

Aus der Klinik für Innere Medizin I,
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Pfreundschuh

Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei ausgewählten hämatologischen Neoplasien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:

Yin Yang

geb. am: 18.06.1987 in Worms

Tag der Promotion:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	3
1.1 Deutsche Zusammenfassung	3
1.2 Abstract.....	4
2 EINLEITUNG	5
2.1 Definition und Klinik der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz	5
2.2 Definition und Klinik des Multiplen Myeloms	6
2.3 Ätiologie und Pathogenese von MGUS und Multiplem Myelom	7
2.4 M. Waldenström	9
2.5 Aktuelle Forschungslage zu hyperphosphoryliertem Paratarg-7.....	10
2.6 Übersicht von Definition, Klinik und Ätiologie der untersuchten Tumoren.....	14
2.6.1 Hodgkin Lymphom.....	14
2.6.2 Non-Hodgkin-Lymphome.....	16
2.6.3 CML.....	17
2.6.4 Akute Leukämien.....	18
2.7 Zielsetzung der Arbeit	20
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Patienten und Proben	21
3.2 Lösungen.....	21
3.3 Material und Reagenzien	23

3.4	Geräte.....	25
3.5	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	26
3.5.1	Prinzip des ELISA	26
3.5.2	Durchführung des indirekten ELISA zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7.....	27
3.5.3	Durchführung des ELISA des anti-Paratarg-7.....	29
3.6	Isoelektrische Fokussierung.....	29
3.6.1	Prinzip der isoelektrischen Fokussierung und des Western Blot.....	29
3.6.2	Durchführung der isoelektrischen Fokussierung.....	30
4	ERGEBNISSE	32
5	DISKUSSION	41
6	ANHANG	46
6.1	Abbildungsverzeichnis	46
6.2	Literaturverzeichnis	47
7	DANKSAGUNG.....	66
8	LEBENS LAUF	67

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BMI	Body mass index
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FLC	free light chains
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin/e
M.	Morbus
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
M-Protein	Monoklonales Protein
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
P-7	Paratarg-7
pP-7	hyperphosphoryliertes Paratarg-7
PBS	phosphate-buffered saline
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SEREX	serological identification of antigens by cDNA expression cloning

Abkürzungsverzeichnis

SLP	Stomatin-like-protein
SMM	Smouldering Myeloma
TBS	TRIS-bufferd saline
WHO	World Health Organization

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), das Multiple Myelom und M. Waldenström sind maligne Erkrankungen der B-Zellreihe, deren Ätiologie nicht geklärt ist.

Diskutiert wird unter anderem, ob eine chronische Antigenstimulation der Pathogenese dieser Erkrankungen ursächlich zu Grunde liegt. Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 konnte als Zielprotein der klonalen Immunglobuline bei Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz, Multiplem Myelom und M. Waldenström identifiziert werden, das dominant vererbt wird, und dessen Expression mit einem signifikant erhöhten Risiko an MGUS, Multiplem Myelom oder M. Waldenström zu erkranken einhergeht.

Auch bei anderen hämatologischen Neoplasien bestehen Anhaltspunkte, dass eine chronische Antigenstimulation an der Pathogenese beteiligt sein kann. In dieser Arbeit wurden Patienten mit hämatologischen Tumoren, hierunter Hodgkin-Lymphom, follikulärem Lymphom, CLL, CML und AML, auf Trägerschaft des hyperphosphorylierten Paratarg-7 untersucht. Zudem wurden Patienten mit ALL und weiteren hämatologischen Erkrankungen überprüft. Bei keiner der untersuchten Gruppen zeigte sich ein im Vergleich zu gesunden Kontrollen verstärktes Auftreten von hyperphosphoryliertem Paratarg-7, wie dies bei MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström feststellbar war. Bei Patienten mit ALL und Polycythämia war die Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 höher als bei gesunden Kontrollen ohne signifikante Unterschiede. Aufgrund des geringen Probenumfangs kann dieses Ergebnis auch als Zufall bewertet werden.

Somit ist zum jetzigen Zeitpunkt davon auszugehen, dass die hohe Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 spezifisch bei Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström vorzufinden ist und die Hyperphosphorylierung von Autoantigenen als ein wichtiger Faktor in der Ätiologie dieser Erkrankungen anzusehen ist.

1.2 Abstract

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia are malignancies of the B cell lineage of unknown etiology.

Among others, chronic antigenic stimulation is discussed as a factor underlying the pathogenesis of these diseases. Hyperphosphorylated Paratarg-7 is a target protein of clonal immunoglobulins identified in patients with MGUS, multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia which is inherited dominantly and its expression denotes a significantly higher risk of being affected by MGUS, multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia.

There is evidence that chronic antigenic stimulation is involved in pathogenesis of other hematologic neoplasms as well. In this study, patients with other hematologic tumors, including Hodgkin lymphoma, follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia and acute myeloid leukemia were tested for expression of hyperphosphorylated paratarg-7. In addition, patients with acute lymphoblastic leukemia and other hematologic disorders were also examined. None of the groups revealed the high frequency of hyperphosphorylated paratarg-7 as reported for patients with MGUS, multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia. In the ALL and polycythaemia vera group the prevalence of hyperphosphorylated paratarg-7 was higher than in healthy controls without any significant differences. Due to small sample size, this finding may be regarded as coincidence.

At present, it can be proposed that prevalence of hyperphosphorylated paratarg-7 is increased exclusively in patients with MGUS, multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia and that hyperphosphorylation of autoantigens is an important factor in the etiology of these diseases.

2 Einleitung

2.1 Definition und Klinik der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz

Als monoklonale Gammopathie wird das Vorhandensein von Immunglobulinen im Plasma definiert, die von einem B-Zell-Klon stammen (Kyle, 1978). Diese klonalen Immunglobuline werden auch als M-Protein oder Paraproteine bezeichnet.

Die International Myeloma Working Group definiert die MGUS als eine Erkrankung, die folgende Bedingungen erfüllt:

- eine Erhöhung monoklonaler Proteine im Serum auf unter 30 g/l
- weniger als 10 % Plasmazellen im Knochenmark

Die Diagnose kann gestellt werden, sobald der Ausschluss eines Multiplen Myeloms oder anderen proliferativen Erkrankungen der B-Zellen wie Morbus Waldenström (M. Waldenström), Amyloidose sowie lymphoproliferativen Erkrankungen erfolgt ist (International Myeloma Working Group, 2003).

Auch das asymptomatische Myelom (*smouldering multiple myeloma*) (SMM) ist durch das Fehlen eines Endorganschadens gekennzeichnet, sobald mindestens 1 weiteres Kriterium zutreffend ist (International Myeloma Working Group, 2003):

- Der M-Protein Anteil beträgt mindestens 30 g/l
- Es findet sich ein Anstieg an klonalen Plasmazellen im Knochenmark auf mindestens 10 %

Die Prävalenz der MGUS liegt bei etwa 3 % im 6. Lebensjahrzent und über 5 % bei Personen im 8. Dezennium (Eisele et al., 2012; Kyle et al., 2006).

Der Begriff der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS = monoclonal gammopathy of undetermined significance) wurde 1978 von Kyle anstelle der vorher geläufigen Bezeichnung „benigne Gammopathie“ aufgrund des zweifelhaften benignen Verlaufs eingeführt (Kyle, 1978). Vielmehr handelt es sich bei der MGUS um ein prämalignes Zustandsbild, deren Vorliegen das Risiko für die Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen erhöht. Das durchschnittliche Risiko an Multiplem

Myelom oder anderen verwandten Erkrankungen im Rahmen der MGUS zu erkranken, beträgt etwa 1 % pro Jahr (Kyle et al., 2002). In 80 % bis 100 % der Fälle geht eine MGUS einem Multiplen Myelom mit steigender Häufigkeit um den Erkrankungsbeginn, mindestens aber 2 Jahre vor Manifestation des Multiplen Myeloms voraus (Landgren et al., 2009).

Serumelektrophorese und Immunfixation ermöglichen die Detektion und die Zuordnung der synthetisierten Paraproteine zu Immunglobulinklassen (International Myeloma Working Group, 2003), sodass MGUS vom IgM-, IgG- und IgA-Typ sowie MGUS vom Leichkettentyp (*light-chain* MGUS = LC-MGUS) unterschieden werden können. Je nach Literatur wird die Verteilung der IgG MGUS mit 55-76,5 % beschrieben, IgM MGUS 14-32 % und die Häufigkeit von MGUS vom IgA-Typ auf 7,1-13 % beziffert (Kyle, 1993; Ogmundsdottir et al., 2002; Schaar et al., 2009). Die Häufigkeit der LC-MGUS wird auf 19 % geschätzt und betrifft etwa 0,8 % der über 50-jährigen Kaukasier (Dispenzieri et al., 2010). Die Progression wird maßgeblich durch Menge und Typ der monoklonalen Paraproteine beeinflusst, wobei sich die Risikozunahme steigend zur M-Protein Konzentration im Serum zum Zeitpunkt der Diagnose verhält (Kyle et al., 2003a; Schaar et al., 2009). IgA und IgM MGUS sind mit einem höheren Risiko einer malignen Transformation behaftet als IgG MGUS (Kyle et al., 2002).

Für MGUS vom IgM-Typ konnte ein deutlich erhöhtes Risiko, im Vergleich zur gesunden weißen US-Normalbevölkerung, an M. Waldenström zu erkranken gezeigt werden. Auch für Lymphome, Leichtketten-Amyloidose (AL-Amyloidose) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL) vervielfacht sich das Risiko für Betroffene (Kyle et al., 2003a). Bei IgG und IgA MGUS besteht ein gesteigertes Risiko, an Multiplem Myelom und akuter myeloischer Leukämie zu erkranken (Mailankody et al., 2011).

2.2 Definition und Klinik des Multiplen Myeloms

Das Multiple Myelom, auch M. Kahler nach dem Beschreiber Otto Kahler (1849-1893) benannt (Kyle, 2000), stellt 1 % aller malignen Neoplasien und 15 % aller hämatologischen malignen Erkrankungen mit einer jährlichen Inzidenz von 4:100 000 (Blade et al., 2010).

In Abgrenzung zur monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz ist für das Vorliegen eines Multiplen Myeloms der Nachweis eines Endorganschadens, wie Anämie, Hyperkalzämie, Osteopenie und Osteolysen mit pathologischen Frakturen, Niereninsuffizienz

durch Anstieg der klonalen Immunglobuline, Hyperviskosität, Amyloidose oder Infektanfälligkeit notwendig. Der Hauptsymptomkomplex wird unter CRAB (erhöhtes Serum-Calcium, renale Insuffizienz, Anämie, Läsionen des Knochens (*bone lesions*)) zusammengefasst (International Myeloma Working Group, 2003; Kyle et al., 2003a). Die Abgrenzung zur MGUS gelingt weiterhin durch Quantifizierung der M-Protein-Konzentration im Serum sowie durch Nachweis einer Infiltration des Knochenmarks durch Plasmazellklone, wobei durch die International Myeloma Working Group keine untere Grenze festgelegt wurde. In 50 % der Fälle entsprechen die Paraproteine dem IgG-Typ, 20 % dem IgA-Typ und weitere 20 % dem Leichtkettentyp. Eine Ausnahme bildet die bei etwa 3 % der Myelompatienten auftretende asekretorische Variante des Multiplen Myeloms, die durch das Fehlen von Paraproteinen in Serum und Urin gekennzeichnet ist.

Klinische Anzeichen eines Multiplen Myeloms können Infektanfälligkeit, Abgeschlagenheit und Knochenschmerzen sein (International Myeloma Working Group, 2003). Indikationen für einen Therapiebeginn ist das Vorhandensein oder Auftreten eines der CRAB-Kriterien. Obwohl sich die Prognose des Multiplen Myeloms in der letzten Dekade signifikant gebessert hat, unter anderem durch die Einführung einer hochdosierten Melphalan-Therapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation, ist eine Heilung nur in Ausnahmefällen, möglich.

2.3 Ätiologie und Pathogenese von MGUS und Multiplem Myelom

Die Ätiologie der MGUS und des Multiplen Myeloms ist nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass das Zusammenspiel mehrerer Faktoren aus Umwelt und Immunologie sowie sequenzielle Veränderungen auf genetischer Ebene die Entstehung von MGUS und Multiplem Myelom entsprechend eines Multistep-Modells begünstigen.

Über eine höhere Prävalenz des Multiplen Myeloms in der afroamerikanischen Bevölkerung wurde mehrfach berichtet (Edwards et al., 2005; Landgren et al., 2006c; Wadhera und Rajkumar, 2010). Zudem hat sich gezeigt, dass in der afroamerikanischen Bevölkerung das Risiko, an MGUS zu erkranken, 2-3-fach erhöht ist (Landgren et al., 2006c; Singh et al., 1990), sodass das vermehrte Vorkommen des Multiplen Myeloms in dieser Bevölkerungsgruppe vor allem auf die signifikant erhöhte Prävalenz der MGUS zurückgeführt werden kann (Landgren et al., 2006).

Eine Metaanalyse mehrerer großer Studien ergab ein 1,3-1,8-fach erhöhtes Risiko für Männer (Wadhera und Rajkumar, 2010), das auch für Nicht-Kaukasier bestätigt werden konnte (Khan et al., 2006). Hingegen tritt das Multiple Myelom seltener bei Personen ostasiatischer Herkunft auf (Alexander et al., 2007). Auch für den südostasiatischen Raum konnte eine niedrigere Prävalenz der MGUS als in der kaukasischen Bevölkerung festgestellt werden (Watanaboonyongcharoen et al., 2012).

Eine familiäre Häufung von MGUS und Multiplem Myelom wurde wiederholt beschrieben (Brown et al., 1999; Landgren et al., 2006d; Landgren und Weiss, 2009), was für das Vorliegen von vererbbaaren Risikofaktoren spricht.

Mehrere Metaanalysen haben ergeben, dass mit der Erhöhung des Body Mass Index (BMI) das Risiko für Multiples Myelom steigt (Larsson und Wolk, 2007; Renehan et al., 2008; Wallin und Larsson, 2011).

Auf molekularer Ebene konnten inzwischen mehrere chromosomale Aberrationen der klonalen Plasmazellen identifiziert werden. Im Verlauf und möglicherweise zu einer Progredienz der MGUS zum Multiplem Myelom führend können aktivierende Mutationen von K-RAS und N-RAS, des fibroblast growth-factor receptor 3 (FGFR3), sowie Aktivierung des NF- κ B Wegs, Up-regulation im myc-Gen und Veränderungen, die letztlich zu einer Deaktivierung von im p53 und RB-1 Gen führen, hinzukommen (Kuehl und Bergsagel, 2012; Raab et al., 2009). Des Weiteren konnten Veränderungen des Expressionslevels von micro-RNA (miRNA) mit regulatorischer Funktion auf Zellzykluskontrolle, Apoptose, Proliferation und Angiogenese festgestellt werden (Benetatos und Vartholomatos, 2012).

Derzeit mehren sich die Studien, die die Hypothese einer chronischen Antigenstimulation als wichtigen Faktor in der Tumorgenese stützen. In einer umfangreichen Follow-up Studie von hospitalisierten Asthmapatienten wurde gezeigt, dass diese ein signifikant erhöhtes Risiko für nahezu alle untersuchten Tumoren aufweisen (Ji et al., 2009). Eine erhöhte Inzidenz für hämatologische Tumoren wurde bei rheumatoider Arthritis bestätigt (Mellemkjaer et al., 1996). Eine weitere Studie erbrachte die Erkenntnis, dass bei etwa einem Zehntel der Patienten mit Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen eine Autoimmunerkrankung oder chronische Infektion der Diagnose des Lymphoms vorausging (Vanura et al., 2011). Es ist bekannt, dass einige Lymphome bei Autoimmunerkrankungen wie Sjögren-Syndrom oder Hashimoto-Thyroiditis in der betroffenen Region mit erhöhter Frequenz auftreten (Smedby et al., 2008). Mit Expansion der stimulierten B-Zellen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von

unerwünschten genetischen Aberrationen als Grundlage für die Entstehung von malignen Zellen (Fisher und Fisher, 2006).

Der Stellenwert von Allergien in der Ätiologie der MGUS und des Multiplen Myeloms bleibt unklar (Brown et al., 2008; Cuzick und De Stavola, 1988; Soderberg et al., 2004). Einige Studien konnten das atopische Ekzem als signifikanten Risikofaktor für die Erkrankung an Multiplem Myelom identifizieren (Doody et al., 1992), bei anderen konnte lediglich eine erhöhte Prävalenz für Myelome vom IgG-Typ festgestellt werden (Lewis et al., 1994).

Dennoch bestehen Anhaltspunkte, dass eine dauerhafte Stimulation des Immunsystems aus autoimmuner, infektiöser oder inflammatorischer Ursache die Entstehung eines MGUS wie auch eines Multiplen Myeloms triggern kann (Brown et al., 2008).

2.4 M. Waldenström

Bei M. Waldenström oder Immunozytom handelt es sich um ein Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe mit Infiltration des Knochenmarks kombiniert mit dem Nachweis von monoklonalem IgM. Histologisch ergibt sich ein pleomorphes Bild aus B-Zellen unterschiedlicher Reife mit lymphoplasmazytoiden Zellen, Plasmazellen und kleinen B-Lymphozyten. Die WHO klassifiziert M. Waldenström als lymphoplasmazytisches Lymphom mit monoklonalem IgM (Campo et al., 2011). Bisher gibt es keine Therapie, die eine Heilung ermöglicht. Die mittlere Überlebenszeit nach Manifestation beträgt 5 Jahre (Ansell et al., 2010; Kyle et al., 2003b). Die Erkrankung wurde 1944 von Jan Waldenström beschrieben, dessen Patienten unter anderem durch Anämie, Blutungen, Hyperviskosität des Blutes, Lymphozytose des Knochenmarks, sowie Lymphadenopathie auffielen. Weiterhin können Splenomegalie, Neuropathie und eine hämolytische Anämie durch autoreaktives Immunglobulin bestehen (Ansell et al., 2010).

