

Aus der Klinik für Innere Medizin I

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)

Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie

Direktor: Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh

Bedeutung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 in der Pathogenese solider Tumoren

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Homburg/ Saar

vorgelegt von:

Diana Susanne Nikolaus

geb. am 12.11.1987 in Neustadt an der Weinstraße

2011

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	5
II. Summary	6
III. Einleitung	7
1. Monoklonale Gammopathien und die Rolle von Paraproteinen.....	7
2. Antigene Zielstrukturen von Paraproteinen.....	10
3. Paratarg- 7, ein Zielantigen von Paraproteinen bei MGUS, Multiplem Myelom und Morbus Waldenström.....	12
4. Ziele der Arbeit.....	17
IV. Patienten, Material und Methodik	18
1. Patienten.....	18
2. Material und Methodik.....	19
2.1 ELISA.....	22
2.1.1 Allgemeines Prinzip.....	22
2.1.2 Durchführung.....	23
2.1.3 Ausschluss eines Multiplen Myeloms bei positiven Proben.....	24
2.2 Isoelektrische Fokussierung.....	25
2.2.1 Allgemeines Prinzip.....	25
2.2.2 Durchführung.....	25
V. Ergebnisse	27
VI. Diskussion	32
VII. Literaturverzeichnis	36
VIII. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	39
IX. Danksagung	40

Abkürzungen

Ca:	Karzinom
cDNA:	„complementary DNA“
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fab:	Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers
Fc:	Konstante Region des Antikörpers (Fc-Teil)
HEK:	Zelllinie aus humaner embryonaler Niere (human embryonic kidney) (ATCC # CRC-1573)
IEF:	Isoelektrische Fokussierung
Ig:	Immunglobulin
MGUS:	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM:	Multiples Myelom
MW/ WM:	Morbus Waldenström
PBS:	phosphate-buffered saline
Paratarg-7/P-7:	Paraprotein-Target 7
pP-7:	hyperphosphoryliertes Paratarg-7
PP2A:	Protein Phosphatase 2A
RT:	Raumtemperatur
SEREX:	serological identification of antigens by expression cloning
SLP-2:	stomatin like protein-2
TBS:	tris-buffered saline

I. Zusammenfassung

Die Pathogenese der monoklonalen Gammopathien, zu deren Hauptvertretern die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), das Multiple Myelom (MM) und der Morbus Waldenström (MW) gehören, ist bisher unbekannt. Viele Studienergebnisse sprechen dafür, dass eine chronische Antigenstimulation eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Neoplasien spielt. Unserer Arbeitsgruppe gelang die Identifikation von Paratarg-7 (P-7), einem körpereigenen Paraprotein-Ziel-Antigen, das von 15% aller IgA- und IgG-Paraprotein-haltiger Seren von MGUS/MM Patienten und von 11% aller IgM-Paraprotein-haltiger Seren von MW und IgM-MGUS Patienten spezifisch erkannt wird. Paratarg-7 ist bei allen Patienten, die ein Paratarg-7-spezifisches Paraprotein aufweisen, hyperphosphoryliert (pP-7). Eine solche Modifikation findet sich nur bei 2% der gesunden Kontrollen. Polymorphismen und Mutationen von P-7 konnten ausgeschlossen werden. Familienanalysen zeigen, dass die hyperphosphorylierte Variante von Paratarg-7 (pP-7) dominant vererbt wird. Träger von pP-7 haben ein 7,9-fach erhöhtes Risiko, ein multiples Myelom oder IgA-, IgG-MGUS und ein 6,2-fach erhöhtes Risiko ein IgM-MGUS oder einen MW zu entwickeln.

Um die Frage zu beantworten, wie häufig hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (pP-7) bei Patienten mit soliden Tumoren nachzuweisen ist und ob es eine Rolle in der Pathogenese dieser Tumoren spielt, wurden 250 Patienten, die an unterschiedlichen Tumorentitäten erkrankt waren (jeweils 50 Patienten mit Bronchial-Karzinom, Mamma-Karzinom, malignem Melanom, Prostata-Karzinom und Colon-Karzinom) mittels ELISA und isoelektrischer Fokussierung auf das Vorhandensein von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten für solide Tumoren eine Prävalenz von etwa 2% (0/50 Bronchial-Ca, 1/50 Mamma-Ca, 1/50 malignes Melanom, 1/50 Prostata-Ca, 0/50 Colon-Ca). Dies entspricht der Prävalenz von pP-7 in der gesunden Normalbevölkerung.

Im Gegensatz zu Patienten mit MGUS, MM und WM kommt die Trägerschaft von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 bei soliden Tumoren nicht gehäuft vor. Träger von pP-7 haben also kein erhöhtes Risiko, an soliden Tumoren zu erkranken.

II. Summary

Significance of hyperphosphorylated paratarg-7 in the pathogenesis of solid tumors

Chronic antigenic stimulation might play a role in the pathogenesis of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) - an asymptomatic precursor condition that often precedes in multiple myeloma - and Waldenstrom macroglobulinemia.

We recently described paratarg-7 (P-7), a protein of unknown function, as the target of 15% of IgA and IgG paraproteins in MGUS and multiple myeloma (MM) and of 11% of IgM paraproteins in IgM-MGUS and WM. Paratarg-7 is identical to STOML2, also known as HSPC108 or stomatin-like-protein 2, which has been reported to be overexpressed in several cancers. Isoelectric focusing and phosphatase treatment revealed that paratarg-7 was hyperphosphorylated (pP-7) in all patients with an anti-paratarg-7 specific paraprotein.

Since only 4/200 (2%) of healthy controls were carriers of pP-7, pP-7 carrier state is associated with a significantly increased risk for developing IgA-, IgG-MGUS/MM (odds ratio 7.9; $p < 0.0001$) and IgM-MGUS/MW (odds ratio 6.2; $p = 0.001$). Family analyses revealed that the pP-7 carrier state is inherited as a dominant trait. After IgA/IgG-MGUS and multiple myeloma, IgM-MGUS/MW is the second neoplasia associated with pP-7 carrier state.

The aim of this study was to analyze the prevalence of pP-7 in 250 patients with several solid tumors (breast cancer, lung cancer, colon cancer, prostate cancer and melanoma) by ELISA and isoelectric focusing.

pP-7 carrier state was observed in only 2% of the patients with different tumor types investigated: 1/50 breast cancer, 0/50 lung cancer, 0/50 colon cancer, 1/50 prostate cancer, 1/50 melanoma. Since the prevalence of pP-7 in these malignancies is similar to the prevalence of pP-7 in the healthy population, carrier state of pP-7 does not appear to be a risk factor for the development of solid tumors.

III. Einleitung

1. Monoklonale Erkrankungen und die Rolle von Paraproteinen

Zu den Hauptvertretern der monoklonalen Erkrankungen gehören das Multiple Myelom, das asymptomatische Vorläuferstadium MGUS (monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz) und der Morbus Waldenström.

Als B-Zell-Neoplasie infiltriert das Multiple Myelom (MM) diffus oder multilokulär das Knochenmark und verdrängt die normale Blutbildung. Ausgangspunkt ist ein Klon maligne transformierter Plasmazellen (B-Zellen), die ein klonales Immunglobulin (Paraprotein) produzieren.

Die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) kann in ein Multiples Myelom übergehen (1%/Jahr) (Landgren *et al.*, 2009), aber stellt zunächst eine benigne Erkrankung dar, da nur eine geringe Infiltration des Knochenmarks mit Plasmazellen vorliegt (<10%) und keine Osteolysen auftreten. Die Abgrenzung eines MM gegenüber einer benignen Gammopathie bzw. einem MGUS erfolgt aufgrund bestimmter Diagnosekriterien.

Klinisch ist das MM durch den Nachweis einer Knochenmarkinfiltration, osteolytischen Läsionen und das Auftreten von monoklonalem Immunglobulin im Serum bzw. von Leichtketten im Urin ("Bence-Jones-Protein") gekennzeichnet. Die entarteten Plasma-Zellen produzieren große Mengen bestimmter Antikörper, sogenannte Paraproteine, die als M-Gradient ("Myelomprotein" oder "Monoklonale-Komponente" (siehe Abb. 1)) in der Serumelektrophorese sichtbar gemacht werden können.

Protein	119		g/l	(66-83)
IgG	67.5		g/l	(7.0-16.0)
IgA	0.28		g/l	(0.70-5.00)
IgM	0.24		g/l	(0.40-2.80)

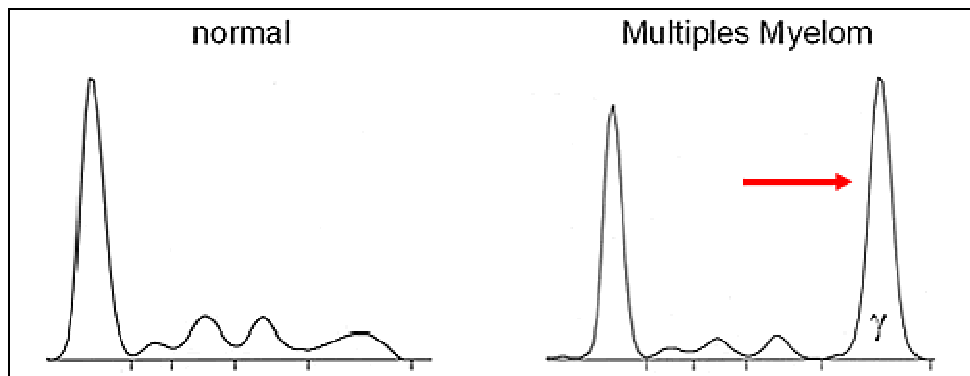


Abb. 1: Nephelometrische (oben) und elektrophoretische (unten) Bestimmung der Paraproteinmenge. In der normalen Elektrophorese (links) dominiert die Albumin-Fraktion (60%). Im vorliegenden Fall (rechts) besteht eine ausgeprägte Vermehrung von IgG bei einem IgG-Myelom. Die Immunglobulin-Fraktion der Elektrophorese des Patienten ist deutlich erhöht (hohe Zacke; M-Protein).

(aus: <http://www.myelom.org/das-myelom/diagnostische-verfahren.html>)

Der Morbus Waldenström (WM) - auch Immunozytom - ist klassifiziert als B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, das sich zum einen durch lymphozytoide Zellinfiltrationen des Knochenmarks und zum anderen durch die Produktion monoklonaler IgM-Globuline auszeichnet (Campo *et al.*, 2011).

Obwohl Alter, Rasse, Geschlecht und vorbestehende MGUS bereits bekannte Risikofaktoren sind, bleibt die Pathogenese des MM und der WM bisher ungeklärt. Einige Studien demonstrierten ein signifikant erhöhtes Risiko für WM nach Infektionen mit Hepatitis B, HIV und Rickettsiose und fanden außerdem ein erhöhtes Risiko unter Patienten mit Autoimmunerkrankungen in der Krankengeschichte (Koshiol *et al.*, 2008). Aber auch Umwelteinflüsse und genetische Faktoren tragen zur familiären Häufung monoklonaler Erkrankungen bei.

Aktuellere Studien beschäftigen sich mit der Rolle der chronischen Antigenstimulation in der Pathogenese monoklonaler Gammopathien. So könnte eine chronische Stimulation des Immunsystems zur bösartigen Entartung der Plasmazellen beim MM bzw. der lymphoplasmazytoiden Zellen bei WM führen. Das

bedeutet, dass die Störung in der B-Zell-Reifung im Falle dieser beiden Erkrankungen auf verschiedenen Ebenen stattfindet. Während beim Morbus Waldenström bzw. IgM-MGUS die entarteten lymphoplasmazytoiden Zellen Immunglobuline der IgM-Subklasse produzieren, definiert sich das MM bzw. die IgA-, IgG-MGUS über die Produktion von Immunglobulinen der IgA- und IgG-Subklassen durch Plasmazellen. Ursächlich für diese Unterschiede in den Immunglobulin-Subklassen lässt sich der Klassenswitch im Verlauf der B-Zell-Reifung heranziehen.

