M, Abou Ezzeddine OF, McPhail ED. A Proteomic Atlas of Cardiac Amyloid Plaques. *JACC CardioOncol* 2020; 2(4): 632–643.
- Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(15): 5810–5814.
- Krance SH, Wu C-Y, Zou Y, Mao H, Toufighi S, He X, Pakosh M, Swardfager W. The complement cascade in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2021; 26(10): 5532–5541.
- Kristen AV, Brokbals E, aus dem Siepen F, Bauer R, Hein S, Aurich M, Riffel J, Behrens HM, Krüger S, Schirmacher P, Katus HA, Röcken C. Cardiac Amyloid Load: A Prognostic and Predictive Biomarker in Patients With Light-Chain Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2016; 68(1): 13–24.
- Lasagna-Reeves CA, Glabe CG, Kaye R. Amyloid- $\beta$  annular protofibrils evade fibrillar fate in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem* 2011; 286(25): 22122–22130.
- Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch* 2000; 436(5): 439–448.
- Liu C, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995; 16(4): 194–201.
- Lousada I, Comenzo RL, Landau H, Guthrie S, Merlini G. Light Chain Amyloidosis: Patient Experience Survey from the Amyloidosis Research Consortium. *Adv Ther* 2015; 32(10): 920–928.
- Lowrey DM, Aebischer T, Olsen K, Lichtenheld M, Rupp F, Hengartner H, Podack ER. Cloning, analysis, and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(1): 247–251.

- Lux A, Gottwald J, Behrens HM, Daniel C, Amann K, Röcken C. Complement 9 in amyloid deposits. *Amyloid* 2021; 28(3): 199–208.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240(4852): 622–630.
- Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 507–537.
- Makin S. The amyloid hypothesis on trial. *Nature* 2018; 559(7715): S4–S7.
- Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987; 49(5): 679–685.
- McCormack R, de Armas L, Shiratsuchi M, Podack ER. Killing machines: three pore-forming proteins of the immune system. *Immunol Res* 2013; 57(1-3): 268–278.
- McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Immune system response in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 1989; 16(4 Suppl): 516–527.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(4): a008656.
- McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE. Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J Struct Biol* 2000; 130(2-3): 259–270.
- Meinhardt J, Fändrich M. Struktur von Amyloidfibrillen. *Pathologe* 2009; 30(3): 175–181.
- Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003; 349(6): 583–596.
- Mollee P, Boros S, Loo D, Ruelcke JE, Lakis VA, Cao KL, Renaut P, Hill MM. Implementation and evaluation of amyloidosis subtyping by laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Clin Proteomics* 2016; 13: 30.
- Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, Grogan M, Mauermann M, McPhail ED, Kurtin PJ, Leung N, Buadi FK, Dingli D, Kumar SK, Gertz MA. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med* 2021; 289(3): 268–292.
- Muchtar E, Gertz MA, Kumar SK, Lacy MQ, Dingli D, Buadi FK, Grogan M, Hayman SR, Kapoor P, Leung N, Fonder A, Hobbs M, Hwa YL, Gonsalves W, Warsame R, Kourelis TV, Russell S, Lust JA, Lin Y, Go RS, Zeldenrust S, Kyle RA, Rajkumar SV, Dispenzieri A. Improved outcomes for newly diagnosed AL amyloidosis between 2000 and 2014: cracking the glass ceiling of early death. *Blood* 2017; 129(15): 2111–2119.
- Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol* 2018; 36: 489–517.

- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1991; 541(1): 163–166.
- Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U, Schwaeble WJ, Gingras AR, Tzima S, Vivanco F, Egido J, Tijsma O, Hack EC, Daha MR, Roos A. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* 2003; 33(2): 465–473.
- Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, Daina E, Fenili C, Castelletti F, Sorosina A, Piras R, Donadelli R, Maranta R, van der Meer I, Conway EM, Zipfel PF, Goodship TH, Remuzzi G. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(10): 1844–1859.
- Pangburn MK. Alternative pathway of complement. *Methods Enzymol* 1988; 162: 639–653.
- Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Shin ML, Trump BF. Ultrastructural studies of complement mediated cell death: a biological reaction model to plasma membrane injury. *Virchows Arch* 1994; 424(6): 677–685.
- Poreba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drag M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(8): a008680.
- Puchtler H, Sweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem* 1962; 10(3): 355–364.
- Richards DB, Cookson LM, Berges AC, Barton SV, Lane T, Ritter JM, Fontana M, Moon JC, Pinzani M, Gillmore JD, Hawkins PN, Pepys MB. Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *N Engl J Med* 2015; 373(12): 1106–1114.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11(9): 785–797.
- Röcken C. Das Amyloid Register Kiel. *Pathologe* 2018; 39: 301–305.
- Röcken C, Eriksson M. Amyloid und Amyloidosen. *Pathologe* 2009; 30: 182–192.
- Röcken C, Ernst J, Hund E, Michels H, Perz J, Saeger W, Sezer O, Spuler S, Willig F, Schmidt HH. Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der extrazerebralen Amyloidosen. *Med Klin* 2006; 101: 825-829.
- Roumenina LT, Ruseva MM, Zlatarova A, Ghai R, Kolev M, Olova N, Gadjeva M, Agrawal A, Bottazzi B, Mantovani A, Reid KB, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry* 2006; 45(13): 4093–4104.

- Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol* 2010; 37(6): 1361–1378.
- Salvesen GS, Ashkenazi A. Snapshot: caspases. *Cell* 2011; 147(2): 476–476.e.1.
- Saraiva MJ. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Lett* 2001; 498(2-3): 201–203.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(20): 9649–9653.
- Schönland SO, Hegenbart U, Bochtler T, Mangatter A, Hansberg M, Ho AD, Lohse P, Röcken C. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood* 2012; 119(2): 488–493.
- Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, Zand L, Vrana JA, Nasr SH, Theis JD, Dogan A, Smith RJ. C3 glomerulonephritis: clinicopathological findings, complement abnormalities, glomerular proteomic profile, treatment, and follow-up. *Kidney Int* 2012; 82(4): 465–473.
- Sethi S, Gamez JD, Vrana JA, Theis JD, Bergen HR 3rd, Zipfel PF, Dogan A, Smith RJ. Glomeruli of Dense Deposit Disease contain components of the alternative and terminal complement pathway. *Kidney Int* 2009; 75(9): 952–960.
- Sethi S, Vrana JA, Theis JD, Dogan A. Mass spectrometry based proteomics in the diagnosis of kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22(3): 273–280.
- Shah A, Kishore U, Shastri A. Complement System in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(24): 13647.
- Shin ML, Rus HG, Niculescu FI. (1996): Membrane attack by complement: assembly and biology of terminal complement complexes. In: Lee AG (Hrsg.) *Biomembranes: A Multi-Volume Treatise*, 4, 123–149.
- Sjölander D, Röcken C, Westermark P, Westermark GT, Nilsson KP, Hammarström P. Establishing the fluorescent amyloid ligand h-FTAA for studying human tissues with systemic and localized amyloid. *Amyloid* 2016; 23(2): 98–108.
- Spicer BA, Law RHP, Caradoc-Davies TT, Ekkel SM, Bayly-Jones C, Pang SS, Conroy PJ, Ramm G, Radjainia M, Venugopal H, Whisstock JC, Dunstone MA. The first transmembrane region of complement component-9 acts as a brake on its self-assembly. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3266.

