

Aus der Medizinischen Klinik I für Onkologie,
Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh

**Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als
autosomal dominant vererbter Risikofaktor
für MGUS und Multiples Myelom
bei Afroamerikanern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015

vorgelegt von

Michaela Auth

Geb. am: 16.02.1986 in Nagold

Homburg, 2015

Tag der Promotion:	08.12.2020
Dekan:	Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh († 5. März 2018) Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer Prof. Dr. med. Norbert Graf

I. Inhaltsverzeichnis

II. Zusammenfassung	3
III. Einleitung	5
<i>III.I. Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)</i>	5
<i>III.II. Smoldering (asymptomatisches) Multiple Myeloma (SMM)</i>	5
<i>III.III. Multiples Myelom</i>	5
<i>III.IV. Prävalenz von MM, MGUS und SMM in verschiedenen ethnischen Gruppen</i>	6
<i>III.V. Ätiologie und Pathogenese der MGUS sowie des Multiplen Myeloms</i>	7
<i>III.VI. Stand der Forschung</i>	11
<i>III.VII. Charakterisierung von Paratarg-7</i>	11
<i>III.VIII. Ziele der Arbeit</i>	15
IV. Material	17
<i>IV.I. Reagenzien</i>	17
<i>IV.II. Puffer / Medien</i>	17
<i>IV.III. Antikörper</i>	18
V. Patienten und Methoden	19
<i>V.I. Patienten und Kontrollen</i>	19
<i>V.II. Isoelektrische Fokussierung zur Ermittlung des pP-7 Trägerstatus</i>	19
<i>V.III. P-7 ELISA zum Nachweis P-7 spezifischer Paraproteine</i>	22
VI. Statistische Methoden	25
VII. Ergebnisse	26
<i>VII.I. Untersuchung der MGUS/MM Patienten Proben</i>	26
<i>VII.II. Odds Ratio</i>	30
<i>VII.III. Ergebnis der Untersuchung der gesunden Kontrollen</i>	31
VIII. Diskussion	35
IX. Literaturverzeichnis	39
X. Abbildungsverzeichnis	44
XI. Tabellenverzeichnis	45
XIII. Abkürzungsverzeichnis	46
XIV. Lebenslauf	48

II. Zusammenfassung

Paratarg-7 (P-7) ist ein Paraprotein-Zielantigen, welches bei MGUS und MM Patienten mit einem Paratarg-7 spezifischen Paraprotein in hyperphosphorylierter Form (pP-7) vorliegt und ist bei gesunden europäischen sowie japanischen Trägern von pP-7 mit einem erhöhten Risiko für MGUS/MM assoziiert. Familienuntersuchungen haben bereits gezeigt, dass pP-7 autosomal dominant vererbt wird. Da in der afroamerikanischen Bevölkerung eine deutlich höhere Inzidenz für MGUS/MM vorliegt, sollte in der vorliegenden Studie der Trägerstatus des hyperphosphorylierten Paratarg-7 (pP-7) in dieser Bevölkerungsgruppe untersucht werden. In dieser Arbeit haben wir afroamerikanische Patienten und gesunde Kontrollen untersucht und die Zahl europäischer wie auch japanischer MGUS/MM Patienten erhöht. Zunächst wurden die Seren mittels ELISA auf P-7-Reaktivität getestet, im Anschluss wurde in der isoelektrische Fokussierung und einer Phosphatasebehandlung der Phosphorylierungsgrad von P-7 untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass bei allen MGUS/MM Patienten, welche ein P-7-spezifischen Paraprotein aufwiesen, P-7 auch in hyperphosphorylierter Form vorlag. Wir fanden pP-7-Träger mit einem P-7-spezifischen Paraprotein in 30/81 (37%) der afroamerikanischen, in 42/252 (16,7%) der europäischen und in 7/176 (4,0%) der japanischen MGUS/MM Patienten Proben ($p < 0,001$). Der Trägerstatus von pP-7 bei gesunden Kontrollen lag bei 11/100 (11%) der afroamerikanischen, bei 8/550 (1,5%) der europäischen und bei 1/278 (0,4%) der japanischen gesunden Kontrollen vor, dies entspricht einer Odds Ratio für MGUS/MM bei Trägern von pP-7 von 4,8 bei den Afroamerikanern, 13,6 bei den Europäern und 11,5 bei den Japanern. Daraus schließen wir, dass das Vorliegen eines pP-7 bei Gesunden der stärkste und bisher einzige molekular definierte Risikofaktor für MGUS und MM in allen drei ethnischen Gruppen ist. Die hohe Prävalenz von Trägern des pP-7 unter MGUS/MM Patienten aller drei ethnischen Gruppen spricht für eine wichtige Rolle dieses genetischen Risikofaktors in der Pathogenese dieser Erkrankungen.