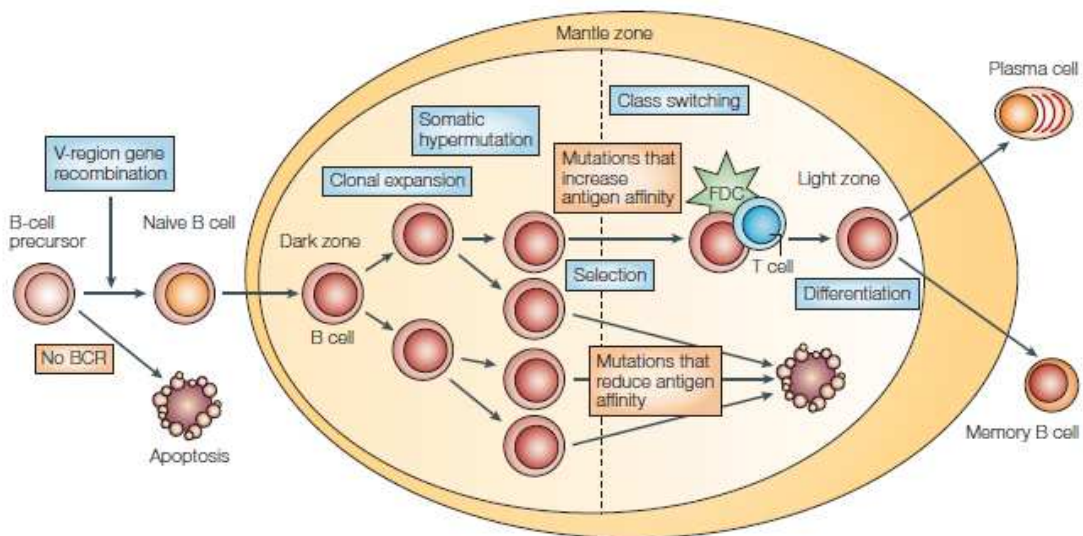


Abb. 2: B-Zell Entwicklung (Küppers, 2005)

Während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark werden Gen-Segmente, welche die variable Region (V-region) eines Antikörpermoleküls encodieren, durch somatische Rekombination zusammengesetzt. Es gibt eine große Zahl von Gen-Segmenten, die für solche V(D)J-Rekombinationen zur Verfügung stehen, sodass jede B-Zelle einen eigenen B-Zell-Rezeptor (BCR) besitzt. Der Prozess der somatischen Hypermutation generiert große Raten an Mutationen in der variablen Region und damit viele Antikörper-Varianten. Die initiale Aktivierung der reifen, Antigen-naiven B-Zellen findet meist durch die Interaktion mit T-Helferzellen und dendritischen Zellen (follicular dendritic cells/ FDC) in der T-Zell-Zone von lymphatischen Organen statt. Die B-Zellen wurden zuvor aufgrund der hohen Affinität ihrer B-Zell-Rezeptoren für ein bestimmtes Antigen ausgewählt und erhalten Überlebenssignale von T-Zellen und dendritischen Zellen. Die Immunglobulin-Gene vieler B-Zellen werden durch einen Klassenwechsel („class switching“) verändert, was die anfangs exprimierten konstanten Schwereketten-Region-Gene durch die einer anderen Klasse ersetzt: Die Synthese von IgM wird zugunsten von IgG, IgE oder IgA eingestellt. Schließlich differenzieren ausgewählte B-Zellen in Gedächtnis- oder Plasmazellen und verlassen das Keimzentrum.

Zusammenfassend ist bis heute nur sehr wenig über die Pathogenese dieser Erkrankungen bekannt. Verschiedene Studienergebnisse deuten daraufhin, dass die chronische Antigenstimulation eine wichtige Rolle in der Genese spielt (Friedman et

al., 1991; Gallagher *et al.*, 1983; Jack *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1994; Soderberg *et al.*, 2004), so dass eine Identifikation antigener Zielstrukturen ein besseres Verständnis des Pathomechanismus dieser Erkrankungen ermöglichen könnte. Allerdings werden die Ergebnisse dieser Studien sehr kontrovers diskutiert. Versuche, Paraprotein-Ziel-Antigene durch Epitop-Rekonstruktion zu identifizieren (Sompuram *et al.*, 2008), waren nicht überzeugend, da die Reaktionen bei Konzentrationen des Paraprotein-haltigen Serums von nur 1:1250 beobachtet wurden. Solche geringen Titer begründen berechtigte Zweifel, ob die beobachteten Reaktionen tatsächlich Paraprotein-vermittelt waren. Aufgrund der zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse wurde die Theorie der chronischen Antigenstimulation zunächst wieder verworfen.

2. Antigene Zielstrukturen von Paraproteinen

Zielantigene von Paraproteinen wurden bisher eher zufällig entdeckt. Paraproteine können als bestimmte klinische Symptome in Erscheinung treten, die durch das Paraprotein selbst ausgelöst werden (z.B. Kälteagglutinine (Seligmann and Brouet, 1990) oder Blutungsanomalien (Colwell *et al.*, 1997)). Weiterhin wurden durch Interferenzen des Paraproteins mit Labor-Tests (z.B. HIV-1 p24 Antigen bei einem HIV-infizierten Patienten mit Multiplem Myelom (Konrad *et al.*, 1993)) und beim Screenen von Paraproteinen gegen vorgegebene Antigene (z.B. anti-Streptolysin, anti-DNA und anti-IgG (Seligmann *et al.*, 1990) weitere Zielantigene nachgewiesen.

Die ersten systematischen Studien, die ein breites Spektrum potentieller Antigene abdeckten, verwendeten SEREX (serological identification of antigens by expression cloning). Mit SEREX lassen sich Antikörper-Antigen-Interaktionen nachweisen, auch wenn weder Antikörper noch Antigen bekannt sind (Sahin *et al.*, 1995).

Es wurden cDNA-Bibliotheken aus menschlichem Hodengewebe, Lungenkrebs, Brustkrebs, Rinder- und Schweinemuskel und Weizenkeimen hergestellt und in *Escherichia coli*-Bakterien exprimiert. Diese cDNA-Bibliotheken wurden mittels SEREX auf Reaktivität mit Paraproteinen aus Seren von 114 Patienten mit MGUS oder Multiplem Myelom untersucht (Preuss *et al.*, 2007).

Obwohl mehr als 6×10^8 Paraprotein-Antigen Interaktionen analysiert wurden, konnten nur 4 Antigene identifiziert werden, jedes durch das Paraprotein eines einzigen

Patienten (Preuss *et al.*, 2007), was gegen eine bedeutsame Rolle der chronischen Antigenstimulation in der Pathogenese des MM/MGUS spricht.

Durch Benutzung eines kommerziellen Protein-Makro-Array aus fötalem menschlichen Gehirn (RZPD Macroarray, bestehend aus Proteinen rekombinant exprimierter cDNA-Einzelklone, Einzelheiten siehe http://www.imagenes-bio.de/services/proteinarray_scr), wurden 192 IgA- oder IgG-Paraprotein-haltige Seren von Patienten mit einem MGUS oder einem Multiplem Myelom bei sehr hoher Verdünnung (1:10⁸) untersucht (Preuss *et al.*, 2009). Neunundzwanzig von 192 (15%) der IgA/IgG-Paraproteine reagierten dabei spezifisch mit demselben Zielantigen, genannt Paratarg-7 (von Paraprotein target) (Preuss *et al.*, 2009).

Die Spezifität der Paraprotein-vermittelten Reaktion wurde durch Absorptionsstudien mit rekombinantem Paratarg-7 sowie durch funktionelle Studien mit dem aus Patienten erhaltenen rekombinanten B-Zell-Rezeptor bestätigt (Preuss *et al.*, 2009).

Um die Frequenz der anti-Paratarg-7-Reaktivität bei verschiedenen Ig-Klassen und IgG-Subklassen zu zeigen, wurden spezifische Antikörper der IgG-Subklassen verwendet. Zwischen IgA- und IgG-Paraproteinen konnte kein Unterschied bezüglich der Paratarg-7-Reaktivität gezeigt werden. Allerdings reagierte kein IgG₁-, IgG₂- oder IgG₄-Paraprotein mit Paratarg-7, sodass interessanterweise alle pP-7-spezifischen IgG-Paraproteine zur Subklasse IgG₃ gehörten (Preuss *et al.*, 2009).

Tabelle 1: Subklassenanalyse von anti-Paratarg-7 spezifischen Paraproteinen
(Preuss *et al.*, 2009)

Type	Paraproteins analyzed (n)	Antiparatarg-7 positive
IgA	39	5 (12.9%)
IgA _λ	17	1 (5.9%)
IgA _κ	22	4 (18.1%)
IgG	153	24 (15.6%)
IgG _λ	57	10 (17.5%)
IgG _κ	96	14 (14.7%)
IgG ₁	83	0
IgG ₂	6	0
IgG ₃	57	24 (42.1%)
IgG ₄	7	0
Total	192	29

3. Paratarg- 7, ein Zielantigen von Paraproteinen bei MGUS, Multiplem Myelom und Morbus Waldenström

Paratarg-7 ist identisch mit STOML2 (stomatin-like-protein2) / SLP-2 (stomatin like protein-2), auch bekannt als HSPC108, und wird von einer ungefähr 1,5-Kilobasen mRNA enkodiert, wobei das entsprechende Gen auf Chromosom 9p13 zu finden ist (Wang and Morrow, 2000).

Die eigentliche Funktion von Paratarg-7 ist unbekannt. Verschiedene Arbeiten berichten, dass Paratarg-7 die T-Zell-Aktivierung moduliert und aktuellere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Paratarg-7 eine wichtige Rolle bei der Stress-induzierten mitochondrialen Hyperfusion spielt (Kirchhof *et al.*, 2008; Tondera *et al.*, 2009).

Paratarg-7 wird in allen menschlichen Geweben exprimiert, von einigen Krebsarten aber auch überexprimiert (Cao *et al.*, 2007a; Cao *et al.*, 2007b; Cao *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000). Beim ösophagealen Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu normalem Epithel bei entartetem Gewebe höhere SLP-2-Spiegel nachweisbar sind. Die Expressionsrate von SLP-2 beim ösophagealen Plattenepithelkarzinom lag bei 54,1%, im normalen Epithelgewebe bei nur 3,6%. Höhere SLP-2 Spiegel korrelieren mit dem Ausmaß der Karzinom-Invasion, jedoch nicht mit anderen klinisch-pathologischen Charakteristika (Cao *et al.*, 2010).

Im Falle des primär invasiven Mammakarzinoms konnten signifikant positive Assoziationen zwischen Tumorstadium, Tumorgroße, Lymphknotenmetastasen, klinischem Stadium, Fernmetastasen, HER2/neu-Expression und erhöhter SLP-2 Expression gezeigt werden. Höhere Expressionsraten führten zu einem reduzierten Gesamtüberleben und wurden öfter bei Patienten mit Tumoren größer als 20mm, Lymphknotenmetastasierung, fortgeschrittenem klinischen Stadium, Fernmetastasierung und HER-2/neu-Expression gefunden (Cao *et al.*, 2007a).

Auch beim laryngealen Plattenepithelkarzinom kann die Überexpression von SLP-2 als signifikant prognostischer Faktor bewertet werden, da die SLP-2-Expression auch

hier mit dem klinischen Stadium und Lymphknotenmetastasierung korreliert (Cao *et al.*, 2007b).

Schließlich wird SLP-2 auch beim endometrialen Adenokarzinom eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben, da u.a. das Zellwachstum durch SLP-2 Expression induziert wurde (Cui *et al.*, 2007).

Bei Patienten mit einer monoklonalen Gammopathie ist Paratarg-7 in signifikanter Frequenz, d.h. bei ca. 15 % aller untersuchten IgA-/IgG-MGUS/MM-Patienten und 11% aller IgM-MGUS/MM-Patienten, das Zielantigen von Paraproteinen (Grass *et al.*, 2011; Preuss *et al.*, 2009).

Auf Ebene der DNA ergab die vergleichende Sequenzanalyse von Paratarg-7 bei Patienten und gesunden Spendern (als Kontrolle) keinen Hinweis auf Mutationen oder Polymorphismen. Ebenso zeigten sich in der SDS-PAGE-Analyse aus Gesamtblutlysaten identische Banden für Paratarg-7 von Patienten, die ein Paratarg-7-spezifisches Paraprotein aufweisen, von gesunden Spendern als auch von MGUS/MM-Patienten, die ein Paraprotein mit einer anderen Spezifität aufweisen (Abb. 3) (Grass *et al.*, 2009). Dagegen zeigte sich in der isoelektrischen Fokussierung ein unterschiedliches Laufverhalten von Paratarg-7 aus Vollblutlysaten von Patienten mit anti-Paratarg-7-reaktivem Paraprotein verglichen mit gesunden Kontrollen (Grass *et al.*, 2009) und mit Patienten anderer Paraproteinspezifität.

Die Identität der Paratarg-7-Sequenzen bei Gesunden und Patienten mit einem anti-P-7-Paraprotein sowie die unterschiedlichen Banden des Paratarg-7-Proteins in der isoelektrischen Fokussierung sprechen für eine posttranslationale Veränderung des Paratarg-7-Proteins bei Patienten mit einem anti-P-7-spezifischen Paraprotein. Tatsächlich zeigte sich in der isoelektrischen Fokussierung vor und nach einer Phosphatase-Behandlung, dass Paratarg-7 bei Patienten, die ein P-7-spezifisches Paraprotein haben, zusätzlich phosphoryliert ist (Grass *et al.*, 2009).

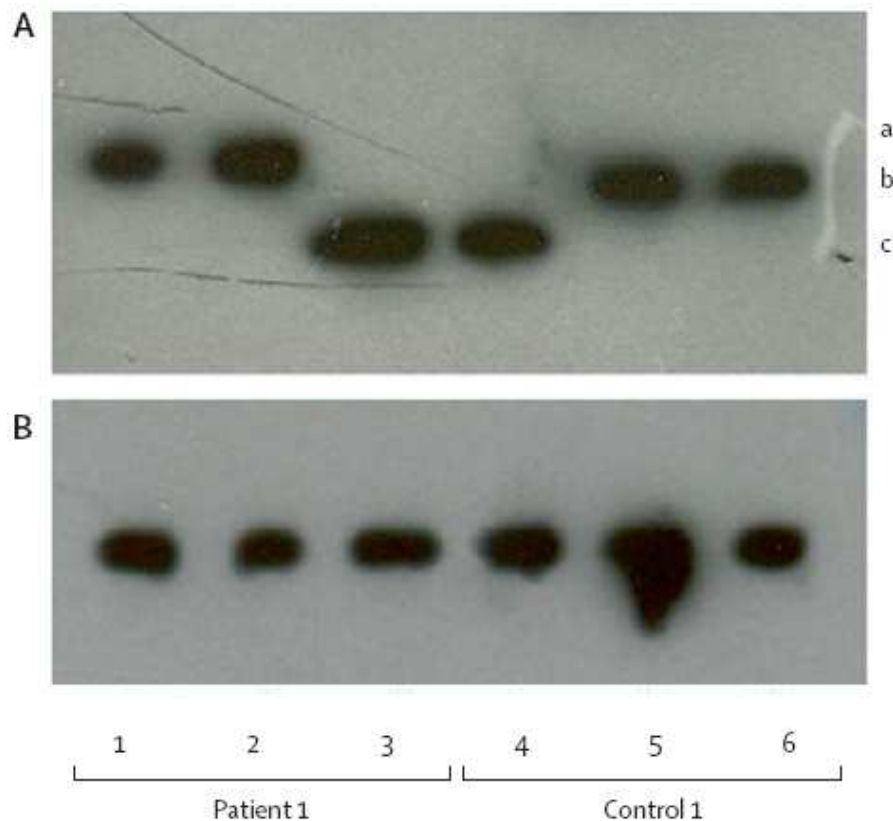


Abb. 3: Phosphatase-Behandlung von Paratarg-7 (Grass *et al.*, 2009).

A: Isoelektrische Fokussierung (IEF): Banden von unbehandelten Vollblutlysaten eines Patienten mit anti-Paratarg-7-spezifischem Paraprotein (Patient 1) und von einer gesunden Kontrolle (Kontrolle 1) laufen in der IEF unterschiedlich (Bahn 1 und 6). Nach Inkubation mit Lysis-Puffer zeigen die Banden von Patient und Kontrolle immer noch ein unterschiedliches Laufverhalten (Bahn 2 und 5). Nach Behandlung der Lysate mit alkalischer Phosphatase zeigen die Banden von Patient und Kontrolle identische Muster (Bahn 3 und 4); (a) Migration von hyperphosphoryliertem Paratarg-7; (b) Migration von Paratarg-7 eines gesunden Spenders; (c) Migration von dephosphoryliertem Paratarg-7.

B: SDS-PAGE: In keinem der Fälle waren Unterschiede im Laufverhalten feststellbar.

Paratarg-7 stimuliert das Immunsystem also wahrscheinlich deshalb, weil es bei diesen Patienten gegenüber der Normalbevölkerung verändert ist: es trägt eine zusätzliche Phosphatgruppe, die wahrscheinlich die Autoimmunantwort induziert.

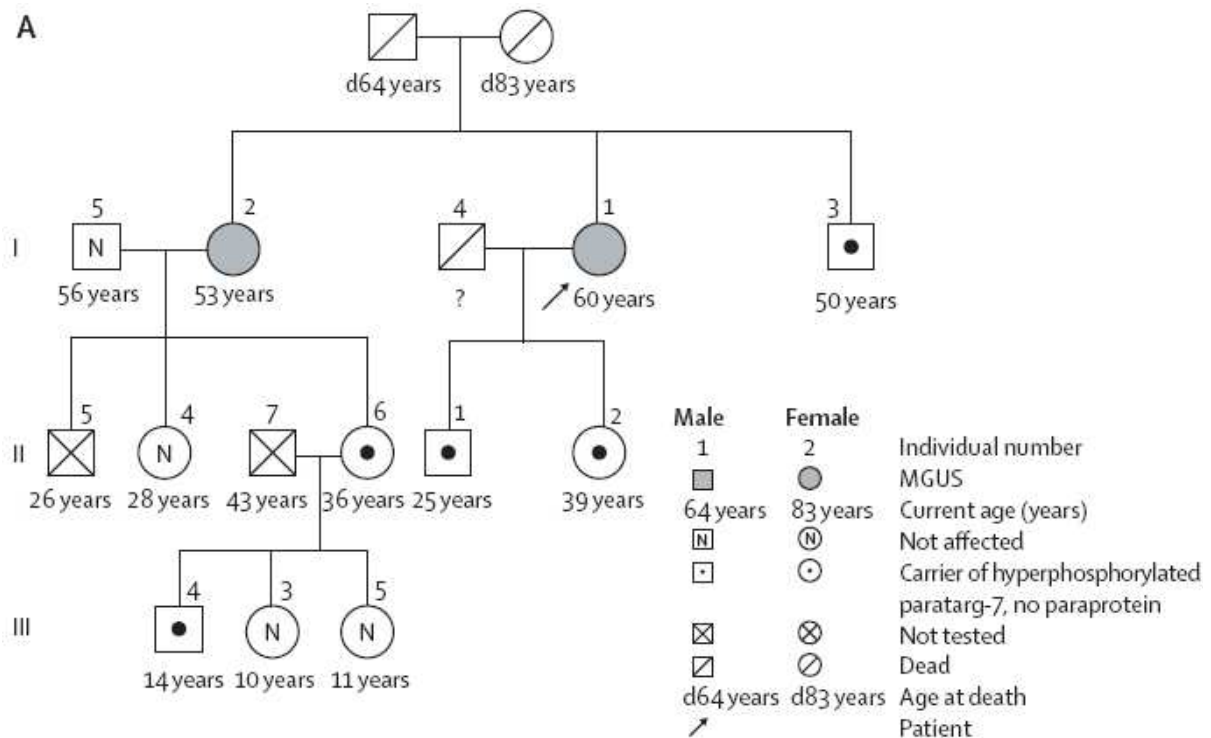
Auch im Falle des Immunozytoms (Morbus Waldenström, Makroglobulinämie) mit Bildung monoklonaler IgM-Globuline und IgM-MGUS wurde mittlerweile wie oben beschrieben eine Antikörper-Aktivität gegen Paratarg-7 nachgewiesen. Die Paraproteine von 18 (9 WM und 9 IgM-MGUS) von 161 Patienten (11%) reagierten mit Paratarg-7. Auch hier zeigte die isoelektrische Fokussierung und Phosphatase-Behandlung, dass P-7 bei allen Patienten mit anti-p-7-spezifischen IgM-Paraproteinen hyperphosphoryliert vorlag (Grass *et al.*, 2011).

Da es sich beim Morbus Waldenström um eine bösartige klonale Entwicklung lymphoplasmazytoider B-Zellen handelt, stellt der Morbus Waldenström neben dem Multiplen Myelom bereits die zweite hämatologische Neoplasie dar, bei der hyperphosphoryliertes Paratarg-7 eine Rolle spielt.

Klinische Beobachtungen ergaben ein erhöhtes familiäres Auftreten von MGUS/MM/WM. Bei den daraufhin durchgeführten Familienanalysen von Patienten mit MGUS, MM und WM fielen Regelmäßigkeiten im Vererbungsmuster von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 auf, die genauer untersucht wurden.

Die Mitglieder von 8 der 35 Familien mit MGUS/MM-Patienten, deren Serum positiv auf Paratarg-7-spezifische Paraproteine getestet wurde, wurden auf das Vorhandensein von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 analysiert.

Der Stammbaum in Abb. 4 zeigt eine Familie einer 60-jährigen Frau mit MGUS (I.1, Indexpatientin). Ihre jüngere Schwester (I.2) ist ebenfalls an MGUS erkrankt. Beide Schwestern hatten ein Paratarg-7 spezifisches IgG-Paraprotein (Titer 1:10⁹) und waren Trägerinnen von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7). Deren Bruder (I.3) hatte kein Paraprotein, aber die isoelektrische Fokussierung zeigte, dass er Träger der hyperphosphorylierten Variante von Paratarg-7 war. In der nächsten Generation waren beide Geschwister der Indexpatientin (II.1 und II.2) und eine Tochter (II.6) des Familienmitglieds I.2 Träger des hyperphosphorylierten Proteins, hatten aber kein Paraprotein oder eine anti-Paratarg-7 Reaktivität im Serum bei einer Verdünnung von 1:10². In der dritten Generation war eines von drei Kindern (III.4) Träger von hyperphosphoryliertem Paratarg-7, aber keines hatte Paraproteine im Serum.