- Stanley KK, Herz J. Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes. *EMBO J* 1987; 6(7): 1951–1957.
- Sun Y, Kakinen A, Xing Y, Pilkington EH, Davis TP, Ke PC, Ding F. Nucleation of  $\beta$ -rich oligomers and  $\beta$ -barrels in the early aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865(2): 434–444.
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 1997; 273(3): 729–739.
- Tacnet-Delorme P, Chevallier S, Arlaud GJ. Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A $\beta$  on the C1q globular regions. *J Immunol* 2001; 167(11): 6374–6381.
- Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(10): 4299–4303.
- Treitz C, Gottwald J, Gericke E, Urban P, Meliß RR, Axmann H-D, Siebert F, Becker K, Tholey A, Röcken C. Quantitative proteome profiling provides evidence of an activation of the complement cascade in ATTR amyloidosis. *Amyloid* 2022; 29(2): 102–109.
- Tschopp J, Masson D, Stanley KK. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature* 1986; 322(6082): 831–834.
- Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Gen* 1980; 32(3): 339–347.
- Van Bockxmeer FM, Mamotte CDS. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet* 1992; 340(8824): 879–880.
- Verdone G, Corazza A, Viglino P, Pettirossi F, Giorgetti S, Mangione P, Andreola A, Stoppini M, Bellotti V, Esposito G. The solution structure of human beta2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci* 2002; 11(3): 487–499.
- Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta* 2017; 465: 123–130.
- Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, Theis JD, Bergen HR 3rd, Dogan A. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 2009; 114(24): 4957–4959.
- Walker DG, McGeer PL. Complement gene expression in human brain: comparison between normal and Alzheimer disease cases. *Brain Res Mol Brain Res* 1992; 14(1-2): 109–116.

- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(14): 1058–1066.
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 1997; 272(35): 22364–22372.
- Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet* 2016; 387(10038): 2641–2654.
- Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994; 45: 249–302.
- Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257(5): 2518–2521.
- Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E Apoprotein Heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256(17): 9077–9083.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19–50.
- Winter M, Tholey A, Kristen A, Röcken C. MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *Proteomics* 2017; 17(22): 1700236.
- Winter M, Tholey A, Krüger S, Schmidt H, Röcken C. MALDI-mass spectrometry imaging identifies vitronectin as a common constituent of amyloid deposits. *J Histochem Cytochem* 2015; 63(10): 772–779.
- Wisniewski T, Castaño EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 1994; 145(5): 1030–1035.
- Xu Q, Abdubek P, Astakhova T, Axelrod HL, Bakolitsa C, Cai X, Carlton D, Chen C, Chiu HJ, Clayton T, Das D, Deller MC, Duan L, Ellrott K, Farr CL, Feuerhelm J, Grant JC, Grzechnik A, Han GW, Jaroszewski L, Jin KK, Klock HE, Knuth MW, Kozbial P, Krishna SS, Kumar A, Lam WW, Marciano D, Miller MD, Morse AT, Nigoghossian E, Nopakun A, Okach L, Puckett C, Reyes R, Tien HJ, Trame CB, van den Bedem H, Weekes D, Wooten T, Yeh A, Zhou J, Hodgson KO, Wooley J, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA. Structure of a membrane-attack complex/perforin (MACPF) family protein from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2010; 66(Pt 10): 1297–1305.

Yoshiike Y, Kaye R, Milton SC, Takashima A, Glabe CG. Pore-forming proteins share structural and functional homology with amyloid oligomers. *Neuromolecular Med* 2007; 9(3): 270–275.