II. Summary

Pratarg-7 (P-7) is a paraprotein target antigen that is present in patients with MGUS and MM with a paratarg-7 specific paraprotein as a hyperphosphorylated variant. Hyperphosphorylated P-7 is associated with an increased risk to develop MGUS/MM in healthy European and Japanese carriers of pP-7. Due to a significantly higher incidence of MGUS / MM in the Afro-American population, the aim of this study was the investigation of the carrier state of hyperphosphorylated paratarg-7 (pP-7) in this population. We have studied African-American patients and healthy controls. To increase the validity of previous studies in which European and Japanese patients and healthy control groups were investigated, we analyzed additional samples from these ethnic groups. For the analysis of the samples we performed an ELISA and an isoelectric focusing. The ELISA detects P-7 specificity of the paraproteins. The isoelectric focusing shows whether P-7 is hyperphosphorylated or not. Among MGUS / MM patients we found P-7 specific paraproteins and the associated carrier status of pP-7 in 30/81 (37%) of African-American, in 42/252 (16.7%) of European, and in 7/176 (4, 0%) of Japanese patients ($p < 0.001$). The carrier state of pP-7 in healthy control groups was 11/100 (11%) of African-American in 8/550 (1.5%) of European and 1/278 (0.4%) of the Japanese healthy control groups. This corresponds to an odds ratio of 4,8 for MGUS / MM in carriers of pP-7 among African-Americans, 13,6 in Europeans and 11.5 in Japanese. We conclude that the presence of a pP-7 in healthy individuals is the strongest and to date the only molecularly defined risk factor for MGUS and MM in all three ethnic groups. The high prevalence of pP-7 carriers among MGUS/MM patients in all 3 ethnic groups suggests an important role of this genetic risk factor in the pathogenesis of these diseases.

III. Einleitung

III.I. Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)

Eine Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz beschreibt eine klonale B-Zell Proliferation, bei der es zu einer Bildung von Paraproteinen kommt. Man findet daher eine konstant erhöhte Immunglobulin-Konzentration im Serum dieser Patienten. Die Immunglobuline gehören zu den Klassen IgG, IgA, IgM oder IgD. MGUS-Patienten sind definitionsgemäß asymptomatisch und es liegen keine Hinweise auf Endorganschäden vor. Zu finden ist eine MGUS bei 3-4% der über 50-jährigen und die Progressionsrate beträgt 0,5-1% / Jahr [1]. Das Progressionsrisiko einer MGUS ist beispielsweise bei einem IgG-Subtyp deutlich geringer als bei einem IgA- oder IgM-Typ. Grundsätzlich geht die Progression bei einem IgM-MGUS in Richtung Non-Hodgkin-Lymphom, Waldenström'sche Makroglobulinämie bzw. selten in Richtung einer chronischen lymphatischen Leukämie, während eine IgG oder IgA MGUS Progression in Richtung eines multiplen Myeloms oder einer Amyloidose zeigt [2][3]. Im Hinblick auf die konstant erhöhte Immunglobulin-Konzentration im Serum und das Fehlen von Endorganschäden lassen sich von einer MGUS das Smoldering Myeloma (SMM) und das Multiple Myelom (MM) abgrenzen.

III.II. Smoldering (asymptomatisches) Multiple Myeloma (SMM)

Das SMM beschreibt ca. 15% aller Myelome. Die Progressionsrate beträgt 10% /Jahr, ist also wesentlich höher als es bei einer MGUS der Fall ist. Ebenfalls finden sich hier noch keine Anhaltspunkte für Endorganschäden (CRAB). Es handelt sich wie auch bei der MGUS um eine heterogene Gruppe mit prognostisch unterschiedlichen Subgruppen. Die Konzentration des monoklonalen Immunglobulins im Serum wie auch der Plasmazellanteil im Knochenmark zählen zu den wichtigsten prognostischen Faktoren[3].

III.III. Multiples Myelom

Beim Multiplen Myelom handelt es sich um eine zytogenetisch heterogene Gruppe von malignen Plasmazellproliferationen. Das Multiple Myelom beschreibt eine klonale Proliferation von B-Zellen, bei der es zur Bildung von sogenannten Paraproteinen kommt. Diese sind im Blut nachweisbare monoklonale intakte Immunglobuline, welche

von den proliferierenden Plasmazellen gebildet werden. Die produzierten Immunglobuline gehören den Klassen IgA, IgG, IgM und IgD an [4]. Anhand dieser Immunglobulin-Klassen werden die MM voneinander unterschieden, wobei das IgG-MM mit Abstand die häufigste Form ist [4]. Die Differenzierung zwischen MGUS und MM kann anspruchsvoll sein und erfolgte bisher nach den CRAB Kriterien. Diese umfassen eine Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen. Bisher waren schwere Endorganschäden notwendig, um die Diagnose stellen zu können und eine Therapie einzuleiten, daher sollen nun Biomarker und Schnittbildgebungen wie beispielsweise ein Plasmazellbefall im Knochenmark von >60%, eine freie Leichtketten Ratio von >100 sowie mehr als 1 Knochenläsion im MRT, low-dose CT oder PET-CT als Diagnosekriterien implementiert werden, um eine frühere Therapieeinleitung bei betroffenen Patienten zu ermöglichen [1].

III.IV. Prävalenz von MM, MGUS und SMM in verschiedenen ethnischen Gruppen

Die Prävalenz von MGUS/MM in der afroamerikanischen Bevölkerung ist in etwa doppelt so hoch wie die der weißen Bevölkerung (3,2%) [5]. Für eine genetische Komponente in der Ätiologie sprechen die Häufung von Plasmazelldysplasien unter Geschwistern oder gar eineiigen Zwillingen sowie die zahlreich dokumentierte familiäre Häufung [6][7]. Als weitere Risikofaktoren gelten ein Lebensalter über 50 Jahre, zu diesem Zeitpunkt leiden bereits 3,2% der Kaukasier, 5,84% der Afroamerikanern und 2,4% der Asiaten und Mexikaner an einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz [8]. Siehe Abbildung 1.

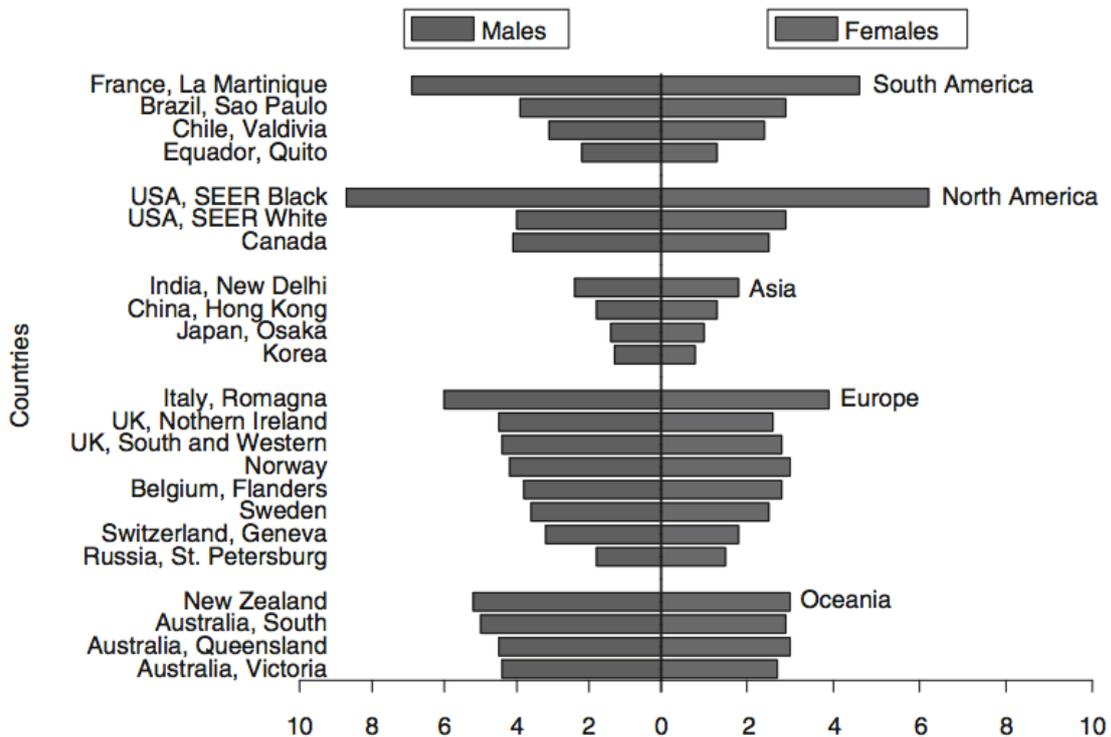


Abbildung 1: Die weltweite Inzidenz des Multiplen Myeloms (altersadaptiert pro 100.000 Personen pro Jahr). Während in der Geschlechterverteilung kaum Unterschiede zu finden sind, zeigen sich deutliche regionale Inzidenzunterschiede. Während Asiaten die niedrigste Inzidenz haben, liegt Europa im mittleren Bereich und die afroamerikanische Bevölkerung weist die höchste Inzidenz auf [8].

Die Progressionsrate des MGUS zum MM verhält sich in allen drei ethnischen Gruppen ähnlich. Frauen sind generell seltener betroffen als Männer (2,7% vs 4,0%) [9]. Die Strahlenbelastung in jungen Jahren scheint eine Rolle zu spielen, und Berufsgruppen, die regelmäßig Pestiziden ausgesetzt sind, scheinen ebenfalls ein gesteigertes Risiko für ein MGUS oder MM aufzuweisen [10][11].

III.V. Ätiologie und Pathogenese der MGUS sowie des Multiplen Myeloms

Beim Multiplen Myelom handelt es sich um eine maligne Plasmazell-Neoplasie mit Infiltration des Knochenmarks seltener auch extramedullärer Strukturen durch Plasmazellen. Es sind sowohl reife als auch unreife Plasmazellen betroffen. Es kommt zudem zu einer Immunglobulinerhöhung (Myelomprotein, M-Komponente, monoklonales Paraprotein), osteolytischen Knochenläsionen sowie Leicht-Ketten im Urin (Bence-Jones-Proteine). Das MM entwickelt sich aus einer prä-malignen Vorstufe

der MGUS. Die Entstehung des MGUS und MM ist multifaktoriell. Hier spielen zum Beispiel berufsbedingte Exposition mit Pestiziden oder ionisierender Strahlung eine bedeutende Rolle [12]. Oftmals kommt es zur familiären Häufung von MGUS/MM, was wiederum für eine genetische Disposition spricht.

Geht man von einer chronischen Antigenstimulation aus, kommt es infolge derer zur Bildung einer immortalisierten und autonomen Plasmazelle. Erste genetische Veränderungen treten beim MM/MGUS nach der Differenzierung in langlebige Plasmazellen auf, die bereits eine Rekombination der IgH- und IgL-Gene, somatische Hypermutation der variablen IgH und IgL-Genregionen und eine produktive IgH-Switch-Rekombination zu einem anderen Isotyp (IgG, IgA) durchlaufen haben. Chromosomenanomalien wie beispielsweise Monosomie 14, Trisomie 3, 5, 7, 9, 11, 15 und 19 können mittels FISH-Technik nachgewiesen und bei Plasmozytomen ebenfalls gehäuft beobachtet werden. Bisherigen Daten zufolge sind MM mit einer Hypodiploidie mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet. Veränderungen der lymphohämatopoetischen Wachstumsfaktoren (IL-6, IFN- α u.a.) und Adhäsionsmoleküle unterstützen die Entwicklung und Proliferation von Tumorzellen im Knochenmark. Beispielsweise führt IL-1beta zur gesteigerten Bildung von IL-6, welches wiederum das Wachstum von Plasmozytomen über den Ras-MPAK-Signalweg fördert. Hierbei ist erwähnenswert, dass HHV8 in dendritischen Zellen von MM-Patienten gefunden werden konnte. HHV-8 kodiert für ein virales Homolog, welches sich wie menschliches IL-6 verhält und somit in der Lage ist, murine als auch humane Plasmazytomzellen zu stimulieren oder deren Apoptose zu hemmen [13][14]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass HHV-8 zumindest für einen Teil der Plasmazytom-Fälle eine pathogenetische Bedeutung hat. Über Mutationen von Ras-Genen, genetische Veränderungen des p53-Gens sowie des Rb-Gens kann es ebenfalls zur Unterdrückung der Apoptose kommen, was zur Steigerung der Autonomie von Tumorzellen beiträgt[15].

III.V.1. Bedeutung der chronischen Antigenstimulation

Eine Hypothese zur Entstehung von Plasmazytomen stellt die chronische Stimulation des Immunsystems dar. Dafür sprechen die Entstehung von Plasmazelltumoren in anatomischer Nähe zu chronischen Zökumentzündungen bei C3H Mäusen und die Entstehung von Plasmazellraumforderungen nach Injektion von Mineralöl oder Pristan bei BALB/c Mäusen [16][17][18]. Die genannten Mausstämme zeigen unter keimfreien

Lebensbedingungen ein wesentlich geringeres Risiko, ein Plasmazytom zu entwickeln, was ebenfalls für den Einfluss von aus der Darmflora stammenden Antigenen auf die Pathogenese von Plasmazell Dyskrasien spricht [19]. In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass BALB/c Mäuse, welche in einer keimfreien Umgebung leben, gegen eine Plasmazytom-Induktion mit Pristan resistent sind [20]. Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass die durch Antigene induzierte Wachstumssteigerung über eine Kreuzvernetzung der Oberflächenimmunglobuline der malignen B-Zellen vermittelt wird [21].

Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, dass auch Plasmazytome beim Menschen durch eine chronische Antigenstimulation hervorgerufen werden können. Auffallend ist dabei, dass Plasmazytome gehäuft bei Patienten mit chronischen Osteomyelitiden, Pyelonephritiden, Tuberkulose oder chronischen Hepatitiden auftreten, was wiederum für die chronische Antigenstimulation als Ursache der B-Zell Dyskrasie zu sprechen scheint. Es gibt zahlreiche Berichte von Plasmazytompatienten, die zuvor Infektionskrankheiten oder wiederholter Antigenexposition ausgesetzt waren [22], so zum Beispiel durch Infektionen mit *Klebsiella rhinoscleromatis* [23], wiederholten Impfungen [24] oder nach Allergen-Desensibilisierungsbehandlungen [25][26].

III.V.2. Identifizierung der antigenen Zielstrukturen von Plasmazytomen

Die Hypothese der Beteiligung chronischer Antigenstimulation an der Genese eines Plasmazytoms wird durch den Nachweis antigener Zielstrukturen der monoklonalen Paraproteine gestützt. In einigen Fällen ließ sich eine Beziehung zwischen antigener Zielstruktur und vorausgegangener chronischer Immunstimulation herstellen. Beispielsweise entwickelte sich bei einem Patienten ein IgG Plasmazytom mit einer gegen α_2 -Macroglobulin des Pferdes gerichteten Reaktivität, nachdem er zuvor eine therapeutische Injektion von Pferdeserum erhalten hatte [27]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es in Folge chronischer Antigenstimulation unter bestimmten Voraussetzungen zur Entwicklung einer monoklonalen Plasmazell-Population kommen kann, die sich gegen eben dieses Antigen richtet.

Physiologischerweise differenzieren sich B-Lymphozyten im Knochenmark, nachdem zuvor die Gene, die für die Immunglobulin-Leicht- und Schwere- Ketten kodieren, umgelagert wurden. Nachdem ein voll funktionsfähiges Immunglobulin exprimiert wird, wandert die B-Zelle aus dem Knochenmark in die sekundären lymphatischen Organe,

um dort ihre Reifung, Proliferation und Differenzierung durch Antigenstimulation zu erfahren. Die entstandenen Plasmoblasten wiederum entwickeln sich zu kurzlebigen residenten Plasmazellen, welche binnen 3 Tagen wieder absterben. Durch Antigen stimulierte B-Zellen können darüber hinaus, statt abzusterben, in Keimzentren von Lymphknoten einwandern, wo schließlich eine somatische Rekombination stattfindet, was zu einer Selektion von Klonen mit einer hohen Antigenaffinität führt. In den Keimzentren findet ein ‚Klassen-Switch‘ der Immunglobulinproduktion statt. Anstelle von IgM werden dann IgG, IgA oder IgD auf der Oberfläche exprimiert. Anschließend wandern die Plasmazellen zurück ins Knochenmark, wo sie sich endständig differenzieren [28]. Es zeigen sich Gemeinsamkeiten zwischen diesen langlebigen Plasmazellen und Plasmozytom-Plasmazellen. Beispielsweise exprimieren beide CD138- und CD38-Antigene. Des Weiteren besitzen auch Plasmozytom-Plasmazellen rearrangierte Immunglobulinkettengene, jedoch wurde kein Anhalt für andauernde Mutationen gefunden [29]. Dies begründet die These, dass sich Plasmozytom-Plasmazellen aus einem B-Zell-Klon entwickeln, welcher zuvor im Keimzentrum eines Lymphknoten seine antigene Selektion und Affinitätsreifung durchlaufen hat und anschließend ins Knochenmark ausgewandert ist [30][31].

Bis auf einige wenige Einzelfälle sind die Antigene der Paraproteine trotz ihrer den normalen Immunglobulinen identischen Struktur häufig unentdeckt. In wenigen Fällen von Paraproteinen haben zufällige Umstände, wie klinische Symptome, welche durch Paraproteine verursacht werden, z.B. Kryoglobulinämie [32] oder Blutungsanomalien[33], ein Screening gegen prädefinierte Antikörper wie anti-Streptolysin, anti-DNA [27][34] oder Interferenzen mit Laboruntersuchungen wie beispielsweise ein HIV positiver Patient, dessen Paraprotein IgG κ spezifisch mit dem HIV-p24 gag Antigen reagierte [35], dazu beigetragen, die antigenen Zielstrukturen von Paraproteinen zu entdecken.