B

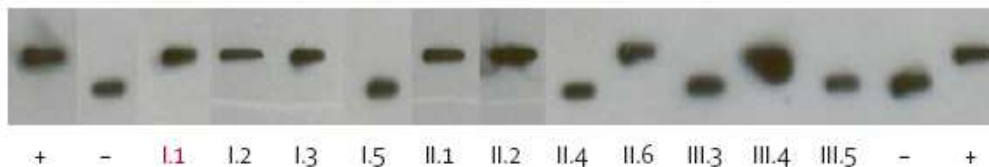


Abb. 4: Familienanalyse (Beispiel) (Grass *et al.*, 2009). Erläuterungen siehe vorstehenden Text.

A) Familienstammbaum zweier Schwestern (I.1 und I.2) mit einem IgG-MGUS, beide Trägerinnen von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 mit einem IgG-Paratarg-7-spezifischem Paraprotein

B) IEF-Analyse von Vollblutlysaten der Familienmitglieder

Die Mitglieder von 4 Familien mit P-7-spezifischem IgM-Paraprotein im Serum wurden ebenfalls auf Paratarg-7 spezifische Paraproteine hin getestet.

In allen 12 getesteten Familien zeigte die Analyse von Verwandten des Patienten mit MGUS/MM/WM mit einem Paratarg-7-spezifischen Paraprotein, dass die Hyperphosphorylierung von P-7 dominant vererbt wird. Hierdurch lässt sich erstmals die familiäre Häufung des Multiplen Myeloms und Morbus Waldenström erklären (Grass *et al.*, 2009; Grass *et al.*, 2011).

Schließlich lässt die Tatsache, dass hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine aller Patienten mit MGUS, Multiplen Myelom und WM mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 fungiert, Grund zur Annahme, dass das

hyperphosphorylierte Protein eine Rolle in der Pathogenese dieser Neoplasien spielt. Die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 scheint der nächstliegende Grund für seine Autoimmunogenität zu sein.

4. Ziele der Arbeit

Paratarg-7/ SLP2 wird bei verschiedenen Tumoren überexprimiert und die vermehrte Expression kann sogar als prognostischer Faktor bei verschiedenen soliden Tumoren gewertet werden (Cao *et al.*, 2007a; Cao *et al.*, 2007b; Cao *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000). Es stellt sich daher die Frage, ob hyperphosphoryliertes Paratarg-7 (pP-7) eine Bedeutung in der Pathogenese solider Tumoren hat.

Das Ausschalten von SLP-2 in einer Zelle unterdrückte wirksam die Zellmotilität, Proliferation und veränderte den Zellzyklus ohne eine signifikante Veränderung der Apoptose. Außerdem konnte durch die Gabe von verschiedenen Chemotherapeutika die Zunahme der Chemosensitivität durch SLP-2 Depletion beobachtet werden (Wang *et al.*, 2009).

Die hyperphosphorylierte Variante von Paratarg-7 wurde bereits in signifikant erhöhter Frequenz bei Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom (~15%) (Preuss *et al.*, 2009) und Morbus Waldenström (11%) (Grass *et al.*, 2011) nachgewiesen, kommt aber auch bei Gesunden vor, jedoch mit weitaus geringerer Frequenz (~2%) (Preuss *et al.*, 2009). So stellt sich die Frage, ob hyperphosphoryliertes Paratarg-7 auch bei soliden Tumoren eine pathogenetische Rolle spielt bzw. in signifikant erhöhter Prävalenz bei Patienten mit soliden Tumoren nachgewiesen werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu zeigen, ob eine Trägerschaft von pP-7 bei Patienten mit soliden Tumoren gehäuft vorkommt. Insbesondere interessierten uns Patienten mit Bronchial-Ca, Mamma-Ca, malignem Melanom, Prostata-Ca und Colon-Ca.

IV. Patienten, Material und Methoden

1. Patienten

Es wurden Vollblutlysate aus einem Patientenkollektiv von 250 konsekutiven, nicht selektionierten Patienten - jeweils 50 mit Bronchial-Ca, Melanom, Mamma-Ca, Colon-Ca und Prostata-Ca - auf Expression von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 getestet.

Probenmaterial stellte die Urologie der Uniklinik Homburg (Chefarzt Prof. Dr. Stöckle, OA Dr. Ohlmann) für die Prostata-Karzinome, die Hautklinik der Uniklinik Homburg (Chefarzt Prof. Dr. Vogt) für die Melanome, Profes. Dres. Bals und Mahlknecht für die Bronchial-Karzinome und die Innere Medizin I der Uniklinik Homburg für die Colon- und Mamma-Ca-Proben. Die Proben wurden im Rahmen von diagnostischen Blutentnahmen gewonnen. Die Untersuchungen waren von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt worden.

Tabelle 2: Patientenkollektiv

	Frauen	Männer	<u>Altersdurchschnitt</u>
<u>Bronchial-Ca</u> (50 insgesamt)	17	33	23 - 83 Jahre Frauen: 61 Jahre Männer: 65 Jahre
<u>Melanom</u> (50 insgesamt)	22	28	34 – 85 Jahre Frauen: 55 Jahre Männer: 65 Jahre
<u>Mamma-Ca</u> (50 insgesamt)	50	Keine	34 – 77 Jahre 56 Jahre
<u>Colon-Ca</u> (50 insgesamt)	19	31	39 – 77 Jahre Frauen: 64 Jahre Männer: 63 Jahre
<u>Prostata-Ca</u> (50 insgesamt)	Keine	50	26 – 86 Jahre 61 Jahre

2. Material und Methoden

Reagenzien:

Gelatine (Merck, Darmstadt)

HCl (Merck, Darmstadt)

Magermilchpulver (Hochwaldwerke, Thalfang)

NaCl (Merck, Darmstadt)

Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt)

Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)

OPD (O-Phenyl-diaminhydrochlorid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Streptavidin-Peroxidase (Roche, Mannheim)

TRIS (Merck, Darmstadt)

Tris Hydrochlorid, Handelsname TRIZMA (Merck, Darmstadt)

Triton X-100 (Merck, Darmstadt)

Antikörper:

Chicken-anti-STOML2 (www.antikörper-online.de)

Goat-anti-human-IgG-Fab-biotinyliert (Dianova, Hamburg)

Goat-anti-mouse-Peroxidase (BioRad, München)

Mouse-anti-STOML2 (antikörper-online.de)

Mouse-anti-FLAG (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Isoelektrische Fokussierung:

IEF (pH 3-10)-Fertiggel (Invitrogen, Karlsruhe)

Immobilon-P-Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF; Millipore Immobilon), Eschborn

Probenpuffer IEF (Invitrogen, Karlsruhe)

Pharmacia's ECL (enhanced chemiluminescence) System (General Electrics, Connecticut, USA)

Whatman-Papier

Puffer für den ELISA:

- PBS

8,0g NaCl

0,2g KCl

1,42g Na₂HPO₄ (Dinatriumphosphat)

0,24g KH₂PO₄ (Kaliumhydrogenphosphat)

ad 800ml aqua dest., pH mit HCl auf 7,4 einstellen → auf 1l aqua dest. auffüllen

- Blockpuffer

0,75g Gelatine ad 50ml aqua dest., bei 100°C im Wasserbad auflösen

- TBS-Waschpuffer

8,78g NaCl

6,05g Tris Hydrochlorid

1,4g TRIS

ad 1l aqua dest.

- TBS/Triton

TBS + 0,1% Tx100 → Zugabe von 1ml Tx100

(Triton X-100 ist ein nichtionisches Tensid, welches Proteine nicht denaturiert, sondern Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus Membranen löst.)

- Coating puffer:

Lösung A: 1,06g Natriumcarbonat ad 50ml aqua dest.

Lösung B: 0,84g Natriumhydrogencarbonat ad 50ml aqua dest.

0,85ml A + 0,4ml B + aqua dest. auffüllen = 5ml Puffer

- POX-OPD-Entwicklung:

Lösung A: 0,2M Dinatriumphosphat * 2H₂O → 1,78g in 50ml aqua dest.

Lösung B: 0,1M Citronensäure * 1H₂O → 1,05g in 50ml aqua dest.

2,5ml A + 2,5ml B + 5ml aqua dest. + 1 Tabl. OPD (10mg Substrat pro Tablette) +
5µl H₂O₂ (30%)

→ 10ml Entwickler

Puffer für die isoelektrische Fokussierung:

- TBST (TBS-Tween)

10mmol/L TrisHCl, pH 7,5, 150mmol/L NaCl und 0,1% Tween 20

(Tween 20 (auch Polysorbat 20) wird als Detergens verwendet, um unspezifische Bindungen zu verhindern.)

- Anodenpuffer: 10mM Phosphorsäure (äußere Kammer)

- Kathodenpuffer: 20mM NaOH (innere Kammer)

- Blockpuffer: 10g Magermilchpulver in 100ml TBS-Waschpuffer

Laborgeräte:

ELISA-Platte, 96-Well (NUNC Maxisorp F), Langenseebold

ELISA-Lesegerät Victor2 1420 Multilabel Counter Wallac, Freiburg

IEF-Gelkammer (Invitrogen, Karlsruhe)

Magnetrührer (Heidolph, Schwabach)

Pipetten 10, 100, 1000µl (Eppendorf, Hamburg)

Western-semi-dry-Blotter (Bio-Rad, München)

Probenaufbereitung

Jeweils 1ml EDTA-Vollblut von Tumorpatienten wurde bei RT für 1 Minute bei 1700g zentrifugiert und das Serum (Überstand) bei -20°C gelagert. Danach wurde das Zellpellet 3x mit PBS gewaschen und in PBS gelöst bei -20°C gelagert. Für den ELISA wurden 50µl der eingefrorenen Zellen aufgetaut und direkt eingesetzt. Für die IEF wurden 50µl der eingefrorenen Zellen aufgetaut und mit 100µl einer 8 molaren Harnstofflösung (Erythrozyten-Lysis-Puffer) versetzt, für 15min bei RT inkubiert und abschließend bei -20°C gelagert oder direkt für die IEF verwendet. Das Serum konnte direkt verwendet werden.

2.1 ELISA

2.1.1 Allgemeines Prinzip

Der ELISA – enzyme linked immuno sorbent assay - beruht auf einer Art Sandwich-Modell. Verwendet werden zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen – in diesem Fall hyperphosphoryliertes Paratarg-7 - binden. Der primäre sogenannte „coating“- bzw. „capture-antibody“ wird an den Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird in die Wells gegeben und einige Zeit inkubiert. Es kommt zur Antigen-Antikörper-Bindung. Ein zweiter – mit einem Enzym gekoppelter - Antikörper bindet das nachzuweisende Antigen an anderer Stelle. Bei Zugabe eines für das Enzym spezifischen Substrates kommt es dann zur Farbreaktion, die ein Maß für die Menge an nachgewiesenem Antigen ist. Somit können Proben mit dem nachzuweisenden Antigen von solchen ohne dasselbe sichtbar gemacht werden (Abb. 5).

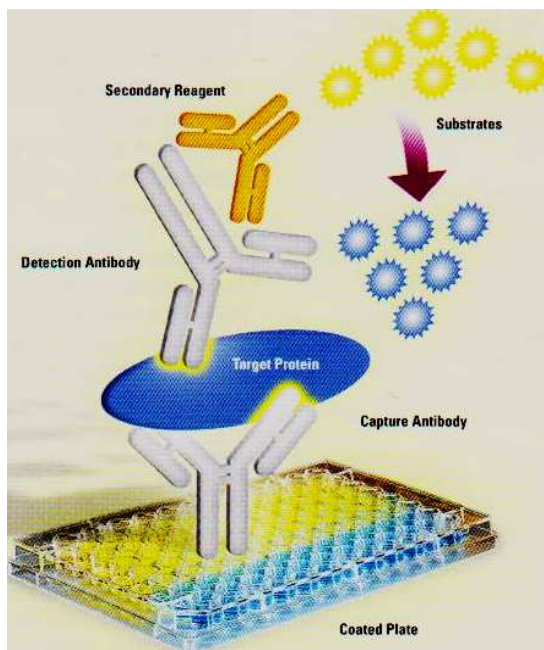


Abb. 5: Funktionsweise des ELISA. Es werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende „target protein“ binden, allerdings an unterschiedlichen Stellen. Der „coating-antibody“ wird dabei an eine feste Phase gebunden, das nachzuweisende Antigen dazugegeben. Ein „detection-antibody“ vervollständigt den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch die Zugabe eines für das an den „detection-antibody“ gekoppelte Enzym passende chromogene Substrat wird durch eine Farbreaktion Proben mit Antigen sichtbar gemacht.

(aus: <http://www.thermoscientific.com/perbio>)

Als „detection antibody“ wurde ein rekombinantes humanes Fab-Fragment eingesetzt, welches hochspezifisch nur an hyperphosphoryliertes, nicht aber an nicht-hyperphosphoryliertes Paratarg-7 bindet (Preuss, unpublished). Somit wird ausschließlich hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachgewiesen.

2.1.2 Durchführung

Als Coat für die ELISA-Platte wurde jedes Well mit 50µl chicken-anti-STOML2 (1:2000 in coating buffer) inkubiert. Der Antikörper band bei 4°C über Nacht mit dem Fc-Teil an die Platte. Danach wurde er mit 100-200µl 1,5% Gelatine (in Waschpuffer 1h bei Raumtemperatur) geblockt, um unspezifische Bindungen in den weiteren Arbeitsschritten zu verhindern. Zwischen den Einzelschritten des ELISA erfolgte teilweise ein dreimaliges Waschen der Platten mit TBS-Puffer.

Im nächsten Schritt wurden Vollblutlysate (je 50µl) zuerst mit 50µl Waschpuffer verdünnt und aus dieser Mischung 2x jeweils 50µl pro Well auf die ELISA-Platte übertragen, sodass die Untersuchung der Vollblutlysate doppelt angesetzt wurde. Der „coat“- bzw. „capture-antibody“ erkennt das im Vollblut enthaltene Paratarg-7 und bindet unabhängig von der Phosphorylierung an das Protein.

Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde 50µl eines rekombinant hergestellten Fab-Fragmentes (10µg/ml) hinzu pipettiert und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fab-Fragment bindet wie oben beschrieben spezifisch nur an hyperphosphoryliertes Paratarg-7-Protein und macht somit positive, d.h. Proben mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 mit Hilfe der abschließenden Farbreaktion sichtbar.

Im nächsten Schritt wurden die Wells mit einem Antikörper gegen das Fab-Fragment (Goat-anti-human-IgG-Fab-biotinyliert) versetzt (50µl, 1:2500 (Waschpuffer), 1h RT). Im nächsten Schritt kam die Streptavidin-Peroxidase zum Einsatz (1:50.000 (Waschpuffer), 50µl, maximal 15 Minuten RT). Das Tetramer Streptavidin ist hochaffin für Biotin, welches im vorhergehenden Schritt als anti-IgG-Fab-Biotin-Konjugat an den Komplex aus Coat-Antikörper, Antigen und Fab-Fragment gebunden hat.

Die Farbreaktion macht die positiven Proben schließlich sichtbar. Verwendet wurde OPD-Entwickler (o-Phenyl-diaminhydrochlorid) mit 100µl (10mg Substrat pro Tablette) pro Well. Die Peroxidase wandelt den Entwickler als ihr Substrat um, und

es kommt zum Farbumschlag von klar nach gelb für positive, also hyperphosphorylierte Proben.

Abgestoppt wurde die enzymatische Reaktion durch Denaturierung des Enzyms mit 3M HCl (je 25µl auf 100µl Entwickler). Die Wells zeigten erneut einen Farbumschlag (orange) aufgrund der Abnahme des pH-Wertes durch die Salzsäure.

Zum Schluss erfolgte die Messung der Absorption bei 490nm mit dem ELISA-Lesegerät Victor2 1420 Multilabel Counter Wallac. Wells mit Farbumschlag, also hyperphosphorylierte Proben, zeigten höhere Werte bei der Absorption.

Alle Proben wurden doppelt analysiert. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Proben wurden als positiv deklariert, wenn ihre gemessene Absorption höher lag als der Mittelwert negativer Proben plus der dreifachen Standardabweichung.

2.1.3 Ausschluss eines multiplen Myeloms bei positiven Proben

Bei positiven Proben, d.h. Proben mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7, wurde zum Ausschluss einer monoklonalen Gammopathie das Plasma auf Antikörper gegen Paratarg-7 untersucht. Einige Versuchsschritte dieses ELISA-Tests unterscheiden sich von dem zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Paratarg-7, welches ja als Antigen das Ziel von Antikörpern werden kann.

Beim Paratarg-7-Antikörper-ELISA wurde in HEK293 rekombinant hergestelltes, aufgereinigtes, FLAG-markiertes Paratarg-7-Protein eingesetzt. Diese FLAG-Markierung besteht aus 8 Aminosäuren, um die Paratarg-7 C-terminal verlängert wurde. Der im Folgenden benutzte FLAG-Antikörper erkennt hochspezifisch diese Aminosäuresequenz.

Zur Durchführung des Paratarg-7-Antikörper-ELISA wurde die Platte mit Mouse-anti-Flag (Clon M2) als Coat (1:2500, 50µl/Well) bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte ein Blockschritt mit 1,5%iger Gelatine (100µl/Well, 1h RT). Nach Beladung mit Paratarg-7-FLAG (1h RT, 50µl, 10µg/ml), wurde mit dem zu testenden Serum (1:100, 50µl/Well, 1h RT) inkubiert und anschließend entwickelt. Zwischen den Einzelschritten wurde je 3x mit Waschpuffer gewaschen. Die Seren (1:100, 50µl/Well, 1h RT) lieferten den pP7-Antikörper im Falle einer positiven Probe. Weitere Zwischenschritte liefen identisch zum weiter oben ausführlich beschriebenen ELISA-Test für hyperphosphoryliertes Paratarg-7 ab.

2.2 IEF – isoelektrische Fokussierung

2.2.1 Allgemeines Prinzip

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) beschreibt eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einem Gel aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten.

Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums tragen die Aminosäuren eines Proteins positive oder negative Ladungen. Die Summe aller Ladungen eines Proteins ist bei einem bestimmten pH-Wert - seinem isoelektrischen Punkt - null. Gelangt ein Proteinmolekül im elektrischen Feld an eine Stelle des Mediums mit diesem pH-Wert, verschwindet dort seine elektrophoretische Beweglichkeit, so dass es dort „liegen bleibt“. Da sich alle Proteine mit einheitlichem isoelektrischen Punkt an derselben Stelle des Mediums sammeln, spricht man von Fokussierung.

Ein Proteingemisch wird in ein Trägergel eingebracht (meist Polyacrylamid), in dem zuvor ein pH-Gradient etabliert wurde. Die Etablierung dieses Gradienten erfolgt entweder elektrophoretisch mittels im elektrischen Feld frei beweglicher Trägerampholyte oder hier über immobilisierte (d.h. kovalent mit dem Trägergel verbundene) Ladungsträger. Anschließend wird an das Gel eine elektrische Spannung angelegt. Jedes Protein bewegt sich nun im elektrischen Feld aufgrund seiner Eigenladung so weit, bis der pH-Wert des Trägergels seinem isoelektrischen Punkt entspricht.

Da hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nach der Translation zusätzliche negativ geladene Phosphatgruppen besitzt, hat es einen anderen isoelektrischen Punkt und zeigt somit ein anderes Laufverhalten als weniger phosphoryliertes Paratarg-7 und stellt sich im Blot weiter oben dar.

2.2.2 Durchführung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden eingefrorene Blutproben lysiert. Dazu wurden 10µl Blutprobe für 15 Minuten bei 20°C mit 20µl Lysis-Puffer (8 mol/L Harnstoff, 10 mmol/L NaH₂PO₄, 0,01 mol/L TrisHCl und 0,1% NP40) versetzt. Es folgte die Lagerung bei -20°C bis zum Gebrauch.

Als nächstes wurden gleich große Volumina der Blutprobe und des Ladungspuffers gemischt (jeweils 5µl).

Die Blutproben wurden durch eine IEF analysiert. Auf das Gel wurden 5µl der Mischung aufgetragen. Verwendet wurden Fertiggele mit einem fixiertem pH-Gradienten (pH 3-10) entsprechend der Anleitung des Herstellers (Novex pH 3-10, Invitrogen, Germany, Karlsruhe). Für die erste Stunde wurden 100 Volt eingestellt, danach 1h 200 Volt und schließlich eine weitere halbe Stunde 500 Volt.

Für die Immunoblot-Analyse wurden die Proteine nach IEF mittels semi-dry Blotting auf eine Immobilon-P-Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF; Millipore Immobilon) übertragen. Die Membran wurde zur Benetzung mit 100%igem Methanol vorbehandelt und danach 5 Minuten mit Transferpuffer versetzt. Danach wurden 3 Whatman-Papiere nach unten in den Western-semi-dry-Blotter gelegt, darauf die Membran, das Gel und wiederum 3 Whatman-Papiere. Die Transferzeit betrug 1h bei 23V und 450 mA.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran über Nacht bei 4°C in TBST/ Milchpuffer (10% Milch in 10mmol/L TrisHCl, pH 7,5, 150mmol/L NaCl und 0,1% Tween 20) geblockt, anschließend gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit mouse-anti-STOML2 (1:250) inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit goat-anti-mouse-POX -verdünnt 1:3000 in TBST- inkubiert. Die Membranen wurden dann in TBST gewaschen und anschließend mit Pharmacia's ECL (enhanced chemiluminescence) System detektiert. Dabei zeigten sich nun verschiedene Banden negativer und positiver Proben.

V. Ergebnisse

Zweihundertfünfzig Blutproben von Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren (je 50 Patienten mit einem Bronchial-Karzinom, Melanom, Mamma-Karzinom, Colon-Karzinom und Prostata-Karzinom) wurden in einem durch die Arbeitsgruppe etablierten ELISA (Grass *et al.*, 2009) auf das Vorhandensein von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7) bei einer Verdünnung von 1:2 untersucht. Ein Patient von 50 Patienten mit einem malignem Melanom (2%, Abb. 7), sowie 1/50 Patienten mit einem Prostatakarzinom (2%, Abb. 10) und 1/50 Patientinnen mit einem Mammakarzinom (2%, Abb. 8) waren Träger der hyperphosphorylierten Paratarg-7 Variante (pP-7). Bei den Patienten mit einem Bronchialkarzinom oder Kolonkarzinom (je 0/50) war kein Träger von pP-7 nachzuweisen (Abb. 6 und 9).

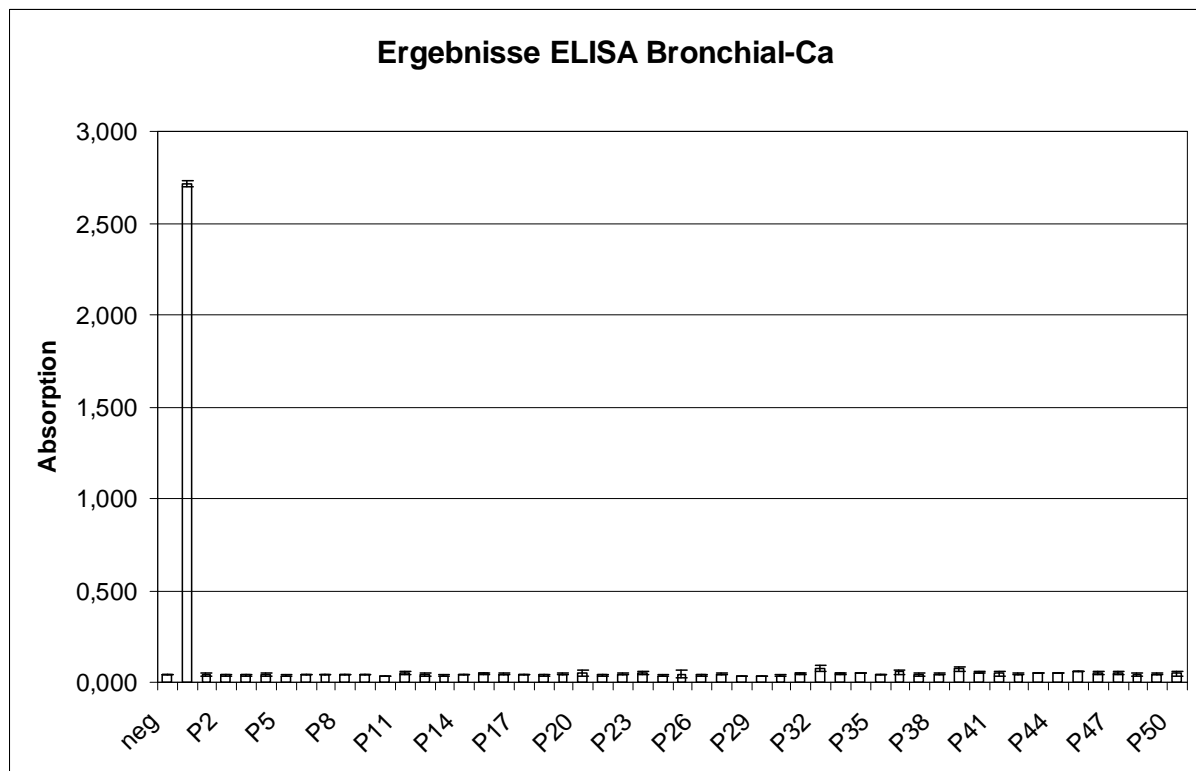


Abb. 6: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim Bronchial-Karzinom. Ergebnisse des ELISA zum Nachweis von pP-7 im peripheren Blut von 50 Patientinnen und Patienten mit einem Bronchial-Karzinom (P1-P50) unterschiedlicher klinischer Stadien und Histologien. Die ersten beiden Balken zeigen die Negativ- und Positivkontrolle. Alle Proben wurden doppelt analysiert; aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

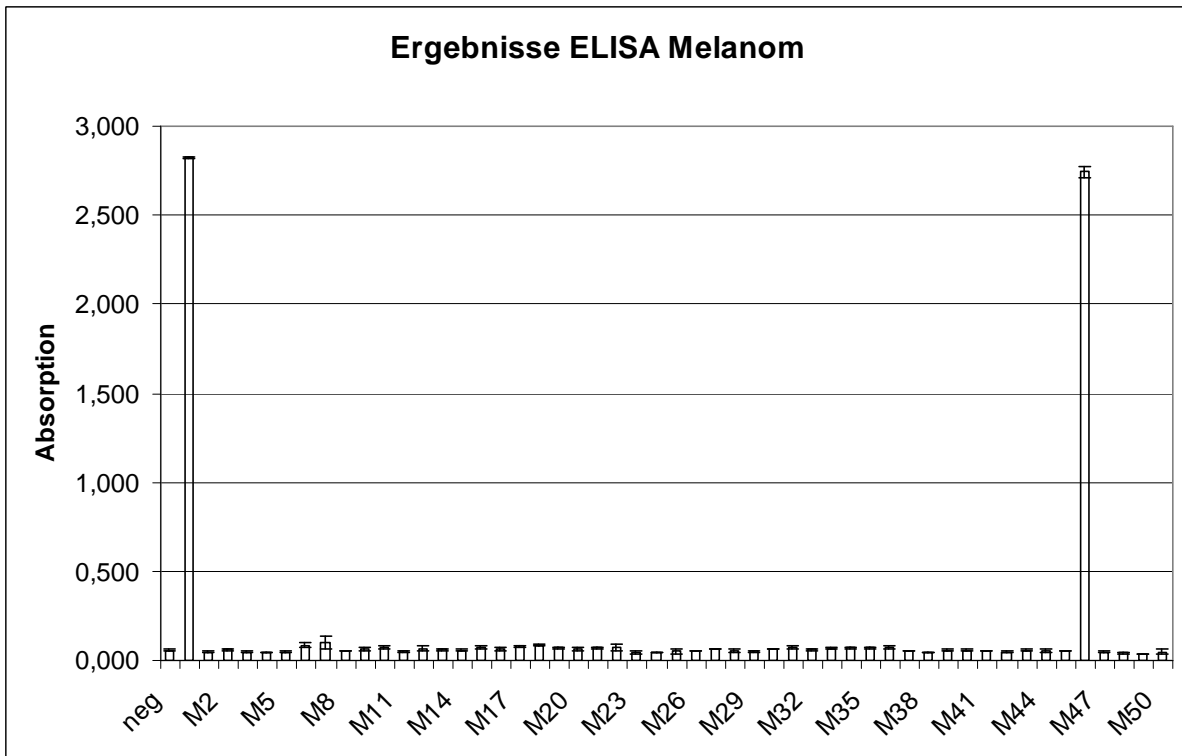


Abb. 7: Häufigkeit von pP-7 Trägern bei malignem Melanom. Ergebnisse des ELISA zum Nachweis von pP-7 im peripheren Blut von 50 Patientinnen und Patienten mit einem malignen Melanom (M1-M50) unterschiedlicher klinischer Stadien und histologischer Subtypen. Die ersten beiden Balken zeigen die Negativ- und Positivkontrolle. Alle Proben wurden doppelt analysiert; aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

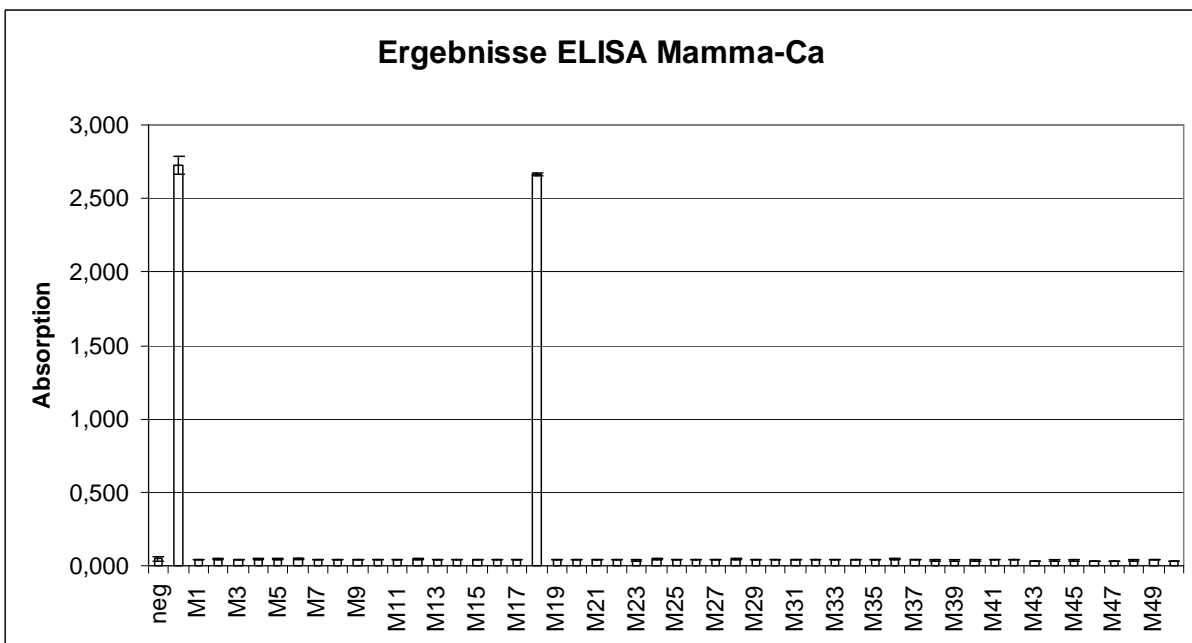


Abb. 8: Häufigkeit von pP-7 Trägern bei Mamma-Karzinom. Ergebnisse des ELISA zum Nachweis von pP-7 im peripheren Blut von 50 Patientinnen mit einem Mamma-Karzinom (M1-M50) unterschiedlicher klinischer Stadien und histologischer Subtypen. Die ersten beiden Balken zeigen die Negativ- und Positivkontrolle. Alle Proben wurden doppelt analysiert; aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

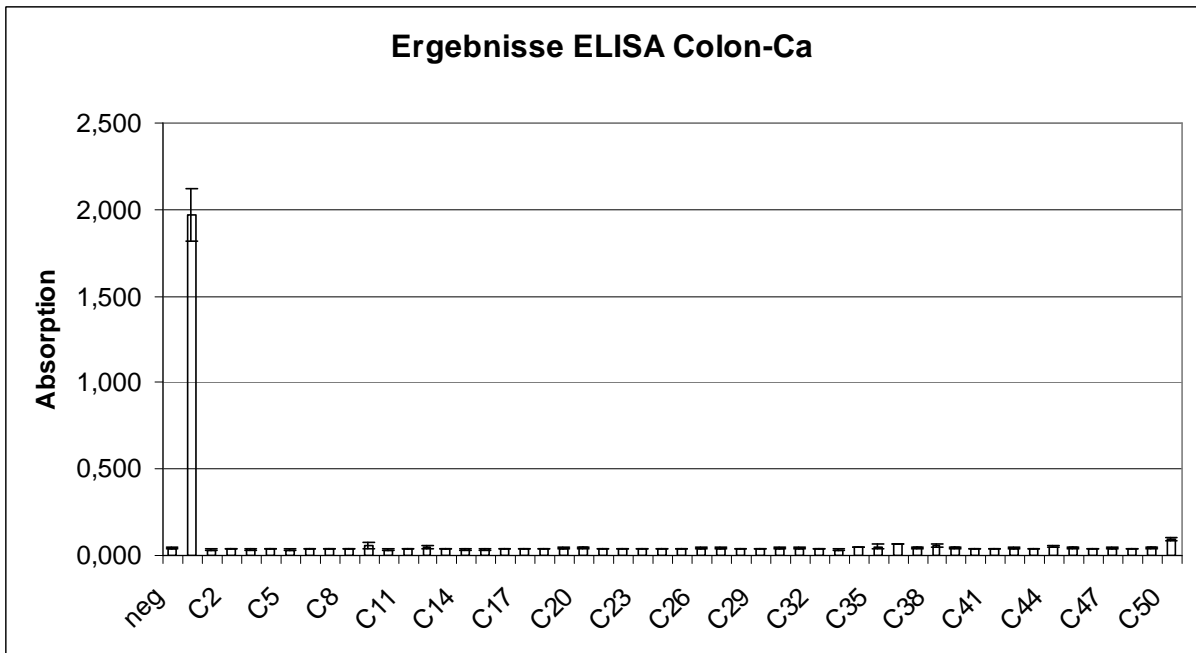


Abb. 9: Häufigkeit von pP-7 Trägern bei Colon-Karzinom. Ergebnisse des ELISA zum Nachweis von pP-7 im peripheren Blut von 50 Patientinnen und Patienten mit einem Colon-Karzinom (C1-C50) unterschiedlicher klinischer Stadien und histologischer Subtypen. Die ersten beiden Balken zeigen die Negativ- und Positivkontrolle. Alle Proben wurden doppelt analysiert; aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

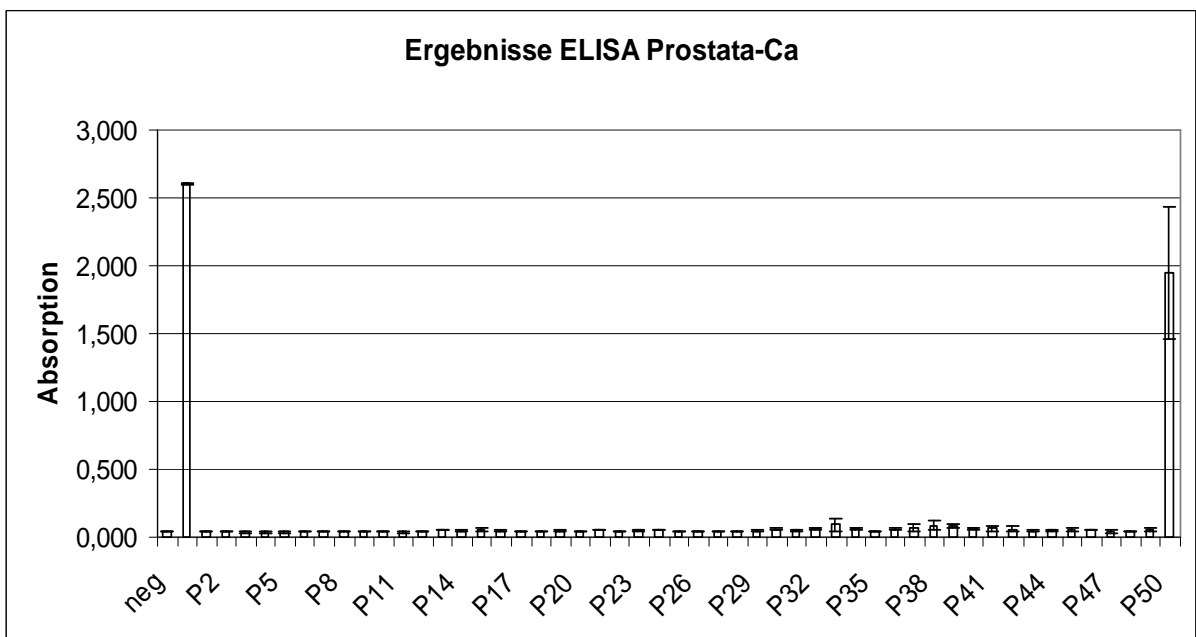


Abb. 10: Häufigkeit von pP-7 Trägern bei Prostata-Karzinom. Ergebnisse des ELISA zum Nachweis von pP-7 in peripheren Blut von 50 Patienten mit einem Prostata-Karzinom (P1-P50) unterschiedlicher klinischer Stadien und histologischer Subtypen. Die ersten beiden Balken zeigen die Negativ- und Positivkontrolle. Alle Proben wurden doppelt analysiert; aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Ergebnisse des ELISA konnten durch Untersuchungen der isoelektrischen Fokussierung bestätigt werden (Abb. 11). Es zeigte sich ein unterschiedliches Laufverhalten der Banden von Paratarg-7 bei pP-7-Trägern und den Patienten, die kein hyperphosphoryliertes Paratarg-7-Protein aufwiesen. Durch Phosphataseuntersuchungen mit mutierten Paratarg-7-Varianten war gezeigt worden, dass dieser Bandenunterschied zwischen hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7) und „Wild-Typ“ Paratarg-7 (P-7) durch eine zusätzliche Phosphorylierung von Paratarg-7 an Serin 17 bedingt ist (Grass *et al.*, 2009).

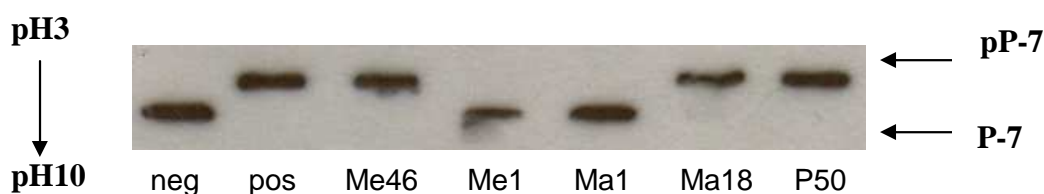


Abb. 11: IEF-Immunoblot-Analyse der Paratarg-7-Phosphorylierung bei Tumorpatienten.

Die Auftrennung erfolgte mittels IEF-Fertiggelen unter Bedingungen des Herstellers. Anschließend an den Transfer auf die Immobilon-Membran erfolgte die Detektion des Paratarg-7 durch Immunnachweis mittels STOML2-Antikörper.

Proben: Me46 (Melanom 46), Ma18 (Mamma18) und P50 (Prostata 50): Patienten mit nachgewiesenem hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7).

Me1 (Melanom 1) und Ma1 (Mamma1): Paratarg-7 negativ, gesunde Kontrollen (P-7).

Ergänzend konnte in einem spezifischen anti-Paratarg-7-Paraprotein-ELISA bei den 3 Patienten mit einem soliden Tumor (je ein Patient mit einem Melanom, einem Prostata- und einem Mamma-Ca), die Träger von pP-7 sind, keine pP-7-spezifische Paraproteine im Serum nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte durch Immunfixation nachgewiesen werden, dass diese 3 Patienten auch kein Paraprotein anderer Spezifität hatten. Sie waren zwar Träger von pP-7, wiesen aber aktuell kein monoklonales Paraprotein auf. Die Anti-Paratarg-7-Reaktivitäten von Paraproteinen bei Patienten mit einem MGUS/MM oder WM zeigen Titer von $1:10^8$ to $1:10^{10}$ (Grass *et al.*, 2009; Grass *et al.*, 2011; Preuss *et al.*, 2009). Dagegen zeigen sich bei gesunden Kontrollen als auch bei den hier getesteten pP-7 Trägern keine Reaktion bei Serumverdünnungen von $\leq 1:10^2$. Niedrigere Serumverdünnungen wurden nicht getestet, da sie einen zu starken Hintergrund im ELISA verursachen und somit eine Auswertung unmöglich machen.

Insgesamt ergab sich bei keiner der hier untersuchten Tumorentitäten eine signifikant erhöhte Prävalenz von pP-7. Bezüglich des gesamten Kollektivs ergibt sich damit eine Prävalenz von 1,2% (3/250), bezogen auf die unterschiedlichen Tumorentitäten eine maximale Prävalenz von 2% für das maligne Melanom, das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom (1/50). Die Prävalenz von 2% entspricht dabei der Prävalenz von 2% in der Normalbevölkerung (4/200) (Grass *et al.*, 2009).

VI. Diskussion

Paratarg-7 ist ein häufiges Zielantigen von Paraproteinen bei monoklonalen Gammopathien unterschiedlicher Ätiologie. So konnte gezeigt werden, dass bei ca. 15% aller IgG-, IgA-MGUS/MM-Patienten und bei ca. 11% aller untersuchten IgM-MGUS/MW-Patienten Paratarg-7 ein Zielantigen der entsprechenden Paraproteine ist. Paratarg-7 von Patienten und gesunden Kontrollen zeigte keine Unterschiede im Bezug auf DNA-Sequenz, was Mutationen oder Polymorphismen als Grund für die Autoimmunogenität ausschließt. Durch 2D-Gel-Analysen, Untersuchungen der isoelektrischen Fokussierung und Phosphatasebehandlung konnte gezeigt werden, dass alle Patienten mit einem pP-7 spezifischen Paraprotein eine hyperphosphorylierte Variante des Proteins aufweisen. Der Unterschied zwischen Wild-Typ und hyperphosphoryliertem Paratarg-7 ist eine Phosphorylierung an einer einzigen Stelle (Serin 17), die im Paraprotein-bindenden Epitop lokalisiert werden konnte (Preuss *et al.*, 2011). Diese zusätzliche Phosphorylierung erhöht das Molekulargewicht von Paratarg-7 (37.000 Da) um nur 90 Da, und es ist somit nachvollziehbar, dass dieser kleine Unterschied nicht von der SDS-PAGE detektiert werden konnte, wohl aber durch die isoelektrische Fokussierung (Grass *et al.*, 2009).

Die Frequenz von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 (pP-7) unter Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und Morbus Waldenström und in gesunden Kontrollen zeigt ein 7,9-fach erhöhtes Risiko für die Erkrankung an IgA-, IgG-MGUS und Multiplem Myelom bzw. ein 6,2-fach erhöhtes Risiko für die Erkrankung an IgM-MGUS oder Morbus Waldenström. Der Trägerstatus von hyperphosphoryliertem P-7 hat somit die bisher höchste OR als Risikofaktor für MGUS, MM und WM (Grass *et al.*, 2009; Grass *et al.*, 2011).

In allen getesteten Familien zeigte die Analyse von Verwandten der Patienten mit MGUS/MM/WM mit einem Paratarg-7-spezifischen Paraprotein, dass die Hyperphosphorylierung von P-7 autosomal dominant vererbt wird. Hierdurch lässt sich erstmals die familiäre Häufung des Multiplen Myeloms und Morbus Waldenström erklären (Grass *et al.*, 2009; Grass *et al.*, 2011).

Die Arbeitsgruppe der Universität des Saarlandes um Prof. Dr. Michael Pfreundschuh konnte hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als ersten dominant vererbten Risikofaktor bei einer hämatologischen Neoplasie nachweisen, was die Identifikation von

Familienmitgliedern von Patienten mit MGUS, Multiplem Myelom und Morbus Waldenström mit erhöhtem Risiko für diese Erkrankungen möglich macht (Grass *et al.*, 2009; Grass *et al.*, 2011).

Schließlich lässt die Tatsache, dass hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine aller Patienten mit MGUS, multiplem Myelom und WM mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 fungiert, Grund zur Annahme, dass das hyperphosphorylierte Protein eine Rolle in der Pathogenese dieser Neoplasien spielt. Die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 scheint der nächstliegende Grund für seine Autoimmunogenität zu sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass bestimmte Phosphoepitope eine höhere Bindungsaffinität zum major histocompatibility-Komplex haben und stärkere CD8+ (Mohammed *et al.*, 2008) und CD4+ (Meyer *et al.*, 2009) T-Zell-Antworten induzieren als nicht phosphorylierte Epitope desselben Antigens.

Weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Inaktivierung der Protein Phosphatase 2A (PP2A), durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes 307 im katalytischen Zentrum des Enzyms, verantwortlich für die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 ist (Preuss *et al.*, 2011). Die Inaktivierung des in seiner aktivierten Form als Tumorsuppressor fungierenden Enzyms verhindert, dass Zielproteine der PP2A, hier Paratarg-7, dephosphoryliert werden können. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass dieselbe Phosphatase bei der Phosphorylierung aller bisher bekannten autoantigenen Zielstrukturen von Paraproteinen involviert ist (Preuss *et al.*, 2011). Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 liegt vermehrt im Körper vor und ist so ein konstanter Stimulus auf das Immunsystem. Es führt v.a. zu einer starken CD4-Aktivierung und bei Vorhandensein bestimmter MHC-Allele wird das phosphorylierte Peptid von CD4-Zellen erkannt, die ihrerseits den B-Zellklon mit derselben Antigenpezifität stimulieren, der dadurch verstärkt proliferiert und somit ein erhöhtes Risiko hat zu entarten (unveröffentlichte Daten).

Es ist erstaunlich, dass pP-7 mit zwei in ihrer Biologie und klinischen Erscheinungsform sehr unterschiedlichen B-Zell-Neoplasien assoziiert ist. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob hyperphosphoryliertes Paratarg-7 auch bei anderen Krebsentitäten eine pathogenetische Rolle spielt. Im Falle der hier untersuchten

soliden Tumoren (Bronchial-Ca, malignes Melanom, Mamma-Ca, Colon-Ca und Prostata-Ca) kann diese Frage klar verneint werden.

Wenn auch vieles dafür spricht, dass pP-7 über eine chronische Antigenstimulation zum MGUS/MM/WM führt, so kann doch nicht ausgeschlossen werden, dass die Hyperphosphorylierung nicht auch über andere Mechanismen malignes Wachstum induziert. Deshalb war es wichtig, zu untersuchen, ob Patienten mit anderen bösartigen Erkrankungen ebenfalls gehäuft pP-7 Träger sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden insgesamt 250 Patienten mit soliden Tumoren untersucht. Dabei ergab sich bei keiner der genannten Tumorentitäten (Bronchial-Ca, malignes Melanom, Mamma-Ca, Colon-Ca und Prostata-Ca) eine signifikant erhöhte Prävalenz von pP-7. Bezüglich des gesamten Kollektivs ergibt sich damit eine Prävalenz von 1,2% (3/250), bezogen auf die unterschiedlichen Tumorentitäten eine maximale Prävalenz von 2% für das maligne Melanom, das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom (1/50). Die Prävalenz von 2% entspricht dabei der Prävalenz von 2% in der Normalbevölkerung (4/200) (Grass *et al.*, 2009). Da die Prävalenz von pP-7 Trägern unter den Patienten mit soliden Tumoren nicht höher als in der Normalbevölkerung ist, ist es unwahrscheinlich, dass die Trägerschaft von pP-7 einen Risikofaktor für die Entstehung der jeweiligen soliden Tumoren darstellt, bzw. dass pP-7 an der Pathogenese dieser Tumoren beteiligt ist.

Die Untersuchung auf pP-7 bei Patienten mit follikulärem Lymphom (1/50), Mantelzelllymphom (1/29), diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (1/100), Hodgkin-Lymphom (1/58), chronisch lymphatischer Leukämie (0/50) und akut lymphatischer/myeloischer Leukämie (1/33) ergab ebenfalls keinen Hinweis darauf, dass pP-7 bei diesen hämatologischen Neoplasien eine Rolle spielt (Grass *et al.*, 2011). Alle diese Untersuchungen zusammen lassen die Schlussfolgerung zu, dass pP-7 ein Risikofaktor für MGUS/MM/WM darstellt, nicht aber für andere hämatologische Neoplasien oder solide Tumoren.

Zwar wird Paratarg-7 als SLP-2 bei einigen soliden Tumoren überexprimiert und ist mit vermehrter Tendenz zur Metastasierung, fortgeschrittenem klinischen Stadium und reduziertem Gesamtüberleben assoziiert (Cao *et al.*, 2007a; Cao *et al.*, 2007b; Cao *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000), doch spielt die Überexpression

des Proteins eine andere Rolle in der Pathogenese solider Tumoren und hat andere Ursachen als die Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 bei MGUS, MM und WM, was die spezifische Rolle von pP-7 in der Pathogenese von monoklonalen Gammopathien noch verdeutlicht.

Mittlerweile ist bekannt, dass auch die weiteren durch die Arbeitsgruppe identifizierten Zielantigene von Paraproteinen alle hyperphosphoryliert vorliegen und die PP2A bei all diesen Patienten durch Phosphorylierung inaktiviert ist und somit das jeweilige Substrat (theoretisches Zielantigen) nicht mehr dephosphoryliert werden kann (Preuss *et al.*, 2011). Somit ist die Phosphorylierung als die Hauptursache der Autoimmunogenität anzusehen und nimmt über die Deaktivierung der PP2A eine Schlüsselrolle in der Genese ein. Die unmittelbare Proteinfunktion von Paratarg-7 als SLP2, wie es für die soliden Tumore beschrieben ist, scheint nach heutiger Kenntnis keine Rolle in der Pathogenese der monoklonalen Gammopathien zu spielen.

VII. Literaturverzeichnis

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, and Jaffe ES (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, **117**, 5019-5032.
2. Cao W, Zhang B, Liu Y, Li H, Zhang S, Fu L, Niu Y, Ning L, Cao X, Liu Z, and Sun B (2007a) High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival. *Am J Clin Pathol*, **128**, 430-436.
3. Cao WF, Zhang LY, Liu MB, Tang PZ, Liu ZH, and Sun BC (2007b) Prognostic significance of stomatin-like protein 2 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: clinical, histologic, and immunohistochemistry analyses with tissue microarray. *Hum Pathol*, **38**, 747-752.
4. Cao WF, Zhang LY, Zhang B, Wang YQ, Liu ZH, and Sun BC (2010) [Expression of SLP-2 protein in esophageal squamous cell carcinoma is associated with cancer invasion]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **32**, 830-833.
5. Colwell NS, Tollefsen DM, and Blinder MA (1997) Identification of a monoclonal thrombin inhibitor associated with multiple myeloma and a severe bleeding disorder. *Br J Haematol*, **97**, 219-226.
6. Cui Z, Zhang L, Hua Z, Cao W, Feng W, and Liu Z (2007) Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma. *Oncol Rep*, **17**, 829-833.
7. Friedman DF, Cho EA, Goldman J, Carmack CE, Besa EC, Hardy RR, and Silberstein LE (1991) The role of clonal selection in the pathogenesis of an autoreactive human B cell lymphoma. *J Exp Med*, **174**, 525-537.
8. Gallagher RP, Spinelli JJ, Elwood JM, and Skippen DH (1983) Allergies and agricultural exposure as risk factors for multiple myeloma. *Br J Cancer*, **48**, 853-857.
9. Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Pfoehler C, Murawski N, and 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**, 950-956.
10. Grass S, Preuss KD, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Nikolaus D, Yang Y, Fadle N, Regitz E, Dimopoulos MA, Treon SP, Hunter ZR, and Pfreundschuh M (2011) Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, **117**, 2918-2923.
11. Jack HM, Beck-Engeser G, Lee G, Wofsy D, and Wabl M (1992) Tumorigenesis mediated by an antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8482-8486.

12. Kirchhof MG, Chau LA, Lemke CD, Vardhana S, Darlington PJ, Marquez ME, Taylor R, Rizkalla K, Blanca I, Dustin ML, and Madrenas J (2008) Modulation of T cell activation by stomatin-like protein 2. *J Immunol*, **181**, 1927-1936.
13. Konrad RJ, Kricka LJ, Goodman DB, Goldman J, and Silberstein LE (1993) Brief report: myeloma-associated paraprotein directed against the HIV-1 p24 antigen in an HIV-1-seropositive patient. *N Engl J Med*, **328**, 1817-1819.
14. Koshiol J, Gridley G, Engels EA, McMaster ML, and Landgren O (2008) Chronic immune stimulation and subsequent Waldenstrom macroglobulinemia. *Arch Intern Med*, **168**, 1903-1909.
15. Küppers R (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, **5**, 251-262.
16. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, and Rajkumar SV (2009) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, **113**, 5412-5417.
17. Lewis DR, Pottern LM, Brown LM, Silverman DT, Hayes RB, Schoenberg JB, Greenberg RS, Swanson GM, Schwartz AG, and Liff JM (1994) Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation. *Cancer Causes Control*, **5**, 529-539.
18. Meyer VS, Drews O, Gunder M, Hennenlotter J, Rammensee HG, and Stevanovic S (2009) Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands. *J Proteome Res*, **8**, 3666-3674.
19. Mohammed F, Cobbold M, Zarling AL, Salim M, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, and Willcox BE (2008) Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for the presentation of transformed self. *Nat Immunol*, **9**, 1236-1243.
20. Preuss KD, Held G, Kubuschok B, Hung CZ, Malatsidze N, Wagner M, and 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**, 459-461.
21. Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Murawski N, and Grass S (2009) A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int J Cancer*, **125**, 656-661.
22. Preuss KD, Pfreundschuh M, Fadle N, Regitz E, Raudies S, Murawski N, Ahlgrimm M, Bittenbring J, Klotz M, Schafer KH, Held G, Neumann F, and Grass S (2011) Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood*, **118**, 3340-3346.

23. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, and Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11810-11813.
24. Seligmann M and Brouet JC (1990) [Antibody activity of human monoclonal immunoglobulins]. *Pathol Biol (Paris)*, **38**, 822-823.
25. Soderberg KC, Hagmar L, Schwartzbaum J, and Feychting M (2004) Allergic conditions and risk of hematological malignancies in adults: a cohort study. *BMC Public Health*, **4**, 51.
26. Sompuram SR, Bastas G, Vani K, and Bogen SA (2008) Accurate identification of paraprotein antigen targets by epitope reconstruction. *Blood*, **111**, 302-308.
27. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da CS, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehse S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, and Martinou JC (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*, **28**, 1589-1600.
28. Wang Y, Cao W, Yu Z, and Liu Z (2009) Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents. *Cancer Biol Ther*, **8**, 1651-1658.
29. Wang Y and Morrow JS (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**, 8062-8071.

VIII. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Subklassenanalyse von anti-Paratarg-7 spezifischen Paraproteinen

Tabelle 2: Patientenkollektiv

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Nephelometrische und elektrophoretische Bestimmung der Paraproteinmenge
(aus: <http://www.myelom.org/das-myelom/diagnostische-verfahren.html>)

Abb. 2: B-Zell Entwicklung (Küppers, 2005)

Abb. 3: Phosphatase-Behandlung von Paratarg-7 (Grass *et al.*, 2009).

Abb. 4: Familienstammbaum zweier Schwestern mit einem IgG-MGUS, beide Trägerinnen von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 mit einem IgG-Paratarg-7-spezifischem Paraprotein (Grass *et al.*, 2009)

Abb. 5: Funktionsweise des ELISA
(aus: <http://www.thermoscientific.com/perbio>)

Abb. 6: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim Bronchial-Karzinom

Abb. 7: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim malignem Melanom

Abb. 8: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim Mamma-Karzinom

Abb. 9: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim Colon-Karzinom

Abb. 10: Häufigkeit von pP-7 Trägern beim Prostata-Karzinom

Abb. 11: IEF-Immunoblot-Analyse der Paratarg-7-Phosphorylierung bei Tumorpatienten.

IX. Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Pfreunds Schuh danke ich für das Überlassen des Themas und die Möglichkeit mit einer sehr engagierten Arbeitsgruppe zusammenzuarbeiten.

Für die fachlich kompetente Unterstützung und die vielen Anregungen möchte ich mich bei Herrn Dr. Dieter Preuss herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich allen Labormitarbeitern des onkologischen Labors für die Unterstützung danken, insbesondere bei Frau Natalie Fadle für den Beistand während meiner Laborarbeit.

Außerdem danke ich allen Patienten und deren Familien, die an der Studie teilgenommen haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meiner Ausbildung, den Rückhalt und die jahrelange Unterstützung bedanken. Besonders meiner kürzlich verstorbenen Mutter gilt meine größte Dankbarkeit für ihren zu Lebzeiten so ermutigenden moralischen Beistand.