Die Ätiologie ist bisher nicht genau geklärt. Es finden sich Hinweise, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren involviert sein können. M. Waldenström kann aus einer IgM MGUS hervorgehen (Kyle et al., 2003a). Im Gegensatz zum Multiplen Myelom und der MGUS ist die Prävalenz des M. Waldenström in der weißen Bevölkerung höher (Groves et al., 1998; Wang et al., 2012), ein mehr als doppelt erhöhtes Risiko wurde von Groves et al. beschrieben (Groves et al., 1998). Für Verwandte von M. Waldenström-Patienten besteht ein höheres Erkrankungsrisiko für M. Waldenström und in geringerem Ausmaß auch für andere verwandte B-Zellerkrankungen wie MGUS, weitere Non-Hodgkin-Lymphome und B-ALL (Treon et al., 2006). Ob das Risiko für M. Hodgkin und Multiples Myelom erhöht ist, ist derzeit noch nicht

eindeutig geklärt (Kristinsson et al., 2008; Treon et al., 2006). Eine weitere Rolle in der Pathogenese scheint auch eine auto- oder parakrine IL-6 Sekretion durch maligne B-Zellen zu spielen (Levy et al., 1994). Diverse genetische Veränderungen sind bisher beschrieben worden, hierunter finden sich Mutationen, die die Expression des Tumorsuppressorgens p53 herabsetzen (Iida et al., 1996) und die bei malignen Neoplasien häufig anzutreffende Deletion von 6q21 (Schop et al., 2002), das die Genloci für mehrere Tumorsuppressorgene umfasst (Fung et al., 2009; Karube et al., 2011).

Wenige Studien haben bisher die Rolle der Autoimmunstimulation in der Pathogenese untersucht. Darin zeigte sich eine Risikoerhöhung um das 2-3-fache, insbesondere für Sjögren-Syndrom, M. Crohn und Immunthrombozytopenie (Koshiol et al., 2008).

2.5 Aktuelle Forschungslage zu hyperphosphoryliertem Paratarg-7

MGUS, Multiples Myelom und M. Waldenström sind Erkrankungen, die mit der Synthese von klonalen Immunglobulinen durch klonale Expansion von B-Zellen einhergehen. Als möglicher Faktor hierfür wird derzeit auch eine chronische Immunstimulation durch Autoantigene angesehen.

Die Epitope, gegen die die Paraproteine bei MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström gerichtet sind, sind in den meisten Fällen unbekannt (Preuss et al., 2009), einige konnten bisher aufgrund der Symptomatik der Patienten, wie hämolytische Anämie (Colwell et al., 1997), ermittelt werden. Da diese Autoantigene möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen, befasste sich die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Pfreundschuh an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes damit, diese Autoantigene zu identifizieren.

Mittels SEREX (*serological identification of antigens by cDNA expression cloning*), einem Verfahren, das die Identifizierung von Antigenen z.B. aus Tumoren und patienteneigenen Antikörpern ermöglicht (Sahin et al., 1995), wurden erstmals systematisch Paraproteine von an MGUS und Multiplem Myelom erkrankten Patienten bei hoher Verdünnung von 1:10⁶ auf ihre Reaktion mit cDNA Banken aus menschlichem Testes (Xie et al., 2001), Brust- und Lungenkrebs, Schweine- und Rindfleisch sowie Weizen untersucht. Hierbei konnten über 6 x 10⁸ Kombinationen überprüft werden (Preuss et al., 2007).

Bei einer anschließenden Analyse einer cDNA Bank aus menschlichem fetalen Hirngewebe reagierten 3 Proteine mit den Paraproteinen aus Patientenserum mit M-Spike in der Voruntersuchung und wurden im Folgenden „Paratarg“ für *paraprotein target 5, 6 und 7*

bezeichnet. Paratarg-5 entsprach nach Sequenzanalyse dem Mikrotubuli-assoziierten Protein, Paratarg-6 dem Lysosomal-assoziierten Multitransmembranprotein 5, während Paratarg-7 mit dem Stomatin-like-Protein 2 (SLP-2) gleichzusetzen ist (Preuss et al., 2009). Paratarg-1 bis -4 waren durch vorherige Untersuchungen der cDNA Banken aus obig genannten Geweben bekannt. 15,1 % der Patientenserum mit IgA und IgG MGUS reagierten mit Paratarg-7 bis zu einer Verdünnung von $1:10^{10}$, während alle weiteren Paratarg nur bei etwa 1-2 % eine Reaktion zeigten (Preuss et al., 2007; Xie et al., 2001).

Das Auftreten von Paratarg-7 spezifischem Paraprotein zeigt weder Präferenzen bezüglich des Alters, noch des Geschlechts oder eines bestimmten Krankheitsverlaufs (Grass et al., 2009).

SLP-2 besitzt im Gegensatz zu anderen Stomatin ähnlichen Proteinen (SLP-1 und SLP-3) keine hydrophobe Domäne am aminoterminalen Ende (Wang und Morrow, 2000). Das Protein Stomatin ist in der Erythrozytenmembran verankert und hat einen regulatorischen Einfluss auf die Kationenverteilung über die Zellmembran (Stewart et al., 1993). Es ist Bestandteil des Membranskeletts der Erythrozyten, ohne jedoch in diese integriert zu sein, und zeigt eine Akkumulation bei Kontakt zu anderen Erythrozyten, was bei den ihm möglicherweise assoziierten Membranproteinen Spectrin und Stomatin nicht feststellbar war. Ein Nachweis von SLP-2 gelang in allen menschlichen Geweben, besonders hohe Konzentrationen von SLP-2 mRNA fanden sich in Herz-, Skelettmuskel, Leber und Pankreas (Owczarek et al., 2001; Preuss et al., 2009; Wang und Morrow, 2000). SLP-2 wird ebenfalls in allen Zellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark exprimiert (Preuss et al., 2009).

Eine gesteigerte Expression von SLP-2 wurde bei verschiedenen Neoplasien nachgewiesen. So war in Gewebe aus kolorektalem Karzinom SLP-2 bei mehr als 50 % signifikant überexprimiert im Vergleich zu gesunder Darmmukosa, unabhängig von Duke-Klassifikation und Differenzierungsgrad. Auch bei anderen Tumoren wird über eine vermehrte Expression berichtet (Yeoh et al., 2010). Eine Tumorassoziation von SLP-2 konnte zudem für Ösophaguskarzinom (Zhang et al., 2006), Endometrium- (Cui et al., 2007), Mamma- und Larynxkarzinom demonstriert werden, wobei für die beiden letztgenannten Tumorentitäten das Expressionsniveau von SLP-2 mit der Metastasierung des Tumors korrelierte (Cao et al., 2007a; Cao et al., 2007b).

Mutationen oder Polymorphismen der Paratarg-7 DNA Sequenz sowie Unterschiede in der SDS-PAGE, welche kausal mit der Paraproteinreaktivität in Verbindung stehen könnten,

waren nicht festzustellen. Eine zusätzliche Phosphorylierung durch posttranslationale Modifikation von Paratarg-7 bei Patienten mit anti-Paratarg-7 führte jedoch in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zu einem veränderten Laufverhalten im Vergleich zur Kontrollprobe ohne anti-Paratarg-7 (**Abb. 1**; Grass et al., 2009; Preuss et al., 2009).

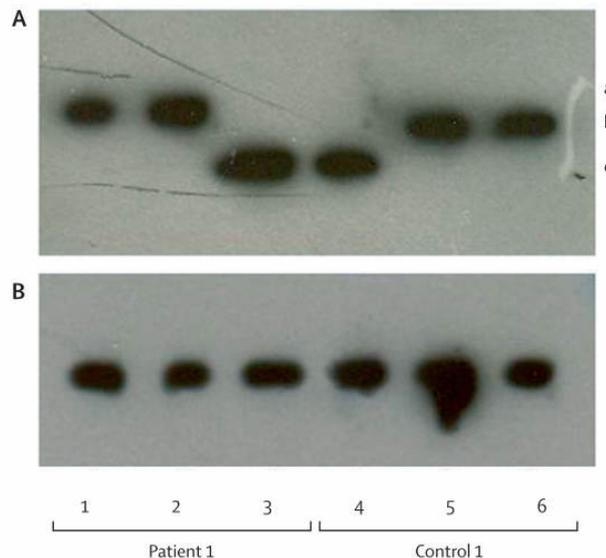


Abb. 1: Phosphatase-Behandlung von Paratarg-7. Isoelektrische Fokussierung (IEF; A): Banden von unbehandeltem Lysat eines Patienten mit anti-Paratarg-7 spezifischem Paraprotein (Patient 1) und einer gesunden Kontrolle (Control 1) wandern unterschiedlich in der IEF (Bahnen 1 und 6). Nach Inkubation mit Lysepuffer bewegen sich die Banden von Patient und Kontrolle auch unterschiedlich (Bahnen 2 und 5). Nach Behandlung der Lysate mit alkalischer Phosphatase zeigen die Banden von Patient und Kontrolle identisches Laufmuster. (a) Wanderung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7; (b) Wanderung von Paratarg-7 eines gesunden Spenders; (c) Wanderung von dephosphoryliertem Paratarg-7. SDS-PAGE (B): In allen Fällen sind keine Unterschiede im Wanderungsmuster erkennbar (Grass et al., 2009).

Inzwischen konnte geklärt werden, dass die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 durch Inaktivierung einer Phosphatase bedingt ist. PhosphokinaseC ζ katalysiert die Phosphorylierung von Paratarg-7, das eine zusätzliche Phosphorylierung an Serin17 erhält und normalerweise durch Protein Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert wird. Die Phosphorylierung einer Untereinheit von PP2A führt zu einer Inaktivierung, wodurch Paratarg-7 hyperphosphoryliert bleibt (Preuss et al., 2011).

Auch bei weiteren der bisher gefundenen Paraprotein-Antigenen konnte eine zusätzliche Phosphorylierung nachgewiesen werden, was für die Bedeutung der Hyperphosphorylierung in der Pathogenese dieser Erkrankungen spricht (Grass et al., 2011b). Es konnte gezeigt werden, dass phosphorylierte Epitope starke Liganden des Major Histocompatibility Complex (MHC) sind und darüber eine T-Zell vermittelte Immunantwort auslösen können (Meyer et al., 2009; Mohammed et al., 2008). PP2A konnte bei allen auf molekularer Ebene bekannten

Zielantigenen von klonalen Immunglobulinen als zuständiges Enzym für die Dephosphorylierung identifiziert werden (Preuss et al., 2011).

Im weiteren Verlauf wurden Patienten mit IgM MGUS und M. Waldenström auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 untersucht, wobei sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen Erkrankung und Häufigkeit der Expressierung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 ergab (Grass et al., 2011c). **Tab. 1** zeigt eine Übersicht der Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei den bisher untersuchten Erkrankungen.

Tab. 1: Häufigkeitsverteilung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7) aufgelistet nach Erkrankungen (nach Grass et al., 2009; Grass et al., 2011c; Preuss et al., 2009), *(nach Preuss et al., 2009)

	Häufigkeit von pP-7 (%)
IgG/IgA MGUS + Multiples Myelom (n = 252)/(n = 192)*	13,9 %/15,1 %*
IgM MGUS (n = 51)	17,6 %
M. Waldenström (n = 110)	8,2 %
IgM MGUS + M. Waldenström (n = 161)	11,2 %
Gesunde Kontrollen (n = 200)	2 %

Die derzeit 12 vorliegenden Stammbaumanalysen von an MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström erkrankten Patienten mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 lassen einen autosomal-dominanten Erbgang vermuten, auch wenn bei Carriern kein obligates Auftreten von Paratarg-7 spezifischem Paraprotein zu beobachten war. Dennoch könnte die familiäre Häufung von MGUS, Multiplem Myelom oder M. Waldenström für den Anteil der Patienten, die hyperphosphoryliertes Paratarg-7 exprimieren, damit erklärt werden (Grass et al., 2009; Grass et al., 2011c). Auch bei 2 % der gesunden Kontrollen ohne M-Protein in der Serumelektrophorese war Paratarg-7 hyperphosphoryliert, wobei in der Kontrollgruppe ein

geringerer Altersdurchschnitt vorlag. Bei allen Patienten mit anti-Paratarg-7 Serumantikörpern war Paratarg-7 hyperphosphoryliert.

Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 ist ein neuer Risikofaktor, der das Risiko für Betroffene an IgG, IgA MGUS oder Multiplem Myelom um das 7,9-fache bzw. an IgM MGUS und M. Waldenström zu erkranken, um das 6,2-fache erhöht (Grass et al., 2009; Grass et al., 2011c).

Weiterhin wurden an MGUS und Multiplem Myelom erkrankte Patienten und gesunde Kontrollen japanischer Herkunft auf Paratarg-7 und Paratarg-7 spezifisches Paraprotein gescreent. Von 111 japanischen an MGUS und Multiplem Myelom erkrankten Patienten wurde bei 5 Patienten (4,5 %) sowohl das hyperphosphorylierte Protein wie auch Paraprotein mit Reaktivität gegen Paratarg-7 nachgewiesen. Vorhandenes Paraprotein konnte, wie in der deutschen Vergleichsgruppe, den Subtypen IgA und IgG₃ zugeordnet werden. Ein Patient der Kontrollgruppe exprimierte hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (0,36 %). Bei Kranken und Gesunden lag die Frequenz somit unterhalb der des deutschen Patientenkollektivs. Dennoch wurde eine signifikant erhöhte Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei MGUS und Multiplem Myelom Patienten bei einer Odds-Ratio von 13,1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich. Es zeichnet sich daher ab, dass von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 ungeachtet der ethnischen Herkunft das höchste bisher bekannte Risiko für die Erkrankung an MGUS, Multiplem Myelom und M.Waldenström ausgeht (Grass et al., 2011a).

2.6 Übersicht von Definition, Klinik und Ätiologie der untersuchten Tumoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit den im Folgenden beschriebenen Erkrankungen auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 überprüft.

2.6.1 Hodgkin-Lymphom

Hodgkin-Lymphome werden anhand von histologischen und immunphänotypischen Kriterien nach WHO in zwei Gruppen eingeteilt.

Die klassische Form ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von polynukleären Reed-Sternberg-Zellen (HRS) und mononukleären Hodgkin-Zellen (Carbone et al., 2011) und

repräsentiert mit 95 % den Großteil der Hodgkin-Lymphome. Im Gegensatz zum klassischen Hodgkin-Lymphom sind HRS-Zellen beim nodulär Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom nicht oder selten zu finden (Forteza-Vila und Fraga, 2010). Klinisch werden Patienten mit Hodgkin-Lymphom meist durch schmerzlose Lymphknotenschwellungen auffällig. Fakultativ kann eine B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) bestehen (Townsend und Linch, 2012).

Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist nicht genau geklärt. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die HRS-Zellen größtenteils klonalen Ursprungs sind und aus präapoptischen Keimzentrums-B-Zellen hervorgehen (Kuppers und Rajewsky, 1998), denen charakteristische B-Zellmerkmale, z.B. die Oberflächenmarker CD 19 und CD 20 (Drexler, 1992), meist fehlen. Bisher konnten einige Mutationen bestimmt werden, beispielsweise solche, die indirekt den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was eine gesteigerte Synthese von diversen Zytokinen und antiapoptischen Proteine zur Folge hat, und den Janus-Kinase (JAK)/*signal transducer and activator of transkription* (STAT) Signalweg mit transkriptionssteigerndem Effekt aktivieren, sowie Mutationen von Tumorsuppressorgenen (Schmitz et al., 2009).

Epidemiologisch konnte für Immunsuppression, Infektionen mit onkogenen Viren und Autoimmunerkrankungen eine Risikoerhöhung für Hodgkin-Lymphome festgestellt werden.

Immunsuppression durch immunsupprimierende Erkrankungen oder iatrogen wird als Risikofaktor für die Entstehung von Hodgkin-Lymphomen diskutiert. HIV-Infizierte haben ein 9-fach erhöhtes Risiko, Hodgkin-Lymphome zu entwickeln (Hensel et al., 2011; Herida et al., 2003), zugleich ist M. Hodgkin bei HIV-Infizierten die dritthäufigste Ursache an einer Nicht-AIDS-definierenden Erkrankung zu versterben (Simard und Engels, 2010). Über eine Entstehung von Hodgkin-Lymphomen im Kontext einer Transplantation (classical Hodgkin lymphoma PTLD) wird insbesondere in Verbindung mit einer EBV-Infektion berichtet (Bierman et al., 1996). Auch eine EBV-Infektion bei Immunkompetenten erhöht das Risiko, ein Hodgkin-Lymphom zu entwickeln (Epstein-Barr-Virus-assoziiertes Hodgkin-Lymphom), bei der Hälfte der Erkrankten lässt sich das Virus in den HRS-Zellen nachweisen (Herbst, 1996). Vor allem eine späte Infektion mit EBV scheint mit Hodgkin-Lymphomen mit Auftreten in frühem Erwachsenenalter, unter dem 44. Lebensjahr, in Zusammenhang zu stehen.

Auch eine autoimmune Beteiligung, die der Diagnose der Erkrankung vorausgeht, wurde in einigen Studien als Risikofaktor identifiziert. Vor allem rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes, Polymyalgia rheumatica, Immunthrombozytopenie und Sarkoidose sind mit einer erhöhten Inzidenz von Hodgkin-Lymphomen assoziiert. Andere Autoimmunerkrankungen scheinen das Risiko für Hodgkin-Lymphome jedoch unbeeinflusst zu lassen oder sogar zu senken, wie Diabetes mellitus Typ I um 50 % (Landgren et al., 2006a; Landgren et al., 2006b).

2.6.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden anhand von histologischen, immunologischen und genetischen sowie klinischen Kriterien eingeteilt (Vardiman, 2010).

Die Ursache, die zur Entwicklung von Non-Hodgkin-Lymphomen führt, ist meist nicht bekannt. Neben familiärer Häufung (Wang et al., 2007) und Immunsuppression (Opelz und Henderson, 1993) spricht vieles für eine Beteiligung von chronischen infektiösen B-Zell-Stimuli z.B. Infektionen mit dem Hepatitis C Virus (Dal Maso und Franceschi, 2006) oder einen autoimmunen (Smedby et al., 2006) Ursprung, was dadurch untermauert wird, dass bereits einige Jahre vor Diagnose eines NHL bei HIV-positiven Patienten ein Anstieg von B-Zell-aktivierenden Biomarkern wie IL-6 und IL-10 als Ausdruck einer dauerhaften B-Zellaktivierung nachzuweisen war (Breen et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Patienten mit follikulärem Lymphom und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 untersucht.

Die chronische lymphatische Leukämie stellt die häufigste Form der Leukämien im Erwachsenenalter dar und betrifft vor allem Personen im höheren Alter mit einem mittleren Erkrankungsalter um das 65. Lebensjahr. Männer erkranken häufiger als Frauen (Rozman und Montserrat, 1995). Diagnosekriterien der nach WHO als indolentes Non-Hodgkin-Lymphom eingestuften CLL sind eine länger als 1 Monat andauernde Lymphozytose von reifen Lymphozyten, die immunphänotypisch CD19, CD5 und CD23 positiv sind bei geringer Expression von CD79b und membranständigem IgM oder IgD (Chiorazzi et al., 2005; Matutes et al., 1994)

Patienten zeigen initial oft keine Symptome, können aber über Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust berichten. Eventuell bestehen Schwellungen von Lymphknoten, Milz und Leber. Anämie und Thrombozytopenie können hinzutreten (Rozman und Montserrat, 1995).

Die Ätiopathogenese der CLL ist bisher unklar. Als Risikofaktoren konnten bislang männliches Geschlecht, hohes Lebensalter und familiäre Disposition (Goldin et al., 2004) ermittelt werden. Die chronische Immunstimulation, in Form einer dauerhaften Aktivierung der B-Zellen, wird als eine mögliche Ursache durch mehrere Studien gestützt. So konnten Tsai et al. demonstrieren, dass bis zu 10 Jahre vor Diagnose der CLL bei etwa 40 % der Patienten bereits erhöhte freie leichte Ketten oder M-Protein im Blut nachzuweisen waren (Tsai et al., 2009). Auch bei manifester CLL kann ein positiver M-Gradient vorhanden sein, wobei die leichten Ketten des monoklonalen Paraproteins, hauptsächlich IgM und IgG, überwiegend der leichten Kette des Oberflächenimmunglobulins entsprechen, was für die Herkunft aus den malignen B-Zellen spricht (Yin et al., 2005). Umgekehrt liegt bei etwa 20 % der Patienten mit monoklonalem IgM im Serum eine CLL vor und bei 3 % der Patienten mit M-Protein im Serum stellte sich eine CLL als Diagnose heraus (Alexander et al., 2007; Kyle, 1993; Lin et al., 2005).

Das folliculäre Lymphom ist nach WHO-Klassifikation ein Non-Hodgkin-Lymphom der reifen B-Zellen (Jaffe et al., 2008). Die Erkrankung fällt durch indolente oberflächliche Lymphknotenschwellungen, bisweilen auch durch Veränderungen der Lymphknoten in tieferen Regionen auf, die mit einer ausgeprägten Symptomatik einhergehen können (Salles, 2007).

Diverse chromosomale Anomalien sind mit dem folliculären Lymphom vergesellschaftet. Hierunter ist an erster Stelle die Translokation t(14;18)(q32;q21) mit gesteigerter Expression von antiapoptischen bcl-2 zu nennen, die bei einem Großteil der Patienten nachzuweisen ist (Bloomfield et al., 1983; Fukuhara et al., 1983; Levine et al., 1985). Jedoch sind auch bei Gesunden zu etwa 50 % t(14;18) (Dolken et al., 1996; Yasukawa et al., 2001) translozierte Zellen mit steigendem Anteil in der älteren Bevölkerung vorhanden (Nambiar und Raghavan, 2009; Schuler et al., 2009), sodass derzeit davon ausgegangen wird, dass weitere chromosomale Veränderungen die Pathogenese des folliculären Lymphoms gemäß eines *multi-hit* Modells bedingen (Horsman et al., 2001).

2.6.3 CML

Die CML ist eine maligne Erkrankung, die von den hämatopoetischen Stammzellen ausgeht. Die Inzidenz beträgt 1-2/100 000/Jahr (Hehlmann et al., 2007) mit einem Erkrankungsspeak um das 50. Lebensjahr. Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit, sowie Hepatosplenomegalie

können führende Symptome sein, mehr als ein Drittel ist jedoch asymptomatisch zum Zeitpunkt der Diagnose (Sawyers, 1999).

Das die CML kennzeichnende Onkogen konnte vor etwa 40 Jahren identifiziert werden (Rowley, 1973). Durch Translokation t(9;22) kommt es zur Expression eines bcr-abl Fusionsproteins, das als Tyrosinkinase verschiedene Signalwege aktivieren kann, die schließlich zu einer Entkopplung des sonst zytokingesteuerten Zellzyklus und somit einer ungehemmten Proliferation und malignen Transformation der Zellen führen. Damit ist die CML eine der wenigen Neoplasien, deren Pathogenese sich in der Mehrheit der Fälle auf ein singuläres Onkogen zurückverfolgen lässt. Auch wenn das verantwortliche Gen bekannt ist, sind die Auslöser dieser Translokation und der übrigen CML-Fälle, die nicht auf diese Translokation zurückzuführen sind (Fialkow et al., 1981), bisher unklar (Sawyers, 1999). Ionisierende Strahlung (Hsu et al., 2013; Preston-Martin et al., 1989), steigendes Lebensalter und männliches Geschlecht erhöhen das Risiko für CML (Hehlmann et al., 2007). Hinsichtlich des Stellenwerts einer vorausgegangenen Exposition gegenüber Benzol ist die Datenlage noch uneinheitlich (Khalade et al., 2010; Vlaanderen et al., 2012).

2.6.4 Akute Leukämien

Die akuten Leukämien sind durch eine unverhältnismäßige Proliferation von unreifen Blasten im Knochenmark gekennzeichnet. Hierunter kommt es durch Verdrängung des Knochenmarks zu einer insuffizienten Hämatopoese. Die Klinik ist vor allem durch die Panzytopenie als Folge der Knochenmarksinsuffizienz geprägt, sodass sich die Patienten häufig mit Abgeschlagenheit durch Anämie, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung präsentieren (Boggs et al., 1962).

Mit einer Inzidenz von 3,7/100 000 pro Jahr ist die AML nach der CLL die häufigste Leukämie in der erwachsenen Bevölkerung (Visser et al., 2012) und betrifft besonders Personen im höheren Lebensalter ab dem 65. Lebensjahr (Ferrara und Schiffer, 2013).

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) tritt mit einer Frequenz 0,7-1,8/100 000 pro Jahr bei Erwachsenen mit einem Erkrankungsgipfel um das 70. Lebensjahr (Hoelzer und Gokbuget, 2000) auf. Ein Drittel der ALL Erkrankten sind Erwachsene. Häufiger liegt die ALL bei Kindern vor mit Hauptmanifestationsalter um das 2.-5. Lebensjahr (Pui et al., 2008). Zu etwa 80 % sind leukämischen Zellen der B-Zelllinie zuzuordnen (Moorman et al., 2010).

Als Risikofaktoren für akute Leukämien konnten Umwelt- und Lifestylefaktoren wie Benzolexposition (Khalade et al., 2010), ionisierende Strahlung (Greaves, 1997; Hsu et al.,

2013) und Rauchen (Speer et al., 2002) bestimmt werden. Auch genetische Faktoren im Rahmen von genetischen Syndromen oder eine vorausgegangene zytostatische Therapie (Greaves, 1997) lassen einen Zusammenhang erkennen. Für die meisten Erkrankten ist die Ätiologie jedoch nicht geklärt.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 konnte bei Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström mit signifikant erhöhter Häufigkeit im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Es blieb bisher offen, ob die hohe Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 spezifisch für diese Erkrankungen ist und als Risikofaktor nur bei diesen Erkrankungen von Bedeutung ist.

Um festzustellen, wie hoch die Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei weiteren malignen hämatologischen Erkrankungen ist und ob es an der Pathogenese anderer hämatologischer Erkrankungen beteiligt ist, sollten Patienten auf die Expression von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 untersucht werden. Die Ergebnisse sollten mithilfe einer unabhängigen 2. Methode nochmals kontrolliert werden.

Weiterhin sollten Patienten, die im Screening die hyperphosphorylierte Variante des Proteins aufwiesen, auf das Vorhandensein von Paratarg-7 spezifischen Antikörpern überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Proben

Die Proben stammen von Patienten, die in ambulantem und stationärem Rahmen in der Klinik für Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes (Direktor Prof. Dr. M. Pfreundschuh) behandelt wurden. Das schriftliche Einverständnis der Patienten sowie die Genehmigung durch die Ethikkommission des Saarlandes wurden zuvor eingeholt. Die Verwendung der Proben erfolgte anonymisiert.

EDTA-Blut wurde abzentrifugiert, anschließend wurden Plasma und Blutpellet abpipettiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

3.2 Lösungen

TBS Tx-100 Waschpuffer

8,78 g NaCl

6,05 g TRIS- hydrochlorid

1,40 g TRIS

ad 1 l Aqua dest.

+ 1 ml Triton X-100

Coating

Lösung 1

1,06 g Na₂CO₃ ad 50 ml Aqua dest.

Lösung 2

0,84 g NaHCO₃ ad 50 ml Aqua dest.

Blocklösung

0,75 g Gelatine

+ 50 ml TBS Tx-100 Waschpuffer

aufgelöst im Wasserbad bei 150 °C

Entwicklung

Entwickler-Stammlösung A

1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
in 50 ml Aqua dest.

Entwickler-Stammlösung B

1,05 g Zitronensäure-monohydrat in 50 ml
Aqua dest.

OPD-Entwicklerlösung

2,5 ml Entwickler-Stammlösung A

2,5 ml Entwickler-Stammlösung B

5 ml Aqua dest.

1 Tablette OPD ($\hat{=}$ 10 mg OPD)

5 μ l 30 % H₂O₂

Stopplösung

3 M HCl

Kathodenpuffer

20 mM NaOH

Anodenpuffer

10 mM Phosphorsäure

Lysepuffer

8 M Harnstoff

0,1 M NaH₂PO₄

10 mM TrisHCl

eingestellt auf pH = 8 mit NaOH

0,1 % Triton X

ad 1 l Aqua dest.

Transferpuffer

0,3 g TRIS

1,44 g Glycin

20 ml Methanol

ad 100 ml Aqua dest.

Blockpuffer

10 % Milchpulver in TBS Waschpuffer
(s. ELISA)

PBS

1,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

8,78 g NaCl

ad 1 l Aqua dest.

ECL Verdünnung

Lumigo reagent A

H_2O_2 reagent B

1:20 in Aqua dest.

3.3 Material und Reagenzien

Material	Hersteller, Ort, Land
Anti-human Fab biotinyliert	Jackson Immuno Resarch, Suffolk, UK
Aqua dest.	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ELISA Polystyrol-Mikrotiterplatte NUNC MaxiSorp F	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Enhanced Chemoluminiscence Entwickler- Kit: 20 x LumiGLO+ 20 x H_2O_2	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Fotoentwickler	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Deutschland

Material und Methoden

Fotofixierer	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Deutschland
Filterpapier (Blotting paper)	Munktell, Bärenstein, Deutschland
G11 Fab-Antikörper	Preuss, Held, unveröffentlicht
Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Huhn-anti-STOML2	Novus Biologicals, Cambridge, UK
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
IEF Gel pH 3-7	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2-fach Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Maus anti-STOML2	Antikörper online, Aachen, Deutschland
Maus anti-FLAG-tag M2 Klon	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase	Roche, Mannheim, Deutschland
Methanol	VWR International S.A.S., Briare, Frankreich
Milchpulver	Hochwald, Thalfang, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
OPD	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
PVDF Membran	Millipore, Darmstadt, Deutschland

Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziege Anti-human IgG, biotinyliert	Jackson Immuno Resarch, Suffolk, UK
Ziege Anti-Maus Meerrettich-Peroxidase	Bio-Rad, München, Deutschland
Zitronensäure-monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.4 Geräte

Elektrophoresegerät	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Langenselbold, Germany
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad, München, Germany
Rührer	Heidolph, Schwabach, Germany
Schüttler KS 250	IKA Labortechnik, Staufen, Germany
Trans-Blot ® SD : SemiDry Transfer Cell	Bio-Rad, München, Germany
Wallac Reader Victor ²	GE, Freiburg, Germany

3.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.5.1 Prinzip des ELISA

Der ELISA macht sich die spezifische Bindungskapazität von Antikörpern an Antigene zunutze. Er eignet sich sowohl zur Detektion von Antigenen als auch von Antikörpern.

Hierbei können sowohl direkte als auch indirekte ELISA-Verfahren zur Anwendung kommen, die sich darin unterscheiden, ob das Antigen mit einem enzymmarkierten Antikörper (direkter ELISA) oder zunächst mit einem unmarkierten Primärantikörper und anschließend mit einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, inkubiert wird (indirektes Verfahren).

Bei der Durchführung des Sandwich-ELISA wird zunächst ein Antikörper mit Spezifität für das gesuchte Antigen auf Polystyrolmaterial gegeben und diffundiert an die Kunststoffoberfläche, wo er nach Adsorption das Immunosorbens bildet (Engvall, 2010). Das in der zu untersuchenden Lösung befindliche Antigen bindet spezifisch an das Immunosorbens. Ungebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Ein zweiter hinzugegebener Antikörper erkennt ein weiteres Epitop des Antigens. Das Enzym, das die anschließende Farbreaktion katalysiert, kann entweder direkt an diesen Antikörper oder an einen Sekundärantikörper gekoppelt sein, der an den Primärantikörper bindet (**Abb. 2**).

Beim direkten ELISA wird das zu bestimmende Antigen in der Probenlösung an die Polystyrolplatte gebunden und anschließend mit enzymgekoppelten Antikörpern inkubiert, die spezifisch für das gesuchte Antigen sind. Alternativ kann das gesuchte Antigen im indirekten ELISA über einen Primärantikörper und einen enzymmarkierten Sekundärantikörper mit Spezifität für den Primärantikörper erfasst werden.

Zur Antikörperbestimmung wird der indirekte ELISA genutzt. Hierbei wird die Mikrotiterplatte mit dem Antigen beschichtet, gegen das der zu quantifizierende Antikörper gerichtet ist. Es folgt die Inkubation mit antikörperhaltiger Probenlösung. Nachfolgend wird ein enzymgekoppelter Antikörper hinzugegeben, dessen Paratop gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist. Ungebundene Antikörper werden durch Waschschriffe zwischen den Inkubationen entfernt (**Abb. 3**; Hornbeck et al., 2001).

Im Anschluss wird bei direktem, Sandwich- und indirektem ELISA ein Substrat zugegeben, das von dem gebundenen Enzym umgesetzt wird und zu einer Farbreaktion führt. Der Farbumschlag kann durch spektrometrische Messung quantifiziert werden, wobei die

Extinktion proportional zur vorhandenen Antikörper- bzw. Antigenmenge ist (Porstmann und Kiessig, 1992).

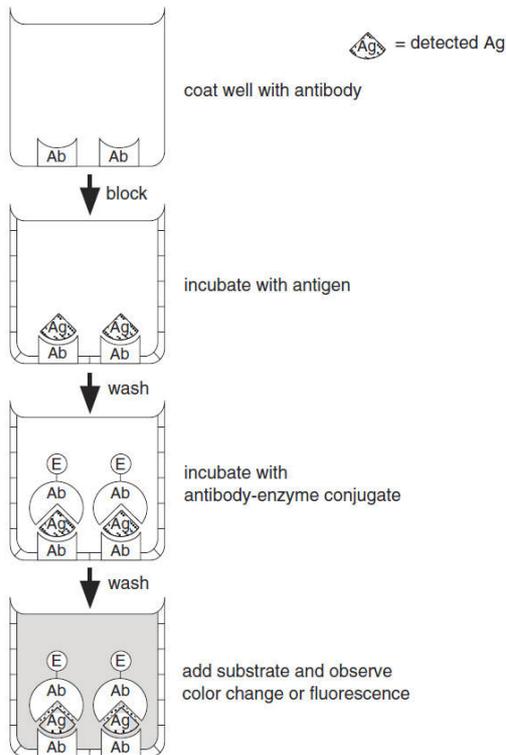


Abb. 2: Sandwich-ELISA. (Nach Hornbeck et al., 2001)

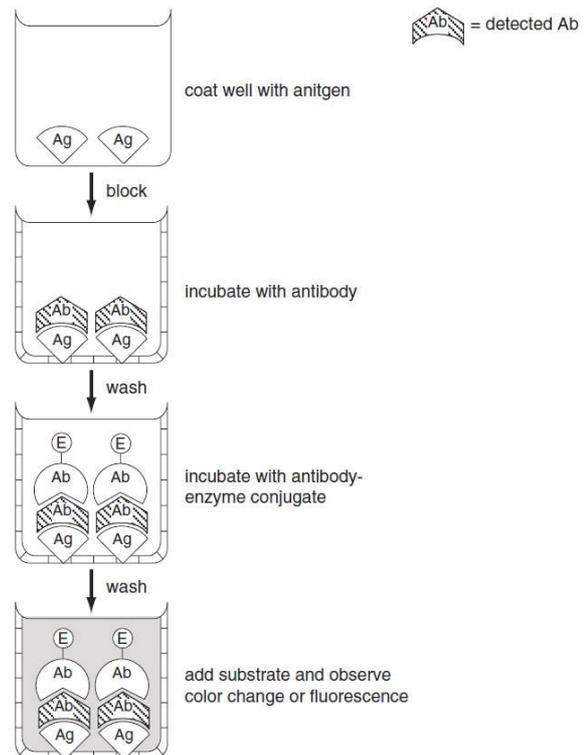


Abb. 3: Indirekter ELISA. (Nach Hornbeck et al., 2001)

3.5.2 Durchführung des Sandwich-ELISA zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7

Die Wells einer ELISA-Mikrotiterplatte wurden mit anti-STOML2 Antikörper vom Huhn beschichtet. Die Antikörperlösung wurde 1:2000 verdünnt in Coating-Puffer. Dieser bestand aus 0,85 ml Lösung 1, 0,4 ml Lösung 2 und 3,75 ml Aqua dest. Hiervon wurde in jedes Well 50 µl hinein pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und bei 4 °C über Nacht belassen.

Am folgenden Tag wurde die Coating-Lösung dekantiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken wurden 100 µl einer 1,5 % Gelatinelösung in jede Vertiefung gegeben, welche nach 1 Stunde bei Raumtemperatur dekantiert wurde. Die Platte wurde anschließend 1-mal mit TBS Tx-100 Waschpuffer abgespült und auf Zellstoff ausgeschlagen. Blutzelllysate wurden durch „freeze-thaw“ hergestellt. Danach wurden 50 µl Blutzelllysate 1:2 in TBS Tx-100 Waschpuffer in einer neuen 96-Well-Platte verdünnt. Hiervon wurden 40 µl als Doppelbestimmung in die Vertiefungen der beschichteten ELISA-Platte pipettiert. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde das Blutzelllysate entfernt und 5-mal mit TBS Tx-100 Waschpuffer gewaschen, bis kein Hämoglobin mehr sichtbar war, und die Platte anschließend auf Zellstoff ausgeklopft. Anschließend erfolgte die 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit jeweils 50 µl G11-Fab-Antikörper-Fragment-Lösung (Konzentration 10 µg/ml), der spezifisch gegen hyperphosphoryliertes SLP-2 gerichtet ist. Ungebundene Fab-Antikörper wurden durch 3-4-maliges Waschen mit TBS Tx-100 Waschpuffer entfernt. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluss daran auf Zellstoff ausgeklopft. In jedes Well wurden 1:2500 in TBS Tx-100 Waschpuffer verdünntes biotinyliertes anti-human Fab-Serum als sekundärer Antikörper zugegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, schließlich abgegossen und 3-4 mal mit TBS Tx-100 Waschpuffer gespült und auf Zellstoff ausgeschlagen. Anschließend wurde in jede Vertiefung 50 µl 1:50 000 in Waschpuffer verdünnte Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase pipettiert, nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur abgegossen und 3-4 mal gewaschen und wieder auf Zellstoff ausgeklopft. Als Substrat wurden 100 µl pro Loch der OPD-Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach deutlichem Farbumschlag der Positivkontrolle wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl je Well 3 M HCl abgestoppt, dadurch erfolgte ein weiterer Farbumschlag zu orange-braun. Zur Eliminierung von Luftblasen wurde die Platte anschließend bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die Absorption wurde im Wallac Reader bei 490 nm gemessen und die Daten in Excel (Microsoft) ausgewertet. In den Diagrammen ist der Mittelwert aus der Doppelbestimmung sowie die zugehörige Standardabweichung als Fehlerbalken abgebildet.

3.5.3 Durchführung des ELISA zum Nachweis von anti-Paratarg-7-Antikörpern

Zum Beschichten der ELISA-Platte wurde Maus-anti-FLAG-tag Antikörper 1:2000 in Coating Puffer wie oben beschrieben verdünnt, und hiervon wurden jeweils 50 µl in die Vertiefungen pipettiert. Die abgedeckte Mikrotiterplatte wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Coating Lösung wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1,5 % Gelatinelösung wie oben beschrieben geblockt, mit TBS Tx-100 Waschpuffer abgespült und auf Zellstoff trocken geklopft. Anschließend wurde rekombinantes SLP-2 mit FLAG-tag zu 10 µg/ml in TBS Waschpuffer verdünnt und in jede Vertiefung 50 µl pipettiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur erfolgte die 3-4-malige Waschung mit TBS Tx-100 Waschpuffer zur Eliminierung von ungebundenem SLP-2. Die gewaschene Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft.

Danach wurde Patientenplasma 1:100 in TBS Tx-100 Waschpuffer verdünnt, 50 µl in jedes Well gegeben, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 3-4-mal mit Waschpuffer gespült und auf Zellstoff ausgeklopft. Als sekundärer Antikörper wurden 50 µl 1:2500 in Waschpuffer verdünnter, biotinylierter Ziege anti-human IgG Antikörper in Waschpuffer in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde nach 1-stündiger Inkubationszeit 3-4-mal mit Waschpuffer gespült. Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase wurde analog dem zuvor beschriebenen Paratarg-7 ELISA hinzugegeben. Die weitere Vorgehensweise zur Entwicklung erfolgte entsprechend der obigen Beschreibung.

3.6 Isoelektrische Fokussierung

3.6.1 Prinzip der isoelektrischen Fokussierung und des Western Blot

Die isoelektrische Fokussierung nutzt die amphotere Eigenschaft von Peptiden und Proteinen, um sie anhand ihres isoelektrischen Punktes aufzutrennen. In einer Flüssigkeit oder einem Gel mit einem pH-Gradienten, die von einem elektrischen Strom durchflossen werden, wandert das Peptid oder Protein, bis ein Gleichgewicht zwischen seinen positiven und negativen Ladungen erreicht ist (Righetti, 1983). Um eine Fokussierung am isoelektrischen Punkt zu erreichen, muss der pH-Wert von Anode zur Kathode ansteigend sein (Kolin, 1954). Der pH-Gradient kann durch unterschiedliche Dichte erreicht oder in einem Polyacrylamid Gel stabilisiert werden (Dale und Latner, 1968).

Im Anschluss können die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Membran aus Nitrocellulose, Polyvinyliden-Difluorid (PVDF), Nylon oder Papier übertragen werden. Im Vergleich zum Blotting durch Vakuum und Diffusion ist der Elektrobplot das schnellere Verfahren und ermöglicht eine vollständigere Übertragung der Proteinbanden. Diese können komplett oder spezifisch durch Antigen-Antikörper-Interaktion markiert werden. Um ein bestimmtes Antigen darzustellen, erfolgt die Zugabe des Primärantikörpers, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. Das an einen sekundären Antikörper gekoppelte Enzym, in der Regel alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase, bewirkt nach Zugabe eines Substrates eine Färbung bzw. bei Chemilumineszenzfarbstoffen die Emission von Licht, welches zur Belichtung von Röntgenfilm verwendet wird, um eine dauerhafte und kontrastreiche Darstellung zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung durch radioaktiv markiertes Protein, das an den primären Antikörper bindet und anschließend mithilfe von Fotofilm sichtbar gemacht wird. Eine quantitative Darstellung gelingt durch densitometrische Auswertung des entwickelten Films oder szintillatorische Messung der radioaktiv markierten Banden (Kurien und Scofield, 2006).

3.6.2 Durchführung der isoelektischen Fokussierung

Die Kammern des Elektrophoresegeräts wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit Kathoden- und Anodenpuffer befüllt. 20 µl des Blutpellets wurde 1:2 mit Lysepuffer versetzt und 10 Minuten inkubiert. 10 µl des dadurch erhaltenen Lysats wurde mit 10 µl 2-fach Probenpuffer vermischt, und hiervon wurden 5 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Nachfolgend wurde 1 Stunde eine Spannung 100 V, danach 1 Stunde bei 200 V und ein halbe Stunde bei 500 V angelegt. Anschließend wurde das Gel auf eine zuvor 5 Minuten in Methanol eingeweichte PVDF Membran abgeklatscht und zwischen mit Transferpuffer befeuchteten Filterpapieren 45 Minuten semi-dry im Transblot geblottet. Die Einstellung betrug 23 V bei 450 mA. Die geblottete Membran wurde in Blockpuffer eingeweicht und über Nacht bei 4 °C und 150 rpm auf den Schüttler gestellt.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal mit TBS Waschpuffer gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran in frischem Waschpuffer 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt, abgegossen, in frischem Waschpuffer eingeweicht und nochmals 5 Minuten geschüttelt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Abpipettieren des Waschpuffers wurde die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10 ml Maus Anti-STOML2 (1:250 in PBS) inkubiert, welches danach abpipettiert wurde. Die Membran wurde wie oben beschrieben 3-fach mit TBS Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die

Inkubation mit 10 ml Ziege Anti-Maus Meerrettich-Peroxidase (1:3000 in Waschpuffer) bei Raumtemperatur, die nach 1 Stunde abpipettiert wurde. Die Membran wurde 3-mal mit TBS Waschpuffer gewaschen (Vorgang s.o.) und bis zur Entwicklung in TBS Waschpuffer eingeweicht.

Zur Entwicklung wurde das ECL-Entwickler System von Cell Signaling verwendet, die Durchführung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

4 Ergebnisse

60 Patienten mit Hodgkin-Lymphom und jeweils 50 Patienten mit follikulärem Lymphom, CLL, CML und AML, sowie einige Patienten mit ALL und weiteren hämatologischen Erkrankungen (je $n < 15$) wurden auf Expression von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 untersucht.

Hodgkin-Lymphom

Bei 2 Proben der Hodgkin-Lymphom-Gruppe ($n = 60$, 3,33 %) war Paratarg-7 hyperphosphoryliert (**Abb. 4**).

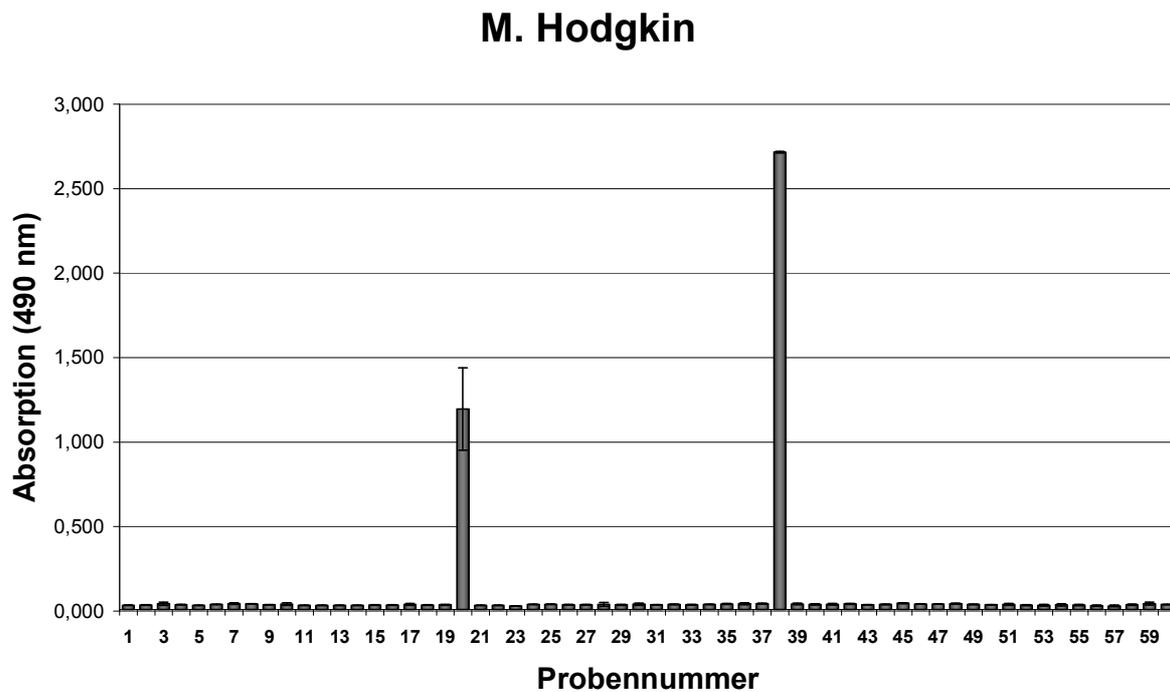


Abb. 4: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 60 Patienten mit Hodgkin-Lymphom mittels ELISA. In den Proben 20 und 38 fand sich hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Non-Hodgkin-Lymphome

Follikuläres Lymphom

50 Blutproben von Patienten mit follikulärem Lymphom wurden mittels ELISA auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 getestet. 1 Probe von 50 (2 %) enthielt hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (**Abb. 5**).

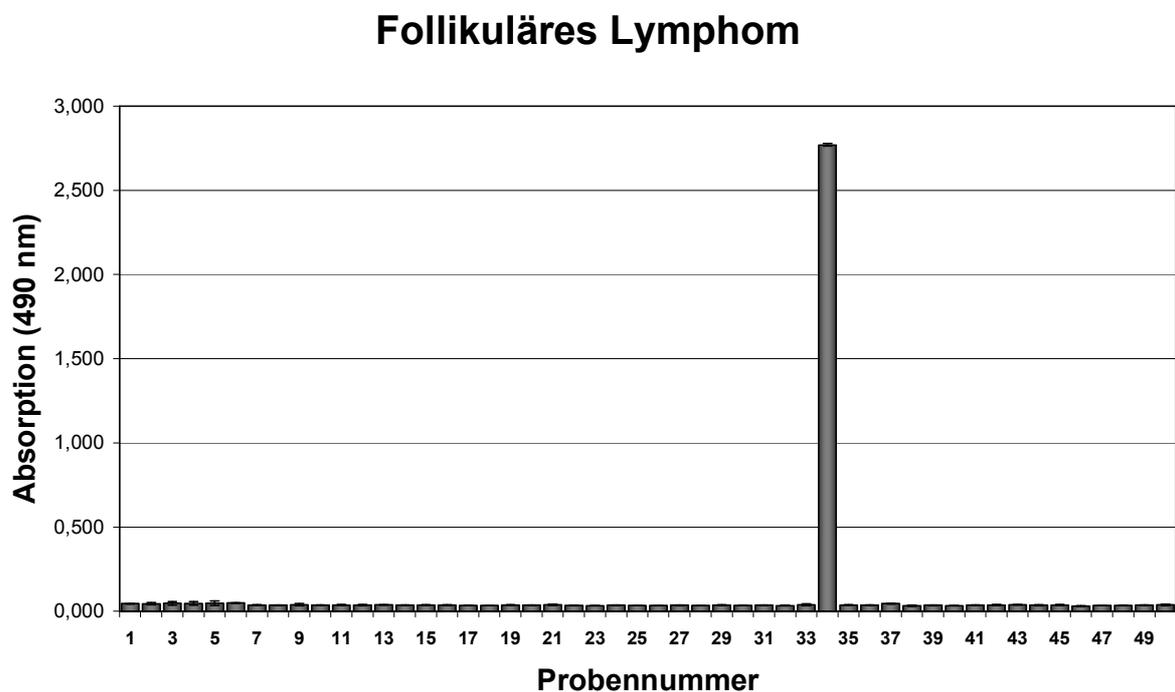


Abb. 5: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 60 Patienten mit follikulärem Lymphom mittels ELISA. In Probe 34 fand sich hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Chronische lymphatische Leukämie

Bei keinem der Patienten mit CLL (n = 50) konnte hyperphosphoryliertes Paratarg-7 im ELISA nachgewiesen werden (0 %; **Abb. 6**).

CLL

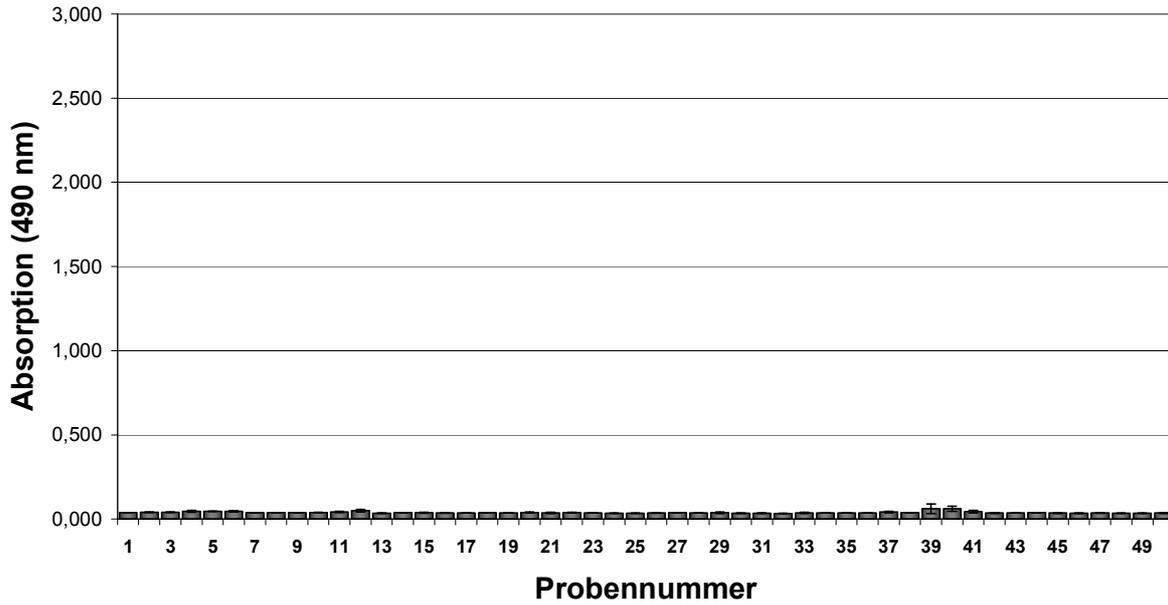


Abb. 6: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 CLL Patienten mittels ELISA. Es fand sich kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Chronische myeloische Leukämie

Keine der 50 CML-Patientenproben enthielt hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (0 %; **Abb. 7**).

CML

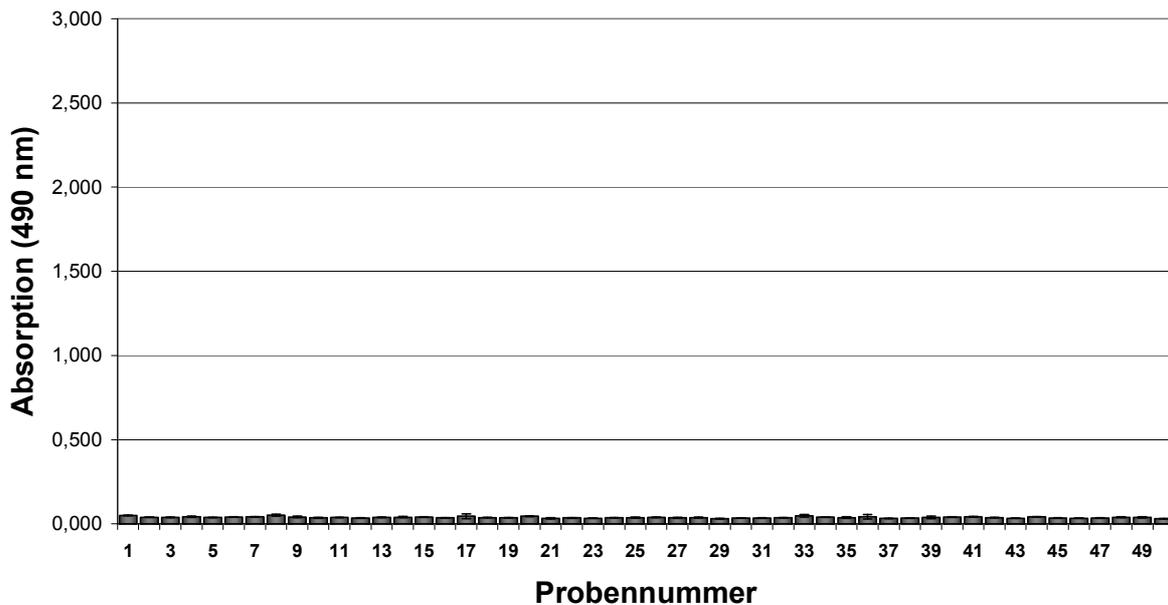


Abb. 7: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 CML Patienten mittels ELISA. Es fand sich kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Akute Leukämien

In einer der getesteten Blutproben von Patienten mit AML (n = 50) war hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachweisbar (**Abb. 8**). Von insgesamt 12 untersuchten Proben von ALL Patienten war eine Probe positiv für hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (**Abb. 9**). Unter den akuten Leukämien exprimierten somit 2 % der akuten myeloischen und 8,33 % der akuten lymphatischen Leukämien hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

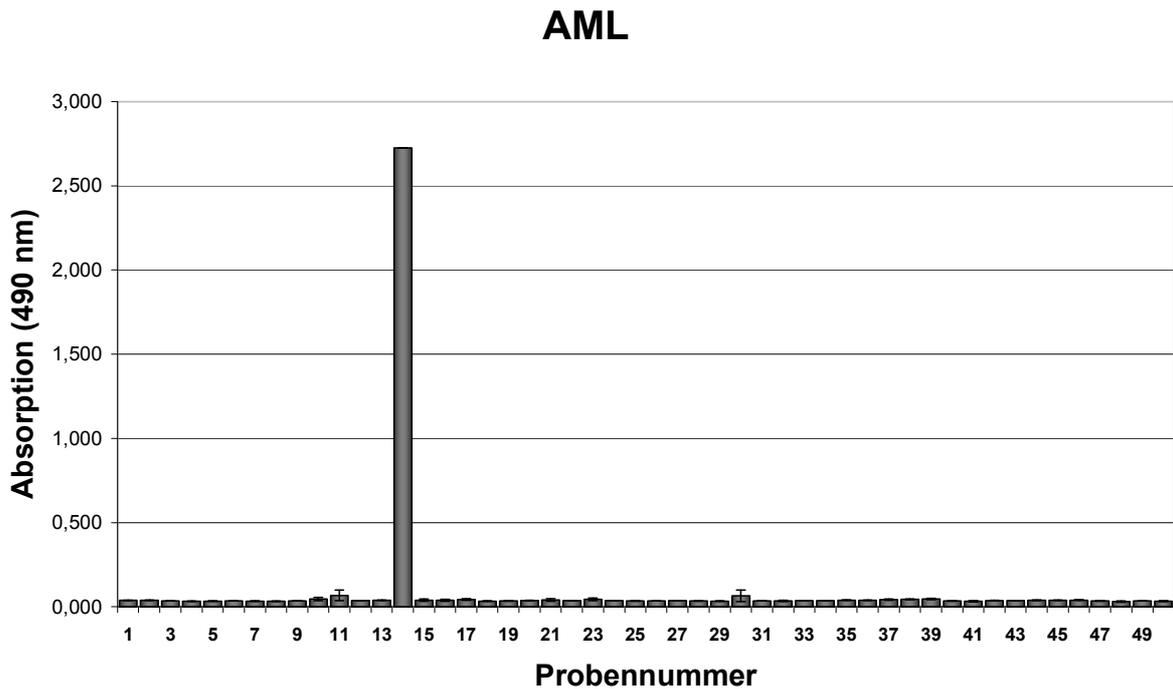


Abb. 8: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 AML Patienten mittels ELISA. In Probe 14 fand sich hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

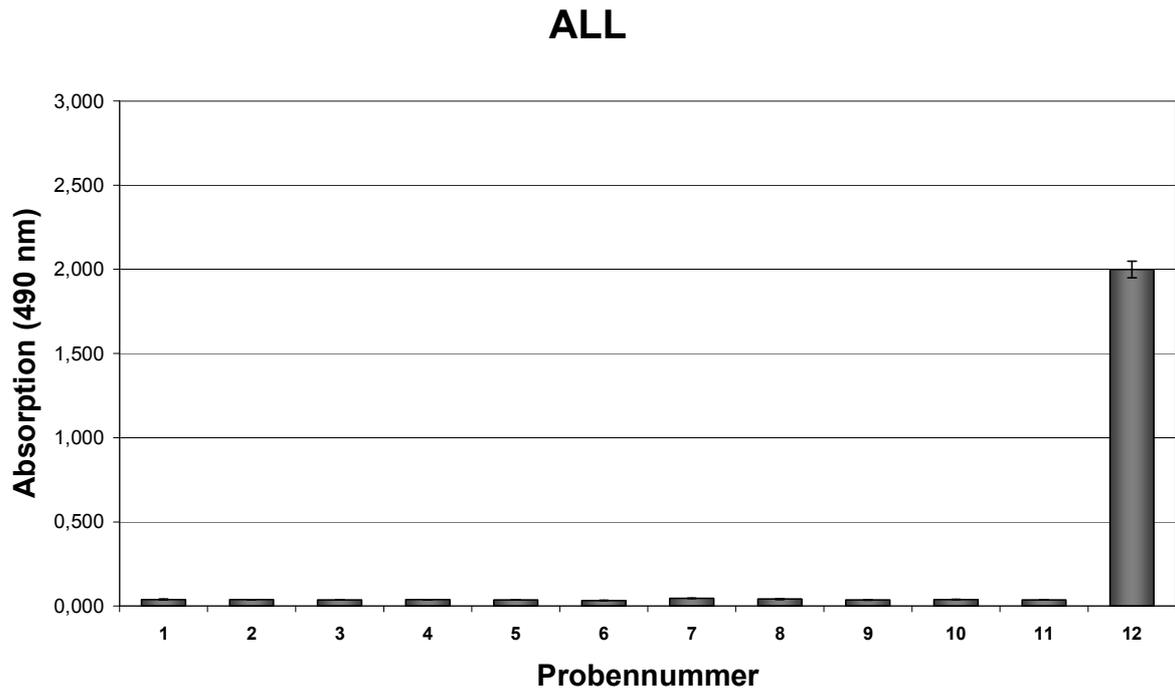


Abb. 9: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 12 ALL Patienten mittels ELISA. In Probe 12 fand sich hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Weitere hämatologische Erkrankungen

Bis auf einen Carrier mit Polycythaemia vera ($n = 3$, 33,3 %) konnte bei allen weiteren untersuchten Patienten kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7 gefunden werden (**Abb. 10**).

weitere hämatologische Erkrankungen

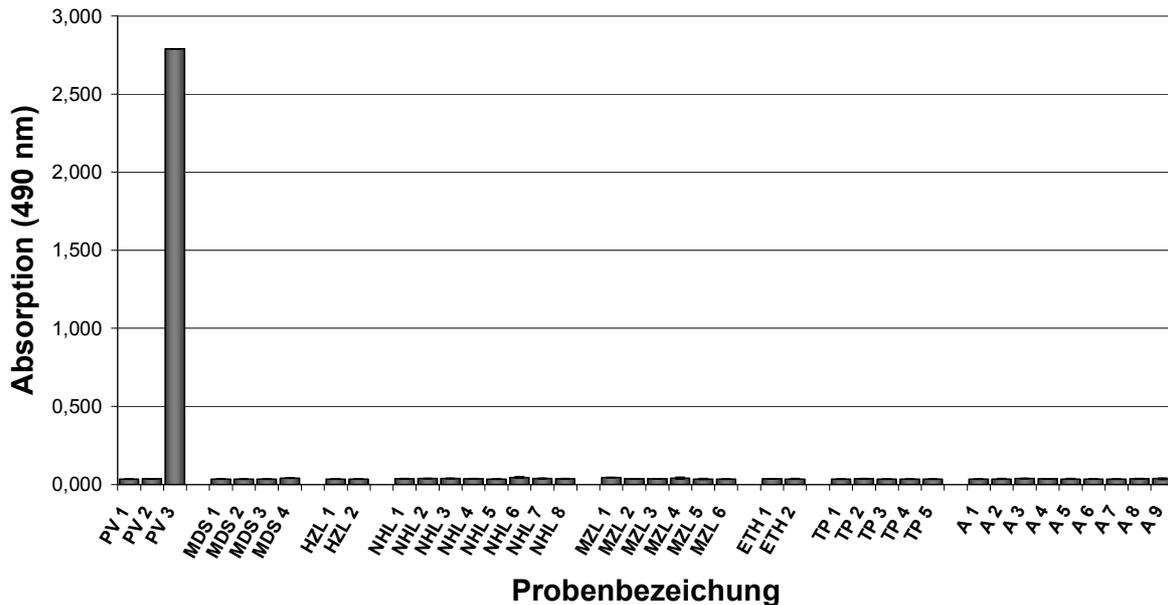


Abb. 10: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Patienten mit weiteren hämatologischen Erkrankungen mittels ELISA. Polycythaemia vera (PV; n = 3), myelodysplastisches Syndrom (MDS; n = 4), Haarzelleukämie (HZL; n = 2), Non-Hodgkin-Lymphom (NHL, nicht weiter spezifiziert; n = 8), Marginalzonenlymphom (MZL; n = 6), essentielle Thrombocythämie (ETH; n = 2), Thrombopenie (TP; n = 5), Anämie (A; n = 9). In Probe PV 3 fand sich hyperphosphoryliertes Paratarg-7.

Die zuvor im ELISA getesteten Proben mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 wurden durch IEF und Western Blot auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 überprüft. Hierbei bestätigte sich das Ergebnis des ELISA. Blutproben, die im ELISA hyperphosphoryliertes Paratarg-7 enthielten, zeigten eine unterschiedliche Lauflänge der Banden im Vergleich zu Kontrollen, bei welchen im ELISA kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachzuweisen war (s. **Abb. 11** und **Abb. 12**).

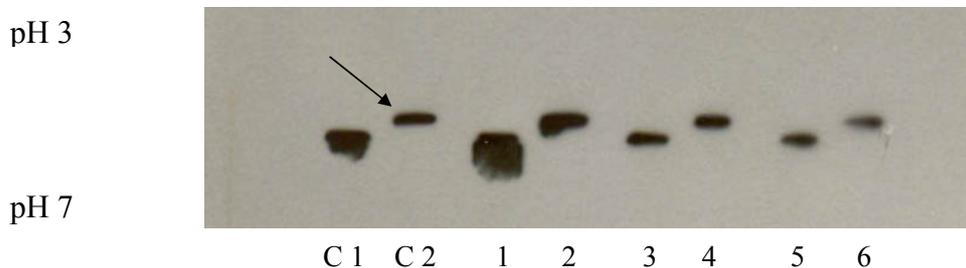


Abb. 11: Immunoblot nach isoelektrischer Fokussierung. pP-7 positive Proben (2, 4, 6) wurden einer Negativprobe (1, 3, 5) gegenübergestellt. Durch die zusätzliche Phosphatgruppe unterscheidet sich das Wanderungsmuster von pP-7 (Pfeil) von dem der Negativkontrolle. C 1: pP-7 negative Kontrollprobe; C 2: pP-7 positive Kontrollprobe; 1: PV 1, 2: PV 3; 3: FL 1, 4: FL 34; 5: AML 1, 6: AML 14.

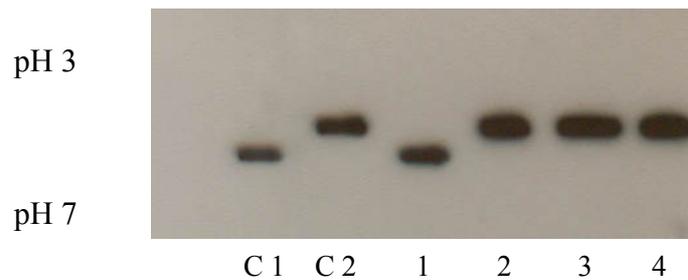


Abb. 12: Immunoblot nach isoelektrischer Fokussierung. 2-4 sind pP-7 positiv. C 1: pP-7 negative Kontrollprobe, C 2: pP-7 positive Kontrollprobe, 1: AML 39, 2: ALL 12; 3: Hodgkin 20; 4: Hodgkin 38.

Paratarg-7-spezifische Paraproteine konnten bisher ausschließlich bei Personen mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 gefunden werden (Grass et al., 2009). Daher wurde überprüft, ob bei den zuvor identifizierten Carriern von hyperphosphoryliertem-Paratarg-7 anti-Paratarg-7 Antikörper vorliegen.

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass bei Patienten mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Titern zwischen $1:10^8$ und $1:10^{10}$ eine Reaktivität von Paratarg-7 spezifischem Paraprotein zu erwarten ist (Grass et al., 2009). In dieser Untersuchung konnte bei keinem Patienten mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 Paraprotein gegen Paratarg-7 bis zu einer Verdünnung von $1:10^2$ gefunden werden (0 %; **Abb. 13**).

anti-Paratarg-7

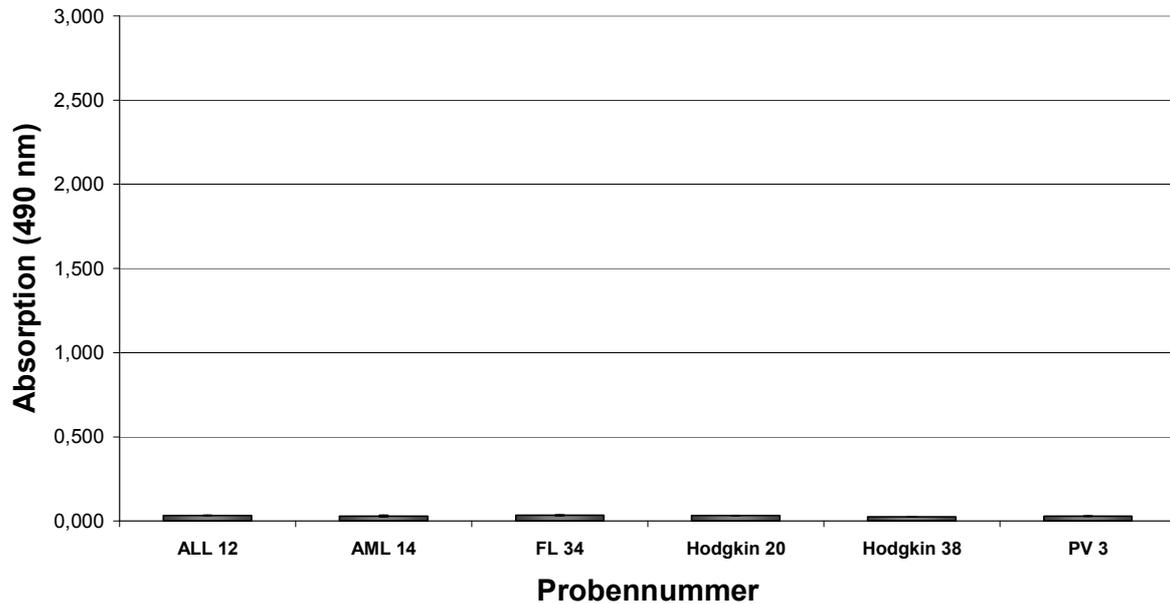


Abb. 13: Nachweis von anti-Paratarg-7 spezifischen Antikörpern mittels ELISA. Es fanden sich keine Antikörper gegen Paratarg-7.

In **Tab. 2** sind die Ergebnisse der Untersuchung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen zusammengestellt.

Tab. 2: Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei hämatologischen Erkrankungen

	n	Anzahl pP-7 positiv (P-7-Paraprotein +/-)	%
Hodgkin-Lymphom	60	2 (-)	3,3 %
Follikuläres Lymphom	50	1 (-)	2 %
CLL	50	0	0 %
CML	50	0	0 %
AML	50	1 (-)	2 %
ALL	12	1 (-)	8,3 %
weitere hämatologische Erkrankungen	39	1 (-)	2,6 %
gesamt	311	6	1,9 %

Die Unterschiede in der Häufigkeit der Expression von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei den einzelnen Gruppen und der zuvor beschriebenen Häufigkeit bei gesunden Kontrollen (Grass et al., 2009) wurden auf Signifikanz überprüft. Die Auswertung mittels exaktem Fisher-Test ergab die p-Werte der untenstehenden Tabelle (**Tab. 3**).

Als Null- und Alternativhypothese wurden H_0 und H_1 angenommen.

- H_0 : Es gibt keinen Unterschied zwischen der Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen.
- H_1 : Es gibt einen Unterschied zwischen der Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen.

Tab. 3: p-Werte nach exaktem Fisher-Test

	pP-7 negativ	pP-7 positiv	Summe	p-Wert (zweiseitig)
Hodgkin-Lymphom	58	2	60	0,624
follikuläres Lymphom	49	1	50	1,0
CLL	50	0	50	0,587
CML	50	0	50	0,587
AML	49	1	50	1,0
ALL	11	1	12	0,255
weitere hämatologische Erkrankungen	38	1	39	0,593
davon				
Polycythaemia vera	2	1	3	0,072
myelodysplastisches Syndrom	4	0	4	1,0
Haarzelleukämie	2	0	2	1,0
NHL	8	0	8	1,0
Marginalzonenlymphom	6	0	6	1,0
essentielle Thromocythämie	2	0	2	1,0
Thrombopenie	5	0	5	1,0
Anämie	9	0	9	1,0
gesamt hämatologische Erkrankungen	305	6	311	1,0

Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wird für alle untersuchten Erkrankungsgruppen die Nullhypothese beibehalten. Es besteht somit keine Evidenz, dass signifikante Unterschiede in der Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei den einzelnen Erkrankungsgruppen, sowie in der Gesamtheit der untersuchten Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, vorhanden sind.

5 Diskussion

Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 konnte als erste molekular definierte Struktur ermittelt werden, die einen vererbaren Risikofaktor für MGUS, Multiples Myelom und M. Waldenström darstellt. Auch wenn bei anderen hämatologischen Neoplasien der B-Zellreihe vieles für die chronische Antigenstimulation durch Fremd- oder Autoantigene in der Pathogenese spricht, ist in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 als autoantigene Zielstruktur und ätiologischer Faktor bei den hier untersuchten Neoplasien als unwahrscheinlich einzuschätzen.