Younan ND, Viles JH. A Comparison of Three Fluorophores for the Detection of Amyloid Fibers and Prefibrillar Oligomeric Assemblies. ThT (Thioflavin T); ANS (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic Acid); and bisANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic Acid). *Biochemistry* 2015; 54(28): 4297–4306.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Modell eines Amyloidfilaments.....	2
Abbildung 2: Übersicht über die Apolipoprotein E-Isoformen.....	9
Abbildung 3: Die drei Aktivierungswege des Komplementsystems.....	11
Abbildung 4: Schema der möglichen Neurotoxizität durch A $\beta$ -Oligomere.....	17
Abbildung 5: Extrinsischer und intrinsischer Pathway der Apoptose.....	21
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung der Routinediagnostik und der vier untersuchten Proteine am Beispiel einer renalen AL $\kappa$ -Amyloidose. ....	29
Abbildung 7: Der Anteil der immungefärbten Fläche von Komplement 9, Apolipoprotein E, Caspase 3 und Komplement 3 im Verhältnis zu den Amyloidablagerungen. Darstellung entsprechend des Amyloidtyps. ....	32
Abbildung 8: Der Anteil der immungefärbten Fläche von Komplement 9, Apolipoprotein E, Caspase 3 und Komplement 3 im Verhältnis zu den Amyloidablagerungen. Darstellung entsprechend des Organ- und Gewebetyps. ....	33
Abbildung 9: Farbintensität der Immunreaktion von Komplement 9. ....	35
Abbildung 10: Farbintensität der Immunreaktion von Apolipoprotein E. ....	36
Abbildung 11: Farbintensität der Immunreaktion von Caspase 3. ....	37
Abbildung 12: Farbintensität der Immunreaktion von Komplement 3. ....	38
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines Komplement 9-immunreaktiven Kardiomyozyten umschlossen von Komplement 9-immunreaktiver ATTR-Amyloidablagerungen.....	41
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung Caspase 3-immunreaktiver Kardiomyozyten innerhalb der AL $\lambda$ -Amyloidablagerungen.....	42

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der im Menschen vorkommenden Amyloidproteine und deren Vorläuferproteine. Stand 2020.....	3
Tabelle 2: Demografische Patientendaten.....	24
Tabelle 3: Zuordnung der 118 Patientenproben nach Amyloidtyp und Organ-/Gewebeart.....	25
Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper für die Klassifikation des Amyloids und Quantifizierung der untersuchten Proteine. ....	26
Tabelle 5: Fallzahlen der positiven Immunreaktion von Apolipoprotein E, Caspase 3, Komplement 3 und Komplement 9 innerhalb der Amyloidablagerungen. Auflistung nach Amyloidtyp. ....	30
Tabelle 6: Fallzahlen der positiven Immunreaktion von Apolipoprotein E, Caspase 3, Komplement 3 und Komplement 9 innerhalb der Amyloidablagerungen. Auflistung nach Organ- und Gewebetyp. ..	31
Tabelle 7: Fallzahlen immunreaktiver Zellen, aufgelistet nach Amyloidtyp. ....	39
Tabelle 8: Fallzahlen immunreaktiver Zellen, aufgelistet nach Organ- und Gewebetyp. ....	40

### 7.3 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Annelie Lux, geboren am 13.12.1988 in Güstrow, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut anderer Autoren habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Annelie Lux

## 7.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, anfertigen zu können. Sowohl sein entgegengebrachtes Vertrauen als auch seine wertschätzende und motivierende Betreuung begleiteten mich allseits auf meinem Weg der Fertigstellung der Dissertation.

Meinen besonderen Dank möchte an dieser Stelle an Frau Sandra Krüger und dem gesamten Team des Proteinlabors und der Histopathologie aussprechen. Deren tatkräftige Unterstützung und das freundliche Entgegenkommen sorgten für eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte Herrn Dr. Hans-Michael Behrens für seine Geduld und wertvolle Zeit bei der Verarbeitung der Daten und der Anleitung zum selbstständigen Arbeiten an den technischen Geräten danken.

Juliane Gottwald danke ich für motivierende Gespräche.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken und meiner Schwester danke ich für die Bereitschaft und aufgebrauchte Zeit zum Korrekturlesen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre liebevolle Unterstützung, emotionalen Beistand und vor allem für das Verständnis und die Zeit, die die Anfertigung dieser Arbeit erforderte.

## 7.5 Publikation

September 2021

Amyloid, the journal of protein folding disorders: the official journal of the International Society of Amyloidosis, 2021 Sep; Volume 28(3):199-208

### **Complement 9 in amyloid deposits**

Annelie Lux<sup>a</sup>, Juliane Gottwald<sup>a</sup>, Hans-Michael Behrens<sup>a</sup>, Christoph Daniel<sup>b</sup>, Kerstin Amann<sup>b</sup> und Christoph Röcken<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Germany;

<sup>b</sup> Department of Nephropathology, Institute of Pathology, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany