

Jörg Kriegsmann^{1,2,3}, Rita Casadonte², Mark Kriegsmann⁴, Carolin Altmann³, Norbert Arens³

Diagnostische Möglichkeiten der molekularen Histologie für rheumatologische und orthopädische Krankheitsbilder

Diagnostic possibilities of molecular histology in rheumatology and orthopedics

Zusammenfassung: Die histopathologische Diagnostik rheumatischer und orthopädischer Krankheitsbilder wurde in den vergangenen Jahren durch immunhistochemische Methoden ergänzt. Die Einordnung der periprothetischen Membran (Abriebtyp, infektiöser Typ, Mischtyp und Indifferenztyp) wird durch Antikörper gegen CD15 (infektiöser Typ) und β -Catherin (Arthofibrose versus Indifferenztyp) unterstützt. Erweitert wird das diagnostische Spektrum durch molekularpathologische Methoden zum Nachweis bakterieller oder fungaler DNA, wobei auch die Detektion mykobakterieller Erreger und deren Resistenz möglich ist. Daneben ermöglicht die micro-RNA-Technologie die Einordnung verschiedener Autoimmunerkrankungen. Die technische Revolution in der Pathologie spiegelt sich auch in der Einführung von proteomischen Methoden, wie MALDI Imaging (matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight) und Flüssigkeits-Chromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) wider. Im folgenden Beitrag wird die Bedeutung immunhistochemischer, molekularer und proteomischer Methoden skizziert.

Schlüsselwörter: Molekularpathologie, orthopädische Pathologie, Rheumapathologie, Massenspektrometrie

Zitierweise

Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Altmann C, Arens N: Diagnostische Möglichkeiten der molekularen Histologie für rheumatologische und orthopädische Krankheitsbilder. OUP 2016; 5: 306–312 DOI 10.3238/oup.2016.0306–0312

Abstract: The histopathological diagnostics of rheumatic and orthopaedic diseases has been complemented at present by immunohistochemical methods. Differentiation of periprosthetic membranes (type with wear particles, infectious type, mixed type and indifferent type) is supported by antibodies against CD15 (infectious type) and β -Catherin (arthrofibrosis versus indifference type). Furthermore, molecular methods allow detection of bacterial and fungal DNA as well as verification of mycobacteria and their resistance. Autoimmune diseases can be specifically diagnosed by the micro-RNA pattern. Introduction of proteomic methods such as MALDI Imaging (matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight) and liquid chromatography/mass spectrometry mirrors the technical revolution in pathology. The following paper highlights immunohistochemical, molecular and proteomic methods in rheumatological and orthopaedic histopathology.

Keywords: molecular pathology, orthopaedic pathology, rheumatologic pathology, mass spectrometry

Citation

Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Altmann C, Arens N: Diagnostic possibilities of molecular histology in rheumatology and orthopedics. OUP 2016; 5: 306–312 DOI 10.3238/oup.2016.0306–0312

¹ MVZ für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik Trier

² Molekularpathologie Trier

³ Proteopath GmbH

⁴ Institut für Pathologie, Universität Heidelberg, Heidelberg

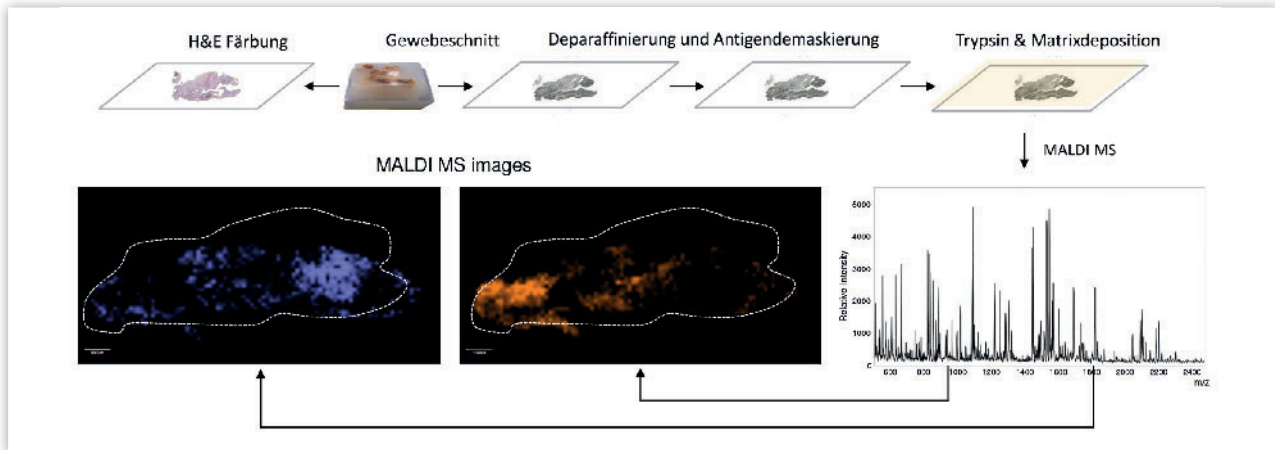


Abbildung 1 Workflow zum MALDI Profiling und MALDI Imaging. Paraffinschnitte werden auf metallisierte Objektträger aufgebracht, entparaffiniert und mit Trypsin angedaut. Die Übersichtung des Gewebes mit einer Matrix mit Kristallisierung von Peptiden ist Voraussetzung für die Generierung eines Massenspektrums durch Applikation eines Lasers und Messung von Masse-Ladungsverhältnissen (Profiling). Jedem Peak (Masse-Ladungsverhältnis) kann eine Farbe zugeordnet werden, die eine räumliche Identifizierung von Peptiden im Gewebe ermöglicht (Imaging).

Neue Methoden in der histopathologischen Diagnostik

Die histologische Diagnostik basiert auch heute auf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung), die durch basische Farbstoffe die Visualisierung von Nukleinsäuren und durch saure Farbstoffe die Visualisierung zytoplasmatischer Komponenten ermöglicht. Seit vielen Jahren wird diese Technik durch histochemische Methoden ergänzt, die sowohl Glykoproteine nachweisen (PAS-Reaktion) als auch filamentäre Strukturen (Bindegewebsbestandteile) sicher detektieren können (Goldner-Reaktion). In den letzten Jahrzehnten hat die Einführung der immunhistologischen Methoden die histopathologische Diagnostik präzisiert. Dadurch ist die Detektion spezifischer Antigene im Gewebe möglich. Die molekulare Diagnostik, der Nachweis von DNA- und RNA-Molekülen hat diese Entwicklung nochmals beschleunigt und zur exakten Diagnostik verschiedener Entitäten entscheidend beigetragen. So wurde die Diagnose eines Synovialsarkoms bis vor wenigen Jahren nur aufgrund der Morphologie unter Einschluss eines bestimmten immunhistochemischen Musters gestellt. Heute definiert eine spezifische Translokation, die mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken detektiert wird, dieses Sarkom.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA oder von RNA (nach reverser Transkription) wurde mit verschiedenen Detektions-

techniken des DNA-Produkts kombiniert. Dazu gehören neben der klassischen Sanger-Sequenzierung heute auch Hybridisierungstechniken, bei denen das PCR-Produkt entweder auf Chips oder Strips, auf vorher aufgebraute spezifische DNA-Sequenzen, hybridisiert wird. Nur bei genauer komplementärer Übereinstimmung der DNA-Stränge wird ein Signal generiert. Als komplexe Methode des DNA-Nachweises stehen heute die massive parallele Sequenzierung (next generation sequencing/NGS) und auch massenspektrometrische Techniken zur Identifizierung von DNA-Veränderungen zur Verfügung.

Da es eine Reihe molekularer Mechanismen gibt, die bei gleicher genetischer Ausgangsbasis zu verschiedenen Proteinen durch alternatives Splicing von RNA-Molekülen oder durch posttranslationale Modifizierung führen, gewinnen in der jüngsten Vergangenheit Methoden an Bedeutung, die die Identifizierung proteomischer Veränderungen ermöglichen. Auch morphologisch geprägte Pathologen sind durch den Einsatz molekularer Techniken gezwungen, auch Ergebnisse in ihre Diagnosen zu integrieren, die nach Zerstörung des Gewebes und Extraktion von DNA gewonnen wurden. Dadurch wurde die Grundlage geschaffen, dass auch Methoden Akzeptanz gewinnen können, bei denen proteomische Ergebnisse zur Diagnose beitragen.

Dabei ist die Laser-Mikrodissektion bestimmter Gewebesareale mit anschlie-

ßender Bestimmung des Proteins durch Flüssigkeits-Chromatografie/Massenspektrometrie bereits in der diagnostischen Anwendung zur Klassifizierung von Amyloidosen [1]. Daneben ist die direkte Applikation der Massenspektrometrie an Gewebsschnitten für den Morphologie-fixierten Pathologen eine ideale Ergänzung seines Methodenspektrums, da im Gegensatz zur Immunhistochemie nicht nur ein, sondern zahlreiche Proteine oder Peptide gleichzeitig detektiert werden können. Während Massenspektrometrie im „Profil-Modus“ nur den Nachweis von Molekülen erlaubt, ist die MALDI-Imaging-Technologie in der Lage, neben einer proteomischen Signatur auch eine morphologische Zuordnung zu verschiedenen Gewebekompartimenten zu ermöglichen. Der generelle Workflow wird in Abbildung 1 kurz dargestellt. Diese Verfahren wurden in die rheumatologische und orthopädische Diagnostik integriert. Im Folgenden sollen einige Anwendungsbeispiele skizziert werden.

Molekulare Methoden zur Einordnung der periprothetischen Membran

In den vergangenen Jahren wurde die histopathologische Diagnostik periprothetischer Membranen etabliert und verfeinert [2]. Es wurden 4 verschiedene Typen der periprothetischen Membran beschrieben. Die Diagnostik der periprothetischen Membran vom Abriebtyp ist