Die Annahme, dass eine Immunstimulation bei Hodgkin-Lymphomen als Risikofaktor anzusehen ist, wird dadurch gestützt, dass für einige Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes und Immunthrombozytopenie ein Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz von Hodgkin-Lymphomen beobachtet werden konnte (Kristinsson et al., 2009; Landgren et al., 2006b). Im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms können bei M. Hodgkin-Patienten autoreaktive Antikörper gebildet werden (Braund et al., 1987), die eine Immunthrombozytopenie und autoimmune hämolytische Anämie verursachen können, wobei der Ursprung der Antikörper nicht geklärt ist. Für die Herkunft aus einem neoplastischen Klon würde das Verschwinden von autoimmunen Zytopenien nach erfolgreicher Behandlung sprechen (Lechner und Chen, 2010). Nicht auszuschließen ist ebenfalls, dass diese als eine immunologische Reaktion auf den Tumor gebildet werden (Eisner et al., 1967). Die Analyse von 60 Patienten mit Hodgkin-Lymphom zeigte eine verglichen zur gesunden Normalbevölkerung geringfügig und nicht signifikant ($p = 0,624$) erhöhte Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 von 3,33 %.

Das Vorkommen von monoklonalen Proteinen konnte bei Non-Hodgkin-Lymphomen gezeigt werden (Economopoulos et al., 2003). Vor allem bei der CLL ist der Nachweis von klonalem Immunglobulin keine Seltenheit, meist konnten die Paraproteine als IgM und freie leichte Ketten identifiziert werden (Deegan et al., 1984; Kyle und Garton, 1987). Eine Spezifität für verschiedene Autoantigene wurde sowohl für die sekretorischen Immunglobuline (Sthoeger et al., 1989) als auch die Oberflächenrezeptoren von CLL-Zellen nachgewiesen (Binder et al., 2010; Lanemo Myhrinder et al., 2008), die sich klinisch z.B. in Form von autoimmunhämolytischer Anämie im Rahmen einer CLL die häufigste sekundäre

hämolytische Anämie, bemerkbar machen kann (Stoeger et al., 1993). Eine Paraproteinämie bei CLL wird mit einer verschlechterten Prognose in Verbindung gebracht (Maurer et al., 2011; Xu et al., 2011). Die Untersuchung von 50 CLL-Patienten konnte jedoch kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als potentiell Autoantigen identifizieren.

Seltener als bei der CLL kann eine Autoreaktivität der Rezeptoren auf den malignen B-Lymphozyten des folliculären Lymphoms bestehen, wobei die bisher bestimmten Zielproteine individualspezifisch waren (Sachen et al., 2012). Die malignen Zellen sind zudem zur Sekretion von teils polyreaktiven Autoantikörpern befähigt (Dighiero et al., 1991; Guyomard et al., 2003), Paraproteine vom IgM Typ wurden bei manchen Patienten detektiert (Lin et al., 2005). Über Autoimmunphänomene bei folliculären Lymphomen wurde bisher vereinzelt berichtet (Hidalgo et al., 2012; Krogel et al., 2010; Shimazu et al., 2012).

In einem Fall von folliculären NHL aus 50 (2 %) konnte hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachgewiesen werden, dies liegt somit im Durchschnitt der von Grass et al. (Grass et al., 2009) beschriebenen Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Gesunden.

Auch bei myeloischen Leukämien wurde auf das Vorkommen von monoklonalen Proteinen verwiesen (Naparstek et al., 1980; Shoenfeld et al., 1984). Die Ergebnisse der Analyse von 50 AML Patienten zeigen, dass die Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 als potentiell Autoantigen bei dieser Erkrankung im Vergleich zu Gesunden nicht erhöht ist, und bei CML darunter liegt.

Die Einschränkung der Aktivität der PP2A, dem Enzym, dessen Inaktivierung durch Phosphorylierung die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 und weiteren autoantigenen Zielproteinen zur Folge hat (Preuss et al., 2011), ist pathogenetisch auch bei anderen hämatologischen Neoplasien von Bedeutung.

So wird eine reduzierte Aktivität von PP2A auch in der Pathogenese der CML angenommen. Das charakterischerweise bei der CML nachzuweisende bcr-abl Fusionsgen erwies sich als mitverantwortlich für die Inaktivierung von PP2A durch Induktion des PP2A-Inhibitors SET. Die Autoren gehen weiterhin davon aus, dass PP2A den Abbau des Fusionsproteins fördert (Neviani et al., 2005). Auch bei einem Großteil der ALL-Zellen mit Philadelphia Translokation, die bei etwa 20-30 % der ALL bei Erwachsenen anzutreffen ist (Moorman et al., 2010), konnte demnach eine verminderte PP2A Aktivität festgestellt werden (Neviani et al., 2007). Bei 1 aus 12 ALL Proben entsprechend erscheint die Prävalenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 erhöht, jedoch nicht signifikant ($p = 0,255$). Angesichts des

geringen Probenumfangs kann hieraus jedoch keine Schlussfolgerung auf das gesamte Patientenkollektiv gezogen werden.

Gleiches gilt für die um das 15-fache (1 aus 3 Proben) im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Patienten mit Polycythaemia vera. Das sukzessive oder simultane Auftreten von Polycythaemia vera oder anderen myeloproliferativen Erkrankungen bei MGUS wird vereinzelt beschrieben (Cesana et al., 2002; Mailankody et al., 2011; Mian et al., 2006) und über eine hohe Inzidenz von monoklonaler Gammopathie bei Polycythämia vera wurde von Economopoulos berichtet (Economopoulos et al., 1989). Die Prävalenzerhöhung war nicht signifikant ($p = 0,072$). Bei der positiven Probe ließ sich kein Paraprotein gegen Paratarg-7 nachweisen. Sicher ist, dass ein größeres Patientenkollektiv nötig wäre, um repräsentative Ergebnisse zu erlangen.

In bcr-abl negativen AML-Zelllinien konnte neben der Hochregulation eines PP2A-Inhibitors (SET; Cristobal et al., 2012) der identische Inaktivierungsmechanismus von PP2A wie von Preuss et al. beschrieben (Preuss et al., 2011), die Phosphorylierung an Tyrosin307, ermittelt werden (Cristobal et al., 2011).

Auch bei der CLL konnte eine herabgesetzte PP2A Aktivität gezeigt werden. Christensen et al. demonstrierten, dass eine Inhibition von PP2A bei CLL auf die Überexpression des PP2A Antagonisten SET zurückzuführen ist, und höhere SET Konzentrationen einen ungünstigeren Verlauf der Erkrankung markieren (Christensen et al., 2011).

Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 wurde jedoch auch bei den untersuchten Erkrankungen, bei welchen eine reduzierte PP2A-Aktivität bereits beschrieben wurde, nicht öfter exprimiert.

Dies kann durch die Vielzahl der bislang gefundenen Isoformen von PP2A begründet werden, deren Untereinheit zur Katalyse verschiedener Substrate befähigt ist (Mumby, 2007), sodass es denkbar wäre, dass die reduzierte Aktivität von PP2A der untersuchten Krankheitsentitäten sich auf eine oder mehrere Isoformen bezieht, die sich von der für die Dephosphorylierung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 verantwortlichen Form unterscheiden.

Insgesamt ist das Auftreten von monoklonalen Proteinen bei anderen hämatologischen Erkrankungen seltener als bei MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström. Bei manchen der in dieser Arbeit untersuchten Erkrankungen ist es zweifelhaft, ob die Autoantikörper von den malignen Zellen selbst sezerniert werden. Beispielsweise sind die HRS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms nicht in der Lage, Immunglobuline zu bilden (Yung und Linch, 2003). Auch die Tatsache, dass Autoimmunglobuline mit unterschiedlicher Spezifität

bei einem Individuum gefunden werden können, spricht gegen die Herkunft aus einem neoplastischen Klon (Jardin et al., 2005).

In keinem Fall, in dem hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachgewiesen wurde, konnten Immunglobuline mit Spezifität gegen Paratarg-7 gefunden werden, wie zuvor auch über gesunde Kontrollen mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 berichtet (Grass et al., 2009).

Die Gesamthäufigkeit von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 beträgt 1,9 % der untersuchten hämatologischen Erkrankungen, ähnlich der Frequenz von 2 % in der gesunden Normalbevölkerung (Grass et al., 2009). Statistisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen fällt bei ALL und Polycythaemia vera eine höhere Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 auf, die nicht signifikant ist. Durch die kleine Probengröße bei ALL und den weiteren hämatologischen Erkrankungen sind die Ergebnisse nicht ausreichend repräsentativ, und der Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 in einer der Proben führt rechnerisch zu einer deutlichen Erhöhung der Prävalenz. Ebenfalls wäre es denkbar, dass in weiteren Proben kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachzuweisen ist und es zu einer Angleichung an die Frequenz bei Gesunden kommt. Aufgrund der geringen Fallzahl muss eine endgültige Bewertung für diese Gruppen ausstehend bleiben.

Bei allen Gruppen mit mindestens 50 Patienten konnte keine bzw. in der Hodgkin-Gruppe allenfalls leicht erhöhte Frequenz (3,3 %) von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 gefunden werden, die deutlich unter der zuvor beschriebenen Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström (Grass et al., 2009; Grass et al., 2011c) lag.

Weitere Untersuchungen an Patienten mit soliden Tumoren ergaben ebenfalls keine erhöhte Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7. Hierbei wurden Mamma- (1/50 = 2 %), Lungen- (0/50 = 0 %), Kolon- (0/50 = 0 %) und Prostatakarzinom (1/50 = 2 %) sowie Melanom (1/66 = 1,5 %) auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 getestet (Grass et al., 2011c).

Die bisherigen Ergebnisse sprechen sehr dafür, dass es sich bei Paratarg-7 um ein spezifisch bei Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström hyperphosphoryliertes Protein handelt. Dabei existieren neben hyperphosphoryliertem Paratarg-7 noch weitere hyperphosphorylierte Paraprotein-Zielstrukturen, die bei Patienten mit MGUS und Multiplem Myelom häufiger als bei Gesunden exprimiert werden. Zuletzt konnte von der gleichen

Forschungsgruppe die Hyperphosphorylierung bei Paratarg-8, ebenfalls ein Autoantigen der Paraproteine, dokumentiert werden. Hyperphosphoryliertes Paratarg-8 wird wie hyperphosphoryliertes Paratarg-7 autosomal-dominant vererbt, die Prävalenz in der gesunden Bevölkerung ist mit 0,5 % im Vergleich zu hyperphosphoryliertem Paratarg-7 geringer (Grass et al., 2011b). Daher sind bei MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström weitere hyperphosphorylierte Autoantigene neben Paratarg-7 und -8 nicht auszuschließen. Die Prävalenz weiterer hyperphosphorylierter Autoantigene bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Erkrankungen wurde nicht überprüft.

Bei den in ausreichendem Umfang getesteten Krankheitsentitäten ergab sich kein Anhalt, dass hyperphosphoryliertes Paratarg-7 pathogenetisch beteiligt ist.

Da bisher alle bekannten Autoantigene, gegen die die Paraproteine gerichtet sind, hyperphosphoryliert waren, lässt dies zur Vermutung führen, dass die Hyperphosphorylierung selbst im Zusammenhang mit der Pathogenese von MGUS/Multiplem Myelom und M. Waldenström steht. Nach Analyse weiterer hämatologischer und solider Neoplasien auf eines der identifizierten hyperphosphorylierten Paraproteine zeichnet sich ab, dass diese Modifikation von Autoantigenen spezifisch für MGUS/Multiplem Myelom und M. Waldenström zu sein scheint. Inwiefern die Hyperphosphorylierung zu einer autoimmunen Antwort mit nachfolgender Expansion und maligner Transformation führt oder als Nebenprodukt eines charakteristischerweise bei diesen Erkrankungen fehlgesteuerten Mechanismus (Grass et al., 2011b) anzusehen ist, bleibt nun zu eruieren, ebenso wie die Ursachen, die zur Inaktivierung der Phosphatase PP2A führen.

Die Kenntnis des autosomal-dominanten Erbgangs ermöglicht die Untersuchung nicht erkrankter Angehöriger von Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom oder M. Waldenström auf hyperphosphorylierte Paraproteine, um Risikopersonen frühzeitig zu erkennen. Bestandteil künftiger Untersuchungen wird es sein, dass die Inaktivierung der PP2A verursachende Gen zu bestimmen. Hierdurch würde sich die Möglichkeit eröffnen, Angehörige von Patienten auf das entsprechende Gen zu screenen, unabhängig davon, welches der bereits bekannten oder möglicherweise nicht bekannten hyperphosphorylierten Paraproteine sie exprimieren. Bei Kenntnis des verantwortlichen Gens sollte es zudem möglich sein, ein Tiermodell zu entwickeln, mit dem die Mechanismen, die der Pathogenese von MGUS, Multiplem Myelom und M. Waldenström über eine chronische Antigenstimulation zugrunde liegen, auf molekularer Ebene im Detail untersucht werden können.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phosphatase-Behandlung von Paratarg-7 (Grass et al., 2009)

Abb. 2: Sandwich ELISA (Nach Hornbeck et al., 2001)

Abb. 3: Indirekter ELISA (Nach Hornbeck et al., 2001)

Abb. 4: ELISA zur Bestimmung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 60 Hodgkin Patienten

Abb. 5: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 60 Patienten mit follikulärem Lymphom mittels ELISA

Abb. 6: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 CLL Patienten mittels ELISA

Abb. 7: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 CML Patienten mittels ELISA

Abb. 8: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 50 AML Patienten mittels ELISA

Abb. 9: Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei 12 ALL Patienten mittels ELISA.

Abb. 10: ELISA Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei Patienten mit weiteren hämatologischen Erkrankungen mittels ELISA

Abb. 11: Immunoblot nach isoelektrischer Fokussierung

Abb. 12: Immunoblot nach isoelektrischer Fokussierung

Abb. 13: Nachweis von anti-Paratarg-7 spezifischen Antikörpern mittels ELISA

6.2 Literaturverzeichnis

- Alexander, D. D.; Mink, P. J.; Adami, H. O.; Cole, P.; Mandel, J. S.; Oken, M. M. und Trichopoulos, D. (2007): Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature, *Int J Cancer* 120 Suppl 12, S. 40-61.
- Ansell, S. M.; Kyle, R. A.; Reeder, C. B.; Fonseca, R.; Mikhael, J. R.; Morice, W. G.; Bergsagel, P. L.; Buadi, F. K.; Colgan, J. P.; Dingli, D.; Dispenzieri, A.; Greipp, P. R.; Habermann, T. M.; Hayman, S. R.; Inwards, D. J.; Johnston, P. B.; Kumar, S. K.; Lacy, M. Q.; Lust, J. A.; Markovic, S. N.; Micallef, I. N.; Nowakowski, G. S.; Porrata, L. F.; Roy, V.; Russell, S. J.; Short, K. E.; Stewart, A. K.; Thompson, C. A.; Witzig, T. E.; Zeldenrust, S. R.; Dalton, R. J.; Rajkumar, S. V. und Gertz, M. A. (2010): Diagnosis and management of Waldenstrom macroglobulinemia: Mayo stratification of macroglobulinemia and risk-adapted therapy (mSMART) guidelines, *Mayo Clin Proc* 85 [9], S. 824-33.
- Benetatos, L. und Vartholomatos, G. (2012): Deregulated microRNAs in multiple myeloma, *Cancer* 118 [4], S. 878-87.
- Bierman, P. J.; Vose, J. M.; Langnas, A. N.; Rifkin, R. M.; Hauke, R. J.; Smir, B. N. und Greiner, T. C. (1996): Hodgkin's disease following solid organ transplantation, *Ann Oncol* 7 [3], S. 265-70.
- Binder, M.; Lechenne, B.; Ummanni, R.; Scharf, C.; Balabanov, S.; Trusch, M.; Schluter, H.; Braren, I.; Spillner, E. und Trepel, M. (2010): Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells, *PLoS One* 5 [12], S. e15992.
- Blade, J.; Cibeira, M. T.; Fernandez de Larrea, C. und Rosinol, L. (2010): Multiple myeloma, *Ann Oncol* 21 Suppl 7, S. vii313-vii319.
- Bloomfield, C. D.; Arthur, D. C.; Frizzera, G.; Levine, E. G.; Peterson, B. A. und Gajl-Peczalska, K. J. (1983): Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma, *Cancer Res* 43 [6], S. 2975-84.
- Boggs, D. R.; Wintrobe, M. M. und Cartwright, G. E. (1962): The acute leukemias. Analysis of 322 cases and review of the literature, *Medicine (Baltimore)* 41, S. 163-225.

- Braund, W. J.; Naylor, B. A.; Williamson, D. H.; Buley, I. D.; Clark, A.; Chapel, H. M. und Turner, R. C. (1987): Autoimmunity to insulin receptor and hypoglycaemia in patient with Hodgkin's disease, *Lancet* 1 [8527], S. 237-40.
- Breen, E. C.; Hussain, S. K.; Magpantay, L.; Jacobson, L. P.; Detels, R.; Rabkin, C. S.; Kaslow, R. A.; Variakojis, D.; Bream, J. H.; Rinaldo, C. R.; Ambinder, R. F. und Martinez-Maza, O. (2011): B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20 [7], S. 1303-14.
- Brown, L. M.; Gridley, G.; Check, D. und Landgren, O. (2008): Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders, *Blood* 111 [7], S. 3388-94.
- Brown, L. M.; Linet, M. S.; Greenberg, R. S.; Silverman, D. T.; Hayes, R. B.; Swanson, G. M.; Schwartz, A. G.; Schoenberg, J. B.; Pottern, L. M. und Fraumeni, J. F., Jr. (1999): Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S, *Cancer* 85 [11], S. 2385-90.
- Campo, E.; Swerdlow, S. H.; Harris, N. L.; Pileri, S.; Stein, H. und Jaffe, E. S. (2011): The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications, *Blood* 117 [19], S. 5019-32.
- Cao, W. F.; Zhang, L. Y.; Liu, M. B.; Tang, P. Z.; Liu, Z. H. und Sun, B. C. (2007a): Prognostic significance of stomatin-like protein 2 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: clinical, histologic, and immunohistochemistry analyses with tissue microarray, *Hum Pathol* 38 [5], S. 747-52.
- Cao, W.; Zhang, B.; Liu, Y.; Li, H.; Zhang, S.; Fu, L.; Niu, Y.; Ning, L.; Cao, X.; Liu, Z. und Sun, B. (2007b): High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival, *Am J Clin Pathol* 128 [3], S. 430-6.
- Carbone, A.; Spina, M.; Gloghini, A. und Tirelli, U. (2011): Classical Hodgkin's lymphoma arising in different host's conditions: pathobiology parameters, therapeutic options, and outcome, *Am J Hematol* 86 [2], S. 170-9.

- Cesana, C.; Klersy, C.; Barbarano, L.; Nosari, A. M.; Crugnola, M.; Pungolino, E.; Gargantini, L.; Granata, S.; Valentini, M. und Morra, E. (2002): Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma, *J Clin Oncol* 20 [6], S. 1625-34.
- Chiorazzi, N.; Rai, K. R. und Ferrarini, M. (2005): Chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med* 352 [8], S. 804-15.
- Christensen, D. J.; Chen, Y.; Oddo, J.; Matta, K. M.; Neil, J.; Davis, E. D.; Volkheimer, A. D.; Lanasa, M. C.; Friedman, D. R.; Goodman, B. K.; Gockerman, J. P.; Diehl, L. F.; de Castro, C. M.; Moore, J. O.; Vitek, M. P. und Weinberg, J. B. (2011): SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target, *Blood* 118 [15], S. 4150-8.
- Colwell, N. S.; Tollefsen, D. M. und Blinder, M. A. (1997): Identification of a monoclonal thrombin inhibitor associated with multiple myeloma and a severe bleeding disorder, *Br J Haematol* 97 [1], S. 219-26.
- Cristobal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Alonso, M. M.; Calasanz, M. J. und Odero, M. D. (2011): PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect, *Leukemia* 25 [4], S. 606-14.
- Cristobal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Cortes-Lavaud, X.; Garcia-Sanchez, M. A.; Calasanz, M. J. und Odero, M. D. (2012): Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia, *Haematologica* 97 [4], S. 543-50.
- Cui, Z.; Zhang, L.; Hua, Z.; Cao, W.; Feng, W. und Liu, Z. (2007): Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma, *Oncol Rep* 17 [4], S. 829-33.
- Cuzick, J. und De Stavola, B. (1988): Multiple myeloma--a case-control study, *Br J Cancer* 57 [5], S. 516-20.
- Dal Maso, L. und Franceschi, S. (2006): Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 [11], S. 2078-85.

- Dale, G. und Latner, A. L. (1968): Isoelectric focusing in polyacrylamide gels, *Lancet* 1 [7547], S. 847-8.
- Deegan, M. J.; Abraham, J. P.; Sawdyk, M. und Van Slyck, E. J. (1984): High incidence of monoclonal proteins in the serum and urine of chronic lymphocytic leukemia patients, *Blood* 64 [6], S. 1207-11.
- Dighiero, G.; Hart, S.; Lim, A.; Borche, L.; Levy, R. und Miller, R. A. (1991): Autoantibody activity of immunoglobulins isolated from B-cell follicular lymphomas, *Blood* 78 [3], S. 581-5.
- Dispenzieri, A.; Katzmann, J. A.; Kyle, R. A.; Larson, D. R.; Melton, L. J., 3rd; Colby, C. L.; Therneau, T. M.; Clark, R.; Kumar, S. K.; Bradwell, A.; Fonseca, R.; Jelinek, D. F. und Rajkumar, S. V. (2010): Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study, *Lancet* 375 [9727], S. 1721-8.
- Dolken, G.; Illerhaus, G.; Hirt, C. und Mertelsmann, R. (1996): BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases, *J Clin Oncol* 14 [4], S. 1333-44.
- Doody, M. M.; Linet, M. S.; Glass, A. G.; Friedman, G. D.; Pottern, L. M.; Boice, J. D., Jr. und Fraumeni, J. F., Jr. (1992): Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma following selected medical conditions, *Cancer Causes Control* 3 [5], S. 449-56.
- Drexler, H. G. (1992): Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material, *Leuk Lymphoma* 8 [4-5], S. 283-313.
- Economopoulos, T.; Economidou, J.; Papageorgiou, E.; Dervenoulas, J.; Christodoulides, C.; Pappa, V.; Karakassis, D.; Terzoglou, C.; Athanassiadou, S.; Chalevelakis, G. und et al. (1989): Monoclonal gammopathy in chronic myeloproliferative disorders, *Blut* 58 [1], S. 7-9.
- Economopoulos, T.; Papageorgiou, S.; Pappa, V.; Papageorgiou, E.; Valsami, S.; Kalantzis, D.; Xiros, N.; Dervenoulas, J. und Raptis, S. (2003): Monoclonal gammopathies in B-cell non-Hodgkin's lymphomas, *Leuk Res* 27 [6], S. 505-8.

- Edwards, B. K.; Brown, M. L.; Wingo, P. A.; Howe, H. L.; Ward, E.; Ries, L. A.; Schrag, D.; Jamison, P. M.; Jemal, A.; Wu, X. C.; Friedman, C.; Harlan, L.; Warren, J.; Anderson, R. N. und Pickle, L. W. (2005): Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment, *J Natl Cancer Inst* 97 [19], S. 1407-27.
- Eisele, L.; Durig, J.; Huttmann, A.; Duhrsen, U.; Assert, R.; Bokhof, B.; Erbel, R.; Mann, K.; Jockel, K. H. und Moebus, S. (2012): Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany, *Ann Hematol* 91 [2], S. 243-8.
- Eisner, E.; Ley, A. B. und Mayer, K. (1967): Coombs'-positive hemolytic anemia in Hodgkin's disease, *Ann Intern Med* 66 [2], S. 258-73.
- Engvall, E. (2010): The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin Chem* 56 [2], S. 319-20.
- Ferrara, F. und Schiffer, C. A. (2013): Acute myeloid leukaemia in adults, *Lancet* 381 [9865], S. 484-95.
- Fialkow, P. J.; Martin, P. J.; Najfeld, V.; Penfold, G. K.; Jacobson, R. J. und Hansen, J. A. (1981): Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia, *Blood* 58 [1], S. 158-63.
- Fisher, S. G. und Fisher, R. I. (2006): The emerging concept of antigen-driven lymphomas: epidemiology and treatment implications, *Curr Opin Oncol* 18 [5], S. 417-24.
- Forteza-Vila, J. und Fraga, M. (2010): Differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma, *Int J Surg Pathol* 18 [3 Suppl], S. 124S-127S.
- Fukuhara, S.; Nasu, K.; Kita, K.; Ueshima, Y.; Oguma, S.; Yamabe, H.; Nishigori, M. und Uchino, H. (1983): Cytogenetic approaches to the clarification of pathogenesis in lymphoid malignancies: clinicopathologic characterization of 14q+ marker-positive non-T-cell malignancies, *Jpn J Clin Oncol* 13 [3], S. 461-75.

- Fung, J. M.; Smith, R.; Brown, M. A.; Lau, S. H.; Xie, D.; Lau, G. K. und Guan, X. Y. (2009): Identification and characterization of a novel melanoma tumor suppressor gene on human chromosome 6q21, *Clin Cancer Res* 15 [3], S. 797-803.
- Goldin, L. R.; Pfeiffer, R. M.; Li, X. und Hemminki, K. (2004): Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database, *Blood* 104 [6], S. 1850-4.
- Grass, S.; Iida, S.; Wikowicz, A.; Preuss, K. D.; Inagaki, A.; Shimizu, K.; Ziepert, M.; Ueda, R. und Pfreundschuh, M. (2011a): Risk of Japanese carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasms, to develop monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma, *Cancer Sci* 102 [3], S. 565-8.
- Grass, S.; Preuss, K. D.; Ahlgrimm, M.; Fadle, N.; Regitz, E.; Pfoehler, C.; Murawski, N. und Pfreundschuh, M. (2009): Association of a dominantly inherited hyperphosphorylated paraprotein target with sporadic and familial multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case-control study, *Lancet Oncol* 10 [10], S. 950-6.
- Grass, S.; Preuss, K. D.; Thome, S.; Weisenburger, D. D.; Witt, V.; Lynch, J.; Zettl, F.; Trumper, L.; Fadle, N.; Regitz, E.; Lynch, H. und Pfreundschuh, M. (2011b): Paraproteins of familial MGUS/multiple myeloma target family-typical antigens: hyperphosphorylation of autoantigens is a consistent finding in familial and sporadic MGUS/MM, *Blood* 118 [3], S. 635-7.
- Grass, S.; Preuss, K. D.; Wikowicz, A.; Terpos, E.; Ziepert, M.; Nikolaus, D.; Yang, Y.; Fadle, N.; Regitz, E.; Dimopoulos, M. A.; Treon, S. P.; Hunter, Z. R. und Pfreundschuh, M. (2011c): Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenstrom macroglobulinemia, *Blood* 117 [10], S. 2918-23.
- Greaves, M. F. (1997): Aetiology of acute leukaemia, *Lancet* 349 [9048], S. 344-9.
- Groves, F. D.; Travis, L. B.; Devesa, S. S.; Ries, L. A. und Fraumeni, J. F., Jr. (1998): Waldenstrom's macroglobulinemia: incidence patterns in the United States, 1988-1994, *Cancer* 82 [6], S. 1078-81.

- Guyomard, S.; Salles, G.; Coudurier, M.; Rousset, H.; Coiffier, B.; Biennu, J. und Fabien, N. (2003): Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin's lymphoma, *Br J Haematol* 123 [1], S. 90-9.
- Hehlmann, R.; Hochhaus, A. und Baccarani, M. (2007): Chronic myeloid leukaemia, *Lancet* 370 [9584], S. 342-50.
- Hensel, M.; Goetzenich, A.; Lutz, T.; Stoehr, A.; Moll, A.; Rockstroh, J.; Hanhoff, N.; Jager, H. und Mosthaf, F. (2011): HIV and Cancer in Germany, *Dtsch Arztebl Int* 108 [8], S. 117-22.
- Herbst, H. (1996): Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease, *Semin Cancer Biol* 7 [4], S. 183-9.
- Herida, M.; Mary-Krause, M.; Kaphan, R.; Cadranel, J.; Poizot-Martin, I.; Rabaud, C.; Plaisance, N.; Tissot-Dupont, H.; Boue, F.; Lang, J. M. und Costagliola, D. (2003): Incidence of non-AIDS-defining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients, *J Clin Oncol* 21 [18], S. 3447-53.
- Hidalgo, I.; Martinez, F.; Grau, C.; Gil, I. und Azon, A. (2012): [Follicular lymphoma with paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome], *Actas Dermosifiliogr* 103 [3], S. 244-6.
- Hoelzer, D. und Gokbuget, N. (2000): Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults, *Crit Rev Oncol Hematol* 36 [1], S. 49-58.
- Hornbeck, P.; Winston, S. E. und Fuller, S. A. (2001): Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 11, S. Unit11 2.
- Horsman, D. E.; Connors, J. M.; Pantzar, T. und Gascoyne, R. D. (2001): Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18), *Genes Chromosomes Cancer* 30 [4], S. 375-82.
- Hsu, W. L.; Preston, D. L.; Soda, M.; Sugiyama, H.; Funamoto, S.; Kodama, K.; Kimura, A.; Kamada, N.; Dohy, H.; Tomonaga, M.; Iwanaga, M.; Miyazaki, Y.; Cullings, H. M.; Suyama, A.; Ozasa, K.; Shore, R. E. und Mabuchi, K. (2013): The Incidence of

Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950-2001, *Radiat Res.*

Iida, S.; Rao, P. H.; Nallasivam, P.; Hibshoosh, H.; Butler, M.; Louie, D. C.; Dyomin, V.; Ohno, H.; Chaganti, R. S. und Dalla-Favera, R. (1996): The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene, *Blood* 88 [11], S. 4110-7.

International Myeloma Working Group (2003): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group, *Br J Haematol* 121 [5], S. 749-57.

Jaffe, E. S.; Harris, N. L.; Stein, H. und Isaacson, P. G. (2008): Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery, *Blood* 112 [12], S. 4384-99.

Jardin, F.; Levesque, H. und Tilly, H. (2005): [Auto-immune manifestations in Non-Hodgkin's lymphoma], *Rev Med Interne* 26 [7], S. 557-71.

Ji, J.; Shu, X.; Li, X.; Sundquist, K.; Sundquist, J. und Hemminki, K. (2009): Cancer risk in hospitalised asthma patients, *Br J Cancer* 100 [5], S. 829-33.

Karube, K.; Nakagawa, M.; Tsuzuki, S.; Takeuchi, I.; Honma, K.; Nakashima, Y.; Shimizu, N.; Ko, Y. H.; Morishima, Y.; Ohshima, K.; Nakamura, S. und Seto, M. (2011): Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor-suppressor gene candidates in NK-cell neoplasms by genomic and functional analyses, *Blood* 118 [12], S. 3195-204.

Khalade, A.; Jaakkola, M. S.; Pukkala, E. und Jaakkola, J. J. (2010): Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Environ Health* 9, S. 31.

Khan, M. M.; Mori, M.; Sakauchi, F.; Matsuo, K.; Ozasa, K. und Tamakoshi, A. (2006): Risk factors for multiple myeloma: evidence from the Japan Collaborative Cohort (JACC) study, *Asian Pac J Cancer Prev* 7 [4], S. 575-81.

Kolin, A. (1954): Separation and Concentration of Proteins in a Ph Field Combined Withan Electric Field, *Journal of Chemical Physics* 22 [9], S. 1628-1629.

- Koshiol, J.; Gridley, G.; Engels, E. A.; McMaster, M. L. und Landgren, O. (2008): Chronic immune stimulation and subsequent Waldenstrom macroglobulinemia, *Arch Intern Med* 168 [17], S. 1903-9.
- Kristinsson, S. Y.; Bjorkholm, M.; Goldin, L. R.; McMaster, M. L.; Turesson, I. und Landgren, O. (2008): Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden, *Blood* 112 [8], S. 3052-6.
- Kristinsson, S. Y.; Landgren, O.; Sjoberg, J.; Turesson, I.; Bjorkholm, M. und Goldin, L. R. (2009): Autoimmunity and risk for Hodgkin's lymphoma by subtype, *Haematologica* 94 [10], S. 1468-9.
- Krogel, C.; Fischer, T. und Heidel, F. (2010): Severe paraneoplastic pemphigus in a patient with follicular lymphoma, *Eur J Haematol* 84 [4], S. 365.
- Kuehl, W. M. und Bergsagel, P. L. (2012): Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor, *J Clin Invest* 122 [10], S. 3456-63.
- Kuppers, R. und Rajewsky, K. (1998): The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease, *Annu Rev Immunol* 16, S. 471-93.
- Kurien, B. T. und Scofield, R. H. (2006): Western blotting, *Methods* 38 [4], S. 283-93.
- Kyle, R. A. (1978): Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases, *Am J Med* 64 [5], S. 814-26.
- Kyle, R. A. (1993): "Benign" monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up, *Mayo Clin Proc* 68 [1], S. 26-36.
- Kyle, R. A. (2000): Multiple myeloma: an odyssey of discovery, *Br J Haematol* 111 [4], S. 1035-44.
- Kyle, R. A. und Garton, J. P. (1987): The spectrum of IgM monoclonal gammopathy in 430 cases, *Mayo Clin Proc* 62 [8], S. 719-31.
- Kyle, R. A.; Therneau, T. M.; Rajkumar, S. V.; Larson, D. R.; Plevak, M. F.; Offord, J. R.; Dispenzieri, A.; Katzmann, J. A. und Melton, L. J., 3rd (2006): Prevalence of

monoclonal gammopathy of undetermined significance, *N Engl J Med* 354 [13], S. 1362-9.

Kyle, R. A.; Therneau, T. M.; Rajkumar, S. V.; Offord, J. R.; Larson, D. R.; Plevak, M. F. und Melton, L. J., 3rd (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance, *N Engl J Med* 346 [8], S. 564-9.

Kyle, R. A.; Therneau, T. M.; Rajkumar, S. V.; Remstein, E. D.; Offord, J. R.; Larson, D. R.; Plevak, M. F. und Melton, L. J., 3rd (2003a): Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance, *Blood* 102 [10], S. 3759-64.

Kyle, R. A.; Treon, S. P.; Alexanian, R.; Barlogie, B.; Bjorkholm, M.; Dhodapkar, M.; Lister, T. A.; Merlini, G.; Morel, P.; Stone, M.; Branagan, A. R. und Leblond, V. (2003b): Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia, *Semin Oncol* 30 [2], S. 116-20.

Landgren, O.; Bjorkholm, M.; Montgomery, S. M.; Hjalgrim, H.; Sjoberg, J.; Goldin, L. R. und Askling, J. (2006a): Personal and family history of autoimmune diabetes mellitus and susceptibility to young-adult-onset Hodgkin lymphoma, *Int J Cancer* 118 [2], S. 449-52.

Landgren, O.; Engels, E. A.; Pfeiffer, R. M.; Gridley, G.; Mellemkjaer, L.; Olsen, J. H.; Kerstann, K. F.; Wheeler, W.; Hemminki, K.; Linet, M. S. und Goldin, L. R. (2006b): Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case-control study in Scandinavia, *J Natl Cancer Inst* 98 [18], S. 1321-30.

Landgren, O.; Gridley, G.; Turesson, I.; Caporaso, N. E.; Goldin, L. R.; Baris, D.; Fears, T. R.; Hoover, R. N. und Linet, M. S. (2006c): Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States, *Blood* 107 [3], S. 904-6.

Landgren, O.; Linet, M. S.; McMaster, M. L.; Gridley, G.; Hemminki, K. und Goldin, L. R. (2006d): Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study, *Int J Cancer* 118 [12], S. 3095-8.

- Landgren, O. und Weiss, B. M. (2009): Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis, *Leukemia* 23 [10], S. 1691-7.
- Lanemo Myhrinder, A.; Hellqvist, E.; Sidorova, E.; Soderberg, A.; Baxendale, H.; Dahle, C.; Willander, K.; Tobin, G.; Backman, E.; Soderberg, O.; Rosenquist, R.; Horkko, S. und Rosen, A. (2008): A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies, *Blood* 111 [7], S. 3838-48.
- Larsson, S. C. und Wolk, A. (2007): Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis, *Int J Cancer* 121 [11], S. 2512-6.
- Lechner, K. und Chen, Y. A. (2010): Paraneoplastic autoimmune cytopenias in Hodgkin lymphoma, *Leuk Lymphoma* 51 [3], S. 469-74.
- Levine, E. G.; Arthur, D. C.; Frizzera, G.; Peterson, B. A.; Hurd, D. D. und Bloomfield, C. D. (1985): There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas, *Blood* 66 [6], S. 1414-22.
- Levy, Y.; Labaume, S.; Gendron, M. C. und Brouet, J. C. (1994): Modulation of spontaneous B-cell differentiation in macroglobulinemia by retinoic acid, *Blood* 83 [8], S. 2206-10.
- Lewis, D. R.; Pottern, L. M.; Brown, L. M.; Silverman, D. T.; Hayes, R. B.; Schoenberg, J. B.; Greenberg, R. S.; Swanson, G. M.; Schwartz, A. G.; Liff, J. M. und et al. (1994): Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation, *Cancer Causes Control* 5 [6], S. 529-39.
- Lin, P.; Hao, S.; Handy, B. C.; Bueso-Ramos, C. E. und Medeiros, L. J. (2005): Lymphoid neoplasms associated with IgM paraprotein: a study of 382 patients, *Am J Clin Pathol* 123 [2], S. 200-5.
- Mailankody, S.; Pfeiffer, R. M.; Kristinsson, S. Y.; Korde, N.; Bjorkholm, M.; Goldin, L. R.; Turesson, I. und Landgren, O. (2011): Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after multiple myeloma and its precursor disease (MGUS), *Blood* 118 [15], S. 4086-92.

- Matutes, E.; Owusu-Ankomah, K.; Morilla, R.; Garcia Marco, J.; Houlihan, A.; Que, T. H. und Catovsky, D. (1994): The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL, *Leukemia* 8 [10], S. 1640-5.
- Maurer, M. J.; Cerhan, J. R.; Katzmann, J. A.; Link, B. K.; Allmer, C.; Zent, C. S.; Call, T. G.; Rabe, K. G.; Hanson, C. A.; Kay, N. E.; Slager, S. L.; Witzig, T. E. und Shanafelt, T. D. (2011): Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 118 [10], S. 2821-6.
- Mellemkjaer, L.; Linet, M. S.; Gridley, G.; Frisch, M.; Moller, H. und Olsen, J. H. (1996): Rheumatoid arthritis and cancer risk, *Eur J Cancer* 32A [10], S. 1753-7.
- Meyer, V. S.; Drews, O.; Gunder, M.; Hennenlotter, J.; Rammensee, H. G. und Stevanovic, S. (2009): Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands, *J Proteome Res* 8 [7], S. 3666-74.
- Mian, M.; Psenak, O.; Greil, R.; Fiegl, M. und Tzankov, A. (2006): Diffuse large B-cell lymphoma as a second, clonally unrelated lymphoproliferative disease in a patient with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and concomitant polycythemia vera rubra, *Leuk Lymphoma* 47 [5], S. 940-3.
- Mohammed, F.; Cobbold, M.; Zarling, A. L.; Salim, M.; Barrett-Wilt, G. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Engelhard, V. H. und Willcox, B. E. (2008): Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for the presentation of transformed self, *Nat Immunol* 9 [11], S. 1236-43.
- Moorman, A. V.; Chilton, L.; Wilkinson, J.; Ensor, H. M.; Bown, N. und Proctor, S. J. (2010): A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 115 [2], S. 206-14.
- Mumby, M. (2007): PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor, *Cell* 130 [1], S. 21-4.
- Nambiar, M. und Raghavan, S. C. (2009): Prevalence and analysis of t(14;18) and t(11;14) chromosomal translocations in healthy Indian population, *Ann Hematol*.

- Naparstek, Y.; Zlotnick, A. und Polliack, A. (1980): Coexistent chronic myeloid leukemia and IgA monoclonal gammopathy: report of a case and review of the literature, *Am J Med Sci* 279 [2], S. 111-5.
- Neviani, P.; Santhanam, R.; Oaks, J. J.; Eiring, A. M.; Notari, M.; Blaser, B. W.; Liu, S.; Trotta, R.; Muthusamy, N.; Gambacorti-Passerini, C.; Druker, B. J.; Cortes, J.; Marcucci, G.; Chen, C. S.; Verrills, N. M.; Roy, D. C.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D.; Byrd, J. C. und Perrotti, D. (2007): FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia, *J Clin Invest* 117 [9], S. 2408-21.
- Neviani, P.; Santhanam, R.; Trotta, R.; Notari, M.; Blaser, B. W.; Liu, S.; Mao, H.; Chang, J. S.; Galiotta, A.; Uttam, A.; Roy, D. C.; Valtieri, M.; Bruner-Klisovic, R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D.; Marcucci, G. und Perrotti, D. (2005): The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein, *Cancer Cell* 8 [5], S. 355-68.
- Opelz, G. und Henderson, R. (1993): Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients, *Lancet* 342 [8886-8887], S. 1514-6.
- Owczarek, C. M.; Treutlein, H. R.; Portbury, K. J.; Gulluyan, L. M.; Kola, I. und Hertzog, P. J. (2001): A novel member of the STOMATIN/EPB72/mec-2 family, stomatin-like 2 (STOML2), is ubiquitously expressed and localizes to HSA chromosome 9p13.1, *Cytogenet Cell Genet* 92 [3-4], S. 196-203.
- Porstmann, T. und Kiessig, S. T. (1992): Enzyme immunoassay techniques. An overview, *J Immunol Methods* 150 [1-2], S. 5-21.
- Preston-Martin, S.; Thomas, D. C.; Yu, M. C. und Henderson, B. E. (1989): Diagnostic radiography as a risk factor for chronic myeloid and monocytic leukaemia (CML), *Br J Cancer* 59 [4], S. 639-44.
- Preuss, K. D.; Held, G.; Kubuschok, B.; Hung, C. Z.; Malatsidze, N.; Wagner, M. und Pfreundschuh, M. (2007): Identification of antigenic targets of paraproteins by expression cloning does not support a causal role of chronic antigenic stimulation in the pathogenesis of multiple myeloma and MGUS, *Int J Cancer* 121 [2], S. 459-61.

Preuss, K. D.; Pfreundschuh, M.; Ahlgrimm, M.; Fadle, N.; Regitz, E.; Murawski, N. und Grass, S. (2009): A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS, *Int J Cancer* 125 [3], S. 656-61.

Preuss, K. D.; Pfreundschuh, M.; Fadle, N.; Regitz, E.; Raudies, S.; Murwaski, N.; Ahlgrimm, M.; Bittenbring, J.; Klotz, M.; Schafer, K. H.; Held, G.; Neumann, F. und Grass, S. (2011): Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A, *Blood* 118 [12], S. 3340-6.

Pui, C. H.; Robison, L. L. und Look, A. T. (2008): Acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet* 371 [9617], S. 1030-43.

Raab, M. S.; Podar, K.; Breitkreutz, I.; Richardson, P. G. und Anderson, K. C. (2009): Multiple myeloma, *Lancet* 374 [9686], S. 324-39.

Renahan, A. G.; Tyson, M.; Egger, M.; Heller, R. F. und Zwahlen, M. (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies, *Lancet* 371 [9612], S. 569-78.

Righetti, P. G. (1983): Isoelectric focusing : theory, methodology, and applications, Elsevier Biomedical, Amsterdam ; Oxford, ISBN: 0444804676 (pbk.)

0444804986 (hbk.)

0720442001 (series).

Rowley, J. D. (1973): Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature* 243 [5405], S. 290-3.

Rozman, C. und Montserrat, E. (1995): Chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med* 333 [16], S. 1052-7.

Sachen, K. L.; Strohman, M. J.; Singletary, J.; Alizadeh, A. A.; Kattah, N. H.; Lossos, C.; Mellins, E. D.; Levy, S. und Levy, R. (2012): Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors, *Blood* 120 [20], S. 4182-90.

- Sahin, U.; Tureci, O.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schobert, I. und Pfreundschuh, M. (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [25], S. 11810-3.
- Salles, G. A. (2007): Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 216-25.
- Sawyers, C. L. (1999): Chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 340 [17], S. 1330-40.
- Schaar, C. G.; le Cessie, S.; Snijder, S.; Franck, P. F.; Wijermans, P. W.; Ong, C. und Kluij-Nelemans, H. (2009): Long-term follow-up of a population based cohort with monoclonal proteinaemia, *Br J Haematol* 144 [2], S. 176-84.
- Schmitz, R.; Stanelle, J.; Hansmann, M. L. und Kuppers, R. (2009): Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma, *Annu Rev Pathol* 4, S. 151-74.
- Schop, R. F.; Kuehl, W. M.; Van Wier, S. A.; Ahmann, G. J.; Price-Troska, T.; Bailey, R. J.; Jalal, S. M.; Qi, Y.; Kyle, R. A.; Greipp, P. R. und Fonseca, R. (2002): Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions, *Blood* 100 [8], S. 2996-3001.
- Schuler, F.; Dolken, L.; Hirt, C.; Kiefer, T.; Berg, T.; Fusch, G.; Weitmann, K.; Hoffmann, W.; Fusch, C.; Janz, S.; Rabkin, C. S. und Dolken, G. (2009): Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals, *Int J Cancer* 124 [4], S. 958-63.
- Shimazu, Y.; Minakawa, E. N.; Nishikori, M.; Ihara, M.; Hashi, Y.; Matsuyama, H.; Hishizawa, M.; Yoshida, S.; Kitano, T.; Kondo, T.; Ishikawa, T.; Takahashi, R. und Takaori-Kondo, A. (2012): A case of follicular lymphoma associated with paraneoplastic cerebellar degeneration, *Intern Med* 51 [11], S. 1387-92.
- Shoenfeld, Y.; Berliner, S.; Ayalone, A.; Shaklai, M.; Djaldetti, M.; Pick, A. I. und Pinkhas, J. (1984): Monoclonal gammopathy in patients with chronic and acute myeloid leukemia, *Cancer* 54 [2], S. 280-3.

- Simard, E. P. und Engels, E. A. (2010): Cancer as a cause of death among people with AIDS in the United States, *Clin Infect Dis* 51 [8], S. 957-62.
- Singh, J.; Dudley, A. W., Jr. und Kulig, K. A. (1990): Increased incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance in blacks and its age-related differences with whites on the basis of a study of 397 men and one woman in a hospital setting, *J Lab Clin Med* 116 [6], S. 785-9.
- Smedby, K. E.; Askling, J.; Mariette, X. und Baecklund, E. (2008): Autoimmune and inflammatory disorders and risk of malignant lymphomas--an update, *J Intern Med* 264 [6], S. 514-27.
- Smedby, K. E.; Hjalgrim, H.; Askling, J.; Chang, E. T.; Gregersen, H.; Porwit-MacDonald, A.; Sundstrom, C.; Akerman, M.; Melbye, M.; Glimelius, B. und Adami, H. O. (2006): Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype, *J Natl Cancer Inst* 98 [1], S. 51-60.
- Soderberg, K. C.; Hagmar, L.; Schwartzbaum, J. und Feychting, M. (2004): Allergic conditions and risk of hematological malignancies in adults: a cohort study, *BMC Public Health* 4, S. 51.
- Speer, S. A.; Semenza, J. C.; Kurosaki, T. und Anton-Culver, H. (2002): Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies, *J Environ Health* 64 [7], S. 9-16; quiz 35-6.
- Stewart, G. W.; Argent, A. C. und Dash, B. C. (1993): Stomatin: a putative cation transport regulator in the red cell membrane, *Biochim Biophys Acta* 1225 [1], S. 15-25.
- Sthoeger, Z. M.; Sthoeger, D.; Shtalrid, M.; Sigler, E.; Geltner, D. und Berrebi, A. (1993): Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia, *Am J Hematol* 43 [4], S. 259-64.
- Sthoeger, Z. M.; Wakai, M.; Tse, D. B.; Vinciguerra, V. P.; Allen, S. L.; Budman, D. R.; Lichtman, S. M.; Schulman, P.; Weiselberg, L. R. und Chiorazzi, N. (1989): Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia, *J Exp Med* 169 [1], S. 255-68.

- Townsend, W. und Linch, D. (2012): Hodgkin's lymphoma in adults, *Lancet* 380 [9844], S. 836-47.
- Treon, S. P.; Hunter, Z. R.; Aggarwal, A.; Ewen, E. P.; Masota, S.; Lee, C.; Santos, D. D.; Hatjiharissi, E.; Xu, L.; Leleu, X.; Tournilhac, O.; Patterson, C. J.; Manning, R.; Branagan, A. R. und Morton, C. C. (2006): Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia, *Ann Oncol* 17 [3], S. 488-94.
- Tsai, H. T.; Caporaso, N. E.; Kyle, R. A.; Katzmann, J. A.; Dispenzieri, A.; Hayes, R. B.; Marti, G. E.; Albitar, M.; Ghia, P.; Rajkumar, S. V. und Landgren, O. (2009): Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study, *Blood* 114 [24], S. 4928-32.
- Vanura, K.; Spath, F.; Gleiss, A.; Le, T.; Porpaczy, E.; Skrabs, C.; Hauswirth, A.; Fleiss, K.; Wessely, F.; Gaiger, A.; Mullauer, L. und Jager, U. (2011): Prevalence and clinical impact of autoimmune diseases and chronic infections in malignant lymphomas at diagnosis, *Ann Hematol*.
- Vardiman, J. W. (2010): The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms, *Chem Biol Interact* 184 [1-2], S. 16-20.
- Visser, O.; Trama, A.; Maynadie, M.; Stiller, C.; Marcos-Gragera, R.; De Angelis, R.; Mallone, S.; Tereanu, C.; Allemani, C.; Ricardi, U. und Schouten, H. C. (2012): Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe, *Eur J Cancer* 48 [17], S. 3257-66.
- Vlaanderen, J.; Lan, Q.; Kromhout, H.; Rothman, N. und Vermeulen, R. (2012): Occupational benzene exposure and the risk of chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies incorporating study quality dimensions, *Am J Ind Med* 55 [9], S. 779-85.
- Wadhera, R. K. und Rajkumar, S. V. (2010): Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review, *Mayo Clin Proc* 85 [10], S. 933-42.
- Wallin, A. und Larsson, S. C. (2011): Body mass index and risk of multiple myeloma: A meta-analysis of prospective studies, *Eur J Cancer*.

- Wang, H.; Chen, Y.; Li, F.; Delasalle, K.; Wang, J.; Alexanian, R.; Kwak, L.; Rustveld, L.; Du, X. L. und Wang, M. (2012): Temporal and geographic variations of Waldenstrom macroglobulinemia incidence: a large population-based study, *Cancer* 118 [15], S. 3793-800.
- Wang, S. S.; Slager, S. L.; Brennan, P.; Holly, E. A.; De Sanjose, S.; Bernstein, L.; Boffetta, P.; Cerhan, J. R.; Maynadie, M.; Spinelli, J. J.; Chiu, B. C.; Cocco, P. L.; Mensah, F.; Zhang, Y.; Nieters, A.; Dal Maso, L.; Bracci, P. M.; Costantini, A. S.; Vineis, P.; Severson, R. K.; Roman, E.; Cozen, W.; Weisenburger, D.; Davis, S.; Franceschi, S.; La Vecchia, C.; Foretova, L.; Becker, N.; Staines, A.; Vornanen, M.; Zheng, T. und Hartge, P. (2007): Family history of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a pooled analysis of 10 211 cases and 11 905 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph), *Blood* 109 [8], S. 3479-88.
- Wang, Y. und Morrow, J. S. (2000): Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues, *J Biol Chem* 275 [11], S. 8062-71.
- Xie, X.; Schmits, R.; Renner, C.; Preuss, D.; Kubuschok, B. und Pfreundschuh, M. (2001): Systematic search and molecular characterization of the antigenic targets of myeloma immunoglobulins: a monoclonal IgA from a female patient targeting sperm-specific cyclicin II, *Cancer Immun* 1, S. 11.
- Xu, W.; Wang, Y. H.; Fan, L.; Fang, C.; Zhu, D. X.; Wang, D. M.; Qiao, C.; Wu, Y. J. und Li, J. Y. (2011): Prognostic significance of serum immunoglobulin paraprotein in patients with chronic lymphocytic leukemia, *Leuk Res* 35 [8], S. 1060-5.
- Yasukawa, M.; Bando, S.; Dolken, G.; Sada, E.; Yakushijin, Y.; Fujita, S. und Makino, H. (2001): Low frequency of BCL-2/J(H) translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals, *Blood* 98 [2], S. 486-8.
- Yeoh, L. C.; Loh, C. K.; Gooi, B. H.; Singh, M. und Gam, L. H. (2010): Hydrophobic protein in colorectal cancer in relation to tumor stages and grades, *World J Gastroenterol* 16 [22], S. 2754-63.

Yin, C. C.; Lin, P.; Carney, D. A.; Handy, B. C.; Rassidakis, G. Z.; Admirand, J. H.; Keating, M. J. und Medeiros, L. J. (2005): Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma associated with IgM paraprotein, *Am J Clin Pathol* 123 [4], S. 594-602.

Yung, L. und Linch, D. (2003): Hodgkin's lymphoma, *Lancet* 361 [9361], S. 943-51.

Zhang, L.; Ding, F.; Cao, W.; Liu, Z.; Liu, W.; Yu, Z.; Wu, Y.; Li, W. und Li, Y. (2006): Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 12 [5], S. 1639-46.

7 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh für die durchgehende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit sowie die sorgfältige wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater.

Dr. rer. nat. Frank Neumann war für mich ein jederzeit zuverlässiger Ansprechpartner. Für die sehr gute Betreuung, die wertvollen Ratschläge und Anregungen bedanke ich mich vielmals.

Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Preuß und Frau Dr. med. Sandra Grass spreche ich für die Durchsicht des Manuskripts meinen Dank aus.

Natalie Fadle danke ich für die Unterstützung während der Einarbeitung der Methoden, sowie die Hilfsbereitschaft und stets freundliche Auskunft bei Rückfragen.

Bei Frau Dr. Marita Ziepert bedanke ich mich für die statistische Beratung.

Dem Team des José Carreras-Zentrums Homburg danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

Allen Patienten, die an dieser Untersuchung teilgenommen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir in allen Lagen hilfreich zur Seite standen.

8 Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht enthalten.