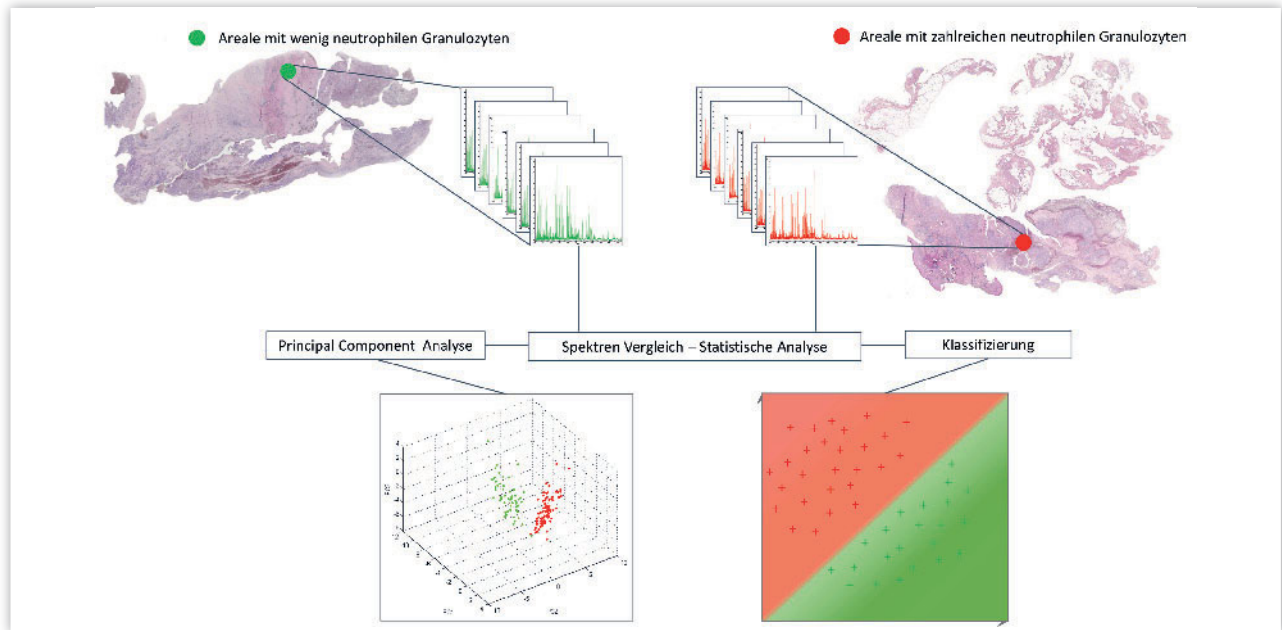


Abbildung 2 Identifizierung infizierter Gewebeareale durch Massenspektren neutrophiler Granulozyten: Die statistische Analyse von Massenspektren granulozytenreicher und granulozytenarmer Areale ermöglicht die Diagnose einer Infektion in periprothetischen Membranen.

für den Pathologen nur dann eine Herausforderung, wenn eine exakte Typisierung des Abriebmaterials gefordert wird.

Da das implantierte Prothesenmaterial bekannt ist, kann durch klinisch-pathologische Korrelation schnell ein Ergebnis erzielt werden. Auch die Diagnose des Mischtyps (Infektion und Abrieb) und des infektiösen Typs kann durch exakte Quantifizierung des Anteils neutrophiler Granulozyten (CD15-positiver Zellen) erfolgen [3]. Standard bleibt jedoch die mikrobiologische Kultur, die allerdings bei Low-grade-Infekten eine relativ lange Kulturzeit erfordert oder komplett versagen kann. Dadurch gewinnt die molekulare Diagnostik von Low-grade-Infektionen an Bedeutung.

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, die neben dem Nachweis neutrophiler Granulozyten in der Synovialflüssigkeit [4] auch die Quantifizierung dieser in der periprothetischen Membran enthalten [5]. Der Nachweis eines erhöhten Anteils neutrophiler Granulozyten in der periprothetischen Membran wird als diagnostisches Kriterium einer Infektion akzeptiert [6]. Daneben hat der molekulare Nachweis einer bakteriellen oder fungalen Infektion an Akzeptanz gewonnen. Am weitesten verbreitet ist die Amplifikation der 16S-rRNA mit anschließender Detektion des PCR-Produkts zum Nachweis bakterieller Nukleinsäuren [7]. Die

Anwendung der PCR, die auf die Detektion konservierter Regionen des mikrobiellen Genoms zielt, speziell 16S-rRNA für Bakterien und 18S-rRNA für Pilze, ist ein breiter Ansatz, um nichtkultivierbare Pathogene bei Gelenkinfektionen schnell nachzuweisen [8]. Die PCR findet klinische Anwendung auch bei der Diagnostik septischer Arthritiden, da gezeigt werden konnte, dass falsch-negative Kulturen bei bis zu einem Viertel der Patienten auftreten [7].

Ferner existieren kommerziell erhältliche, auf molekularbiologischen Methoden basierte Sepsistests, die den größten Teil des Erregerspektrums von Gelenkinfektionen und Infektionen periprothetischer Membranen abdecken. Da diese Testsysteme Propionibacterium- und Corynebacterium-Spezies nicht enthalten, sollte die Diagnostik septischer Arthritiden und periprothetischer Infektionen durch eine PCR für diese Erreger ergänzt werden, wenn nicht primär eine Detektion der 16S-rRNA erfolgte [9, 10].

Einerseits haben sich bisher molekularpathologische Methoden trotz der höheren Sensitivität gegenüber mikrobiologischen Verfahren nicht in der Routinediagnostik durchgesetzt, da die Spezifität häufig ein Problem darstellt, andererseits haben zahlreiche Studien gezeigt, dass bei der mikrobiologischen Bakterienkul-

tur gleichartige Probleme auftreten können [11].

So haben Untersuchungen zur PCR-Detektion ergeben, dass diese Methode eine Sensitivität von 71 % (Kultur 44 %) und eine Spezifität von 97 % (Kultur 94 %) aufweist und damit der Kultur überlegen ist. Trotz des Vorwurfs einer Detektion falsch-positiver Befunde zeigt sich, dass bei exakter Anwendung der modernen Methoden auch der negative und positive prädiktive Wert den der Kultur deutlich übersteigt [4].

Neben Techniken, die auf dem Nachweis von DNA und RNA beruhen, ist es auch möglich, periprothetische Infektionen durch proteomische Methoden zu detektieren [12]. Zunächst wurde ein Modell entwickelt, welches zwischen Arealen mit zahlreichen neutrophilen Granulozyten und solchen mit wenigen oder keinen neutrophilen Granulozyten unterscheiden kann (Abb. 2). Anschließend wurden den infizierten (granulozytenreichen Arealen) bestimmte Farben zugewiesen, die mehrere infektionsassoziierte Peaks zusammenschließen und als Summenpeak Indikator einer Infektion sind. Diesen Summenpeaks wurden bestimmte Farbkodierungen zugewiesen, die eine schnelle und zuverlässige Erkennung infizierter Areale ermöglichen (Abb. 3). Wir konnten zeigen, dass Proteine neutrophiler Granula (Calgranuline) mittels Mas-

senspektrometrie (MALDI-Imaging) in der Synovialmembran nachweisbar sind [13]. Durch Standardisierung könnten so molekulare Signaturen entwickelt werden, die die Diagnose einer periprothetischen Infektion erlauben. Mit der Erhöhung der Massengenauigkeit sollte es in Zukunft auch möglich sein, eine Erreger-typisierung im Gewebe durch diese Techniken vorzunehmen.

Molekulare Diagnostik granulomatöser Synovialitiden

Die Diagnose einer granulomatösen Synovialitis kann histomorphologisch gestellt werden. Diese beinhaltet verschiedene Entitäten, wie die tuberkulöse Synovialitis, die Sarkoidose, granulomatöse Reaktionen im Rahmen von Pilzinfektionen, aber auch Fremdkörpergranulome [14]. Die moderne molekulare Diagnostik ist geeignet, mykobakterielle Infektionen im Gewebe nachzuweisen und den Erreger zu identifizieren. Der DNA-Isolierung folgt eine PCR, deren Produkt entweder durch Sequenzierung, oder durch Strip- und Chip-Techniken (Hybridisierung) detektiert werden kann. Diese Techniken sind zum einen sehr sensitiv, zum anderen hochspezifisch. Mykotische Infektionen können im Gewebe mittels histochemischer Techniken (PAS oder Grocott-Reaktion) diagnostiziert werden. Die definitive Einordnung kann heute aus Synovialflüssigkeit oder synovialen Gewebe durch molekulare Techniken erfolgen.

Diagnose sogenannter unspezifischer Oligoarthritis

Reaktive Arthritis sind entzündliche Gelenkerkrankungen, die durch eine genetische Suszeptibilität (HLA-B27) des menschlichen Wirtes begünstigt werden und Tage oder Wochen nach einer gelenkfernen Infektion in einem oder mehreren Gelenken auftreten, ohne dass sich der auslösende Erreger aus der Synovialflüssigkeit oder aus der Synovialmembran anzüchten lässt [15]. Es treten 2 Typen bezüglich der Primärinfektion auf, der post-venerische und der post-enterische Typ. Während zu den enterischen Erregern, die Arthritis triggern, Salmonellen, Shigellen, Campylobacter und Yersinien zählen, sind Chlamydien

der definitive Auslöser des postvenerischen Typs [16]. Letztgenannte Autoren konnten zeigen, dass 50 % aller reaktiven Arthritis nach einer genitalen Infektion durch *C. trachomatis* und 12 % nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* auftraten. Oligoarthritis (1–4 Gelenke sind betroffen) werden in der Klinik immer wieder als undifferenzierte Oligoarthritis eingeordnet. Mit molekularbiologischen Methoden kann hier in einem großen Teil der Fälle jedoch eine Chlamydieninfektion nachgewiesen werden. Wir konnten Chlamydien-DNA nicht nur bei Patienten mit high-grade Synovialitis (Synovialitis-Score: > 4) sondern auch bei Patienten mit low-grade Synovialitis (Synovialitis-Score: < 4) detektieren. Aus diesem Grund kann auch der Einsatz molekularpathologischer Methoden in diesen Fällen sinnvoll sein. Ebenso sind Testsysteme erhältlich, die eine molekulare Testung der krankheitsrelevanten HLA-B27-Subtypen erlauben.

Allerdings sind Patienten mit Rheumatoid-Arthritis, Morbus Reiter, Psoriasis-Arthritis und juveniler Arthritis mit Entesitis ebenfalls vermehrt HLA-B27 positiv [17].

Enteropathische Arthritis treten in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) auf. Einige Untersucher denken, dass die langandauernde Entzündung des Darmtrakts diesen so schädigt, dass neben Lymphozyten intrazellulär persistierende Bakterien in Makrophagen zu den Gelenken gelangen und dort eine immunologisch-getriggerte Antwort auslösen [18]. Bezüglich einer molekularen Diagnostik im Gelenk existieren keine gesicherten Daten. Anders dagegen beim Morbus Whipple, der ebenfalls als enteropathische Arthritis eingeordnet werden kann. Die Diagnose der Whipple Arthritis ist durch molekulare Analyse mittels PCR aus der Synovialflüssigkeit oder der Synovialmembran möglich [19].

Eine retrospektive Analyse bei 673 Kindern mit Kniemonarthritis zeigte, dass 19 % der Kinder septische Arthritis, 51 % Lyme-Arthritis und 46 % andere Arthritis aufwiesen [20]. Somit kann eine molekulare Untersuchung, die sowohl Sepsiserreger als auch Borrelien einschließt, bei 70 % der Patienten zu einer exakten Diagnose der Monarthritis führen. Die PCR in der Synovialflüssigkeit ist als Test zur Erhöhung der

diagnostischen Sicherheit anerkannt [21]. Da der serologische Nachweis einer Borreliose erst mit Verzögerung möglich ist, spielen molekulare Techniken zunehmend eine Rolle, wobei auch der Erregernachweis in der Synovia und Synovialis möglich ist [22].

Molekulare Methodenzur Differenzialdiagnose Arthrose versus Rheumatoidarthritis

Die diagnostischen Kriterien für eine Rheumatoidarthritis (ACR-Kriterien) und für eine Arthrose sind bekannt und basieren im Wesentlichen auf klinischen Parametern, lediglich ergänzt durch serologische Marker [23, 24].

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Arbeiten publiziert, die zumindest ergänzende diagnostische Möglichkeiten beschrieben, welche die Diagnose entsprechender Krankheitsbilder objektivieren können. Auch histopathologische und molekulare Methoden können bei adäquatem Einsatz sowohl zur Diagnose als auch zum ätiopathogenetischem Verständnis rheumatologischer Krankheitsbilder beitragen. Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wurden micro-RNAs detektiert, die in Regulationsmechanismen eingreifen, die aber auch diagnostische und therapeutische Optionen beinhalten. Unterschiedliche micro-RNA-Muster wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen und bei der Rheumatoidarthritis beschrieben [25]. Wir konnten zeigen, dass am Formalin-fixiertem Routinematerial micro-RNA's effizient isoliert werden können, und dass ein Muster der Erhöhung der micro-RNA's miR-146a, miR-155 und miR-223 zur Abgrenzung der Rheumatoid-Arthritis von anderen Synovialitiden beitragen kann. Vergleicht man das micro-RNA-Muster eines Patienten mit Rheumatoidarthritis oder mit Arthrose mit einem Pool von micro-RNAs von Patienten der entsprechenden Diagnosegruppen, kann eine sehr sichere Unterscheidung zwischen Rheumatoidarthritis und Arthrose an der Synovialmembran getroffen werden. Diese Einordnung wird durch ein entsprechendes morphologisches Bild mit erhöhtem Synovialitis-Score unterstützt [26].

In Synovialmembranen von Patienten mit Rheumatoid-Arthritis sind häufig neutrophile Granulozyten vorhanden.

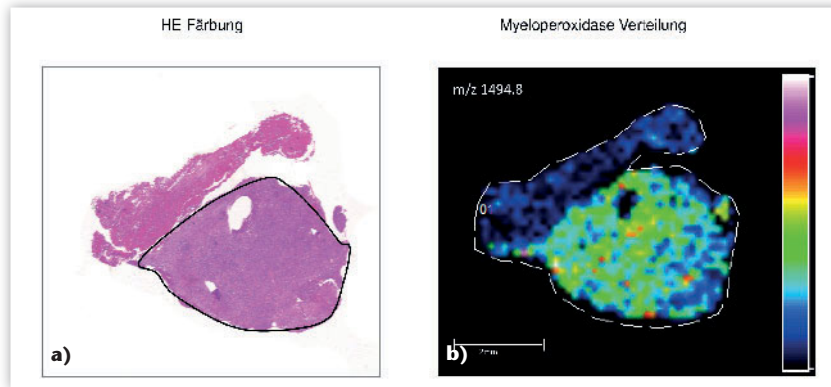


Abbildung 3a–b Bildgebende Massenspektrometrie einer periprotetischer Membran vom infektiösen Typ durch Detektion von Masse-Ladungsverhältnissen granulozytenspezifischer Myeloperoxidase: **a)** oben (blau) ein nicht-infiziertes Areal. **b)** unten (grün) ein infiziertes Areal mit zahlreichen Myeloperoxidase-Peaks.

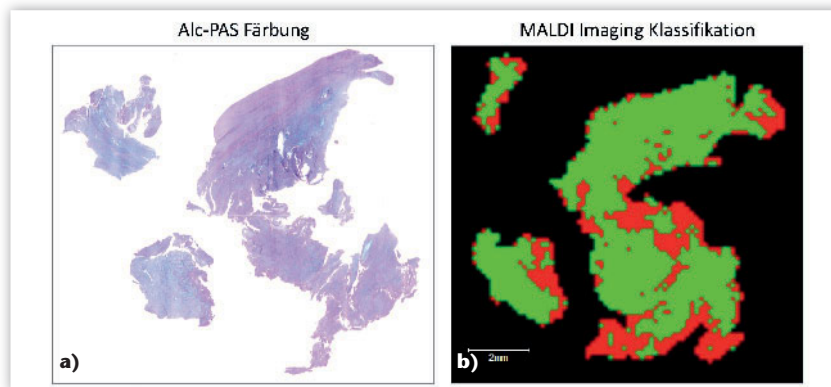


Abbildung 4a–b Bildgebende Massenspektrometrie zum Ausmaß der Degeneration von Menisken: **a)** alcianophile Areale (blau) sind histochemisches Korrelat degenerativer Veränderungen. **b)** Summenspektren gering degenerierter/normaler (grün) und schwer degenerierter (rot) Meniskusareale.

Diese sind zum einen im Randgebiet fibrinoider Nekrosen lokalisiert, zum anderen aber auch im synovialen Stroma. Während der Nachweis neutrophiler Granulozyten im Randgebiet fibrinoider Nekrosen kein morphologisches Korrelat einer Infektion ist, kann ein erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in Synovialmembranen von Patienten mit Rheumatoid-Arthritis sowohl Ausdruck einer erhöhten entzündlichen Aktivität sein als auch auf eine Infektion hinweisen. Wenn allerdings keine Rheumatoid-Arthritis vorliegt, spricht der Nachweis neutrophiler Granulozyten für eine Infektion.

Die Kombination beider molekularer Techniken (micro-RNA-Technologie zur Unterstützung der Diagnose einer Rheumatoid-Arthritis- und PCR speziell 16S-rRNA für Bakterien und 18S-rRNA für Pilze) kann in schwierigen Fällen oder bei nicht eindeutigem mikrobiologischem

Ergebnis, oder in Fällen in denen das morphologische Bild nicht eindeutig ist, zur Diagnose beitragen.

Daneben konnten wir zeigen, dass auch MALDI-Profilung oder Imaging in der Lage sind, aufgrund des Proteinmusters beide Krankheitsbilder (Arthrose versus Rheumatoidarthritis) zu unterscheiden [13].

Histopathologische Beurteilung von Meniskuspräparaten

In der diagnostischen Bewertung von Meniskusläsionen ist der Pathologe gefordert, zum Ausmaß der Degeneration Stellung zu nehmen und die Frage zu beantworten, inwieweit morphologische Zeichen einer akuten oder länger zurückliegenden Rissbildung vorliegen. Die Beantwortung dieser Fragen hängt

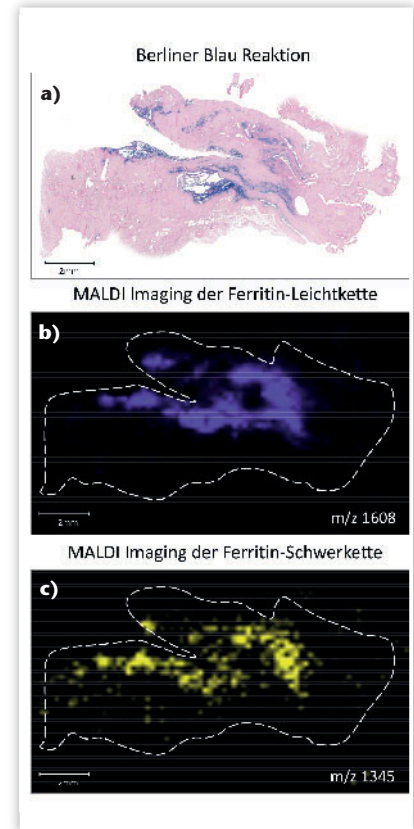


Abbildung 5a–c Bildgebende Massenspektrometrie zum Nachweis von Ferritin. **a)** Berliner Blau Reaktion zum Nachweis von Hämosiderinablagerungen in synovialen Gewebe. **b–c)** Nachweis der Ferritin Leicht- und Schwerketten, die massenspektrometrisches Korrelat der oben dargestellten Hämosiderinablagerungen sind.

zum einen von der Erfahrung des Untersuchers ab, zum anderen muss der morphologische Befund eng mit klinischen Daten korreliert werden. Junge Menschen haben physiologisch weniger degenerative Veränderungen als ältere. Ein bestimmtes Ausmaß an Degeneration kann somit in einem höheren Lebensalter als physiologisch angesehen werden, während bei jungen Menschen ein gleichartiger Befund als Degeneration eingeordnet werden kann. Wir haben versucht, durch Massenspektrometrie die Erhebung der Daten zur Degeneration und zur Frage akute oder zurückliegende Rissbildung zu objektivieren [27].

Dazu wurden Meniskusproben mit der Konsensusdiagnose einer schweren Degeneration mittels MALDI-Imaging untersucht. Es konnten zahlreiche Masse/Ladungsverhältnisse und damit Peptide ermittelt werden, die nur in Menisken mit

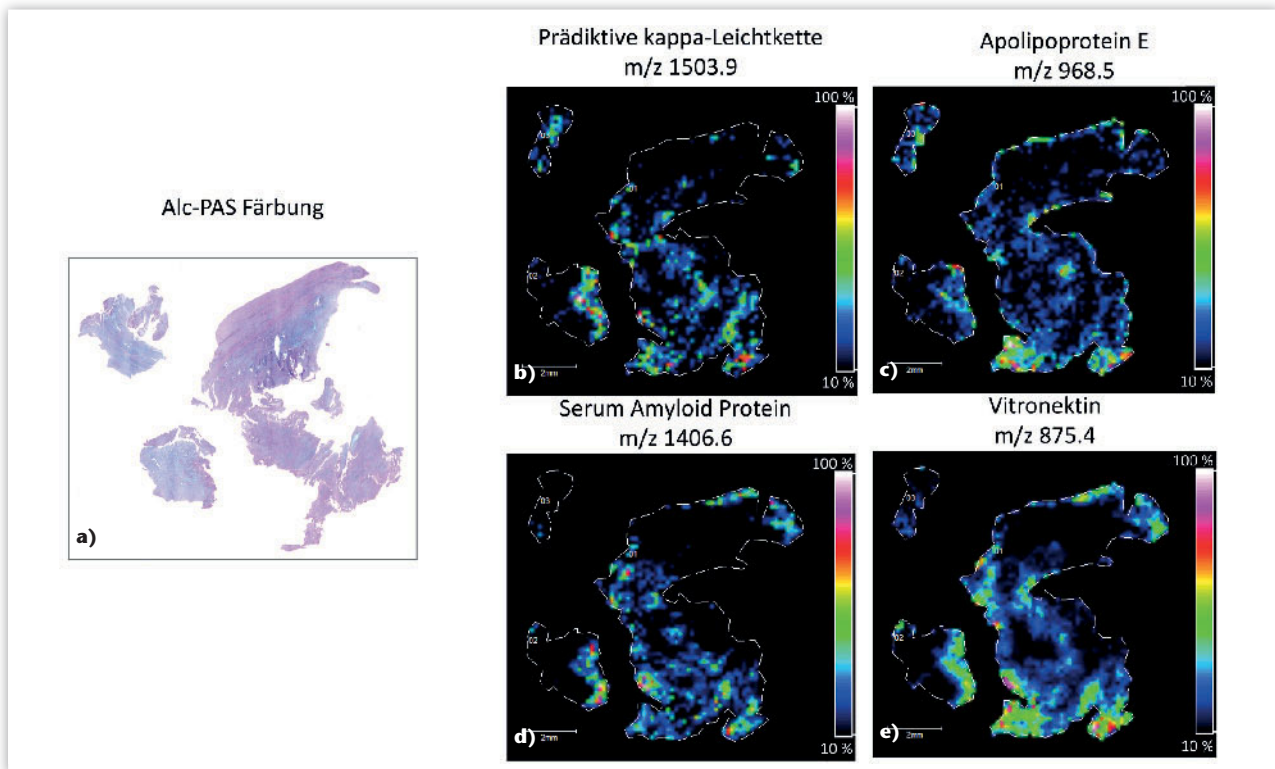


Abbildung 6a–e Bildgebende Massenspektrometrie von Leichtketten Amyloidablagerungen sowie assoziierter Proteine (Apoprotein E, Serum Amyloid P und Vitronectin). **a)** alcianophile Areale (blau) charakterisieren histochemisch degenerierte Areale. **b)** MALDI Imaging von Leichtkettenamyloid. In den gleichen Arealen sind **c)** Apolipoprotein E, **d)** Serum Amyloid P und **e)** Vitronectin nachzuweisen (grün).

schwerer Degeneration auftreten. Umgekehrt waren auch proteomische Muster vorhanden, die ein intaktes, nicht degenerativ verändertes Meniskusgewebe kennzeichnen. Den Summenspektren wurde in den Schnittpräparaten eine Farbe für schwere Degeneration und eine Farbe für nicht veränderte „gesunde“ Menisken zugeordnet (Abb. 4).

Mit der gleichen Technik wurden akute und chronische Rissbildungen untersucht, auch hier wurden spektrale Muster ermittelt, die nur bei akuten Rissbildungen auftreten und solche, die nur bei chronischen Rissbildungen auftreten. Die objektivierte Diagnostik von Meniskusveränderungen hilft dem Pathologen bei der exakten Einordnung der Meniskusläsionen, wenn er zu Veränderungen des Meniskus im Rahmen von Gutachten bezüglich berufsgenossenschaftlicher Fragen Stellung nehmen muss. Eine exakte klinisch-pathologische Korrelation ist jedoch Grundlage jeder suffizienten Stellungnahme.

Bezüglich der Bedeutung von Amyloidablagerungen, die im Meniskus im Verlauf des Lebens zunehmen, besteht keine Einigkeit, jedoch wurden in den ver-

gangenen Jahren Arbeiten publiziert, die zeigen, dass zwischen Amyloidablagerung und Degeneration ein enger Zusammenhang besteht. Während in einer älteren Studie an Menisken, die bei der Obduktion entnommen wurden, keine Korrelation zwischen arthrotischen Veränderungen und Amyloiddeposition nachgewiesen werden konnte [28], setzt sich heute die Erkenntnis durch, dass die Arthrose mit verschiedenen Arten von Amyloidablagerungen im Meniskus assoziiert ist [29]. Diese amyloidogenen Proteine stellen Transthyretin und Apolipoprotein A-I dar. Während die Häufigkeit von Transthyretin-Amyloidablagerungen mit dem Alter zunahm, war die von Apolipoprotein A-I reduziert.

Erste Untersuchungen am Meniskus zum massenspektrometrischen Nachweis von Amyloid (Apolipoprotein A-I) wurden 2006 von Solomon et al. publiziert [30]. Wir konnten mittels MALDI-Imaging bestätigen, dass verschiedene Proteine, wie Vitronectin und Apoprotein A-I immer mit Amyloidablagerungen assoziiert auftreten [31]. In zahlreichen Arbeiten wird der Nachweis von Hämosiderinablagerungen im Meniskusgewebe als morphologi-

sches Korrelat eines schweren Traumas angesehen. Deshalb gehört die Berliner Blau-Reaktion zum diagnostischen Routinepanel zur Beurteilung von Meniskusläsionen. Wir konnten zeigen, dass Hämosiderinablagerungen Ferritinketten enthalten, die ebenso massenspektrometrisch mittels MALDI-Imaging sicher detektiert werden können (Abb. 5) [32].

Die Untersuchung und Objektivierung von Degeneration und Rissbildungen ist ebenso wie der Nachweis von Amyloidablagerungen einschließlich der beschriebenen Proteine mittels MALDI-Imaging auch an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Routinematerial möglich (Abb. 6). Wir haben die Kriterien zur Erstellung eines objektivierte Meniskusbefunds ausführlich beschrieben [27].

Neben der Immunhistochemie sind molekulare Methoden zum RNA- und DNA-Nachweis in die diagnostische Histopathologie rheumatologischer und orthopädischer Krankheitsbilder integriert worden. Neueste Entwicklungen sind proteomische Methoden wie Flüssigkeitschromatografie/ Massenspektrometrie oder MALDI-Imaging-Technik.

niken. Letztgenannte Methode erlaubt nicht nur die Gewinnung eines Massenspektrums und damit die Detektion zahlreicher Moleküle, sondern auch deren räumliche Zuordnung im Gewebe und stellt damit eine Methode der Zu-

kunft der histopathologischen Diagnostik dar.

OUP

Interessenkonflikt: Proteopath wurde durch Bruker Daltonik GmbH und SciLS Lab unterstützt.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Dr. phil. Jörg Kriegsmann
 Wissenschaftspark Trier
 Max-Planck-Straße 5
 54296 Trier
 kriegsmann@patho-trier.de

Literatur

- Sethi S, Vrana JA, Theis JD et al.: Laser microdissection and mass spectrometry-based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney international* 2012; 82: 226–34
- Krenn V, Morawietz L, Perino G, et al.: Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathology, research and practice* 2014; 210: 779–86
- Kolbel B, Wienert S, Dimitriadis J et al.: [CD15 focus score for diagnostics of periprosthetic joint infections: Neutrophilic granulocytes quantification mode and the development of morphometric software (CD15 quantifier)]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2015; 74: 622–30
- Gallo J, Kolar M, Dendis M et al.: Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *The new microbiologica* 2008; 31: 97–104
- Kriegsmann J, Hopf T, Jacobs D et al.: [Applications of molecular pathology in the diagnosis of joint infections]. *Der Orthopäde* 2009; 38: 531–8
- Zmistowski B, Della Valle C, Bauer TW et al.: Diagnosis of periprosthetic joint infection. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 2014; 32 Suppl 1: S98–107
- Rosey AL, Abachin E, Quesnes G et al.: Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. *Journal of microbiological methods* 2007; 68: 88–93
- Grif K, Heller I, Prodingner WM, Lechleitner K, Lass-Florl C, Orth D: Improvement of detection of bacterial pathogens in normally sterile body sites with a focus on orthopedic samples by use of a commercial 16S rRNA broad-range PCR and sequence analysis. *Journal of clinical microbiology* 2012; 50: 2250–4
- Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Patel R: Corynebacterium prosthetic joint infection. *Journal of clinical microbiology* 2012; 50: 1518–23
- Levy O, Iyer S, Atoun E et al.: Propionibacterium acnes: an underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis? *Journal of shoulder and elbow surgery/American Shoulder and Elbow Surgeons [et al.]* 2013; 22: 505–11
- Birmingham P, Helm JM, Manner PA, Tuan RS: Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2008; 90: 602–8
- Gravivan S, Randau TM, Casadonte R, Kriegsmann M, Friedrich MJ, Kriegsmann J: Investigation of neutrophilic peptides in periprosthetic tissue by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight imaging mass spectrometry. *International orthopaedics* 2015; 39: 559–67
- Kriegsmann M, Seeley EH, Schwarting A et al.: MALDI MS imaging as a powerful tool for investigating synovial tissue. *Scandinavian journal of rheumatology* 2012; 41: 305–9
- Knoss P, Knoss M, Otto M, Kriegsmann J, Krukemeyer MG, Krenn V: [Diagnostic spectrum of synovitis]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2008; 67: 8, 10–4, 6
- Townes JM: Reactive arthritis after enteric infections in the United States: the problem of definition. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2010; 50: 247–54
- Carter JD, Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP: The molecular basis for disease phenotype in chronic Chlamydia-induced arthritis. *International journal of clinical rheumatology* 2012; 7: 627–40
- Bowness P: HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? *Rheumatology* 2002; 41: 857–68
- Peluso R, Di Minno MN, Iervolino S et al.: Enteropathic spondyloarthritis: from diagnosis to treatment. *Clinical & developmental immunology*. 2013; 2013: 631408
- Jalava J, Skurnik M, Toivanen A, Toivanen P, Eerola E: Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Annals of the rheumatic diseases* 2001; 60: 287–9
- Deanehan JK, Kimia AA, Tan Tanny SP et al.: Distinguishing Lyme from septic knee monoarthritis in Lyme disease-endemic areas. *Pediatrics* 2013; 131: e695–701
- Gaubitz M, Dressler F, Huppertz HI, Krause A: Kommission Pharmakotherapie der D. [Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. Recommendations of the Pharmacotherapy Commission of the Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (German Society for Rheumatology)]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2014; 73: 469–74
- Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC: Detection of Borrelia burgdorferi DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *The New England journal of medicine* 1994; 330: 229–34
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al.: 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*. 2010; 62: 2569–81
- Altman RD. The classification of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1995; 43: 42–3
- Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S: MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2012; 26: 131–41
- Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Haupl T: [Synovialitis score: histopathological grading system for chronic rheumatic and non-rheumatic synovialitis]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2005; 64: 334–42
- Petzold J, Casadonte R, Otto M et al.: [MALDI mass spectrometry of the meniscus. Objectification of morphological findings]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2015; 74: 438–46
- Ladefoged C: Amyloid deposits in the knee joint at autopsy. *Annals of the rheumatic diseases* 1986; 45: 668–72
- Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T et al.: Knee osteoarthritis associated with different kinds of amyloid deposits and the impact of aging on type of amyloid. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2016; 23: 26–32
- Solomon A, Murphy CL, Kestler D et al.: Amyloid contained in the knee joint meniscus is formed from apolipoprotein A-I. *Arthritis and rheumatism* 2006; 54: 3545–50
- Casadonte R, Kriegsmann M, Deininger SO et al. Imaging mass spectrometry analysis of renal amyloidosis biopsies reveals protein co-localization with amyloid deposits. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015; 407: 5323–31
- Kriegsmann M, Casadonte R, Randau T et al. MALDI imaging of predictive ferritin, fibrinogen and proteases in haemophilic arthropathy. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2014; 20: 446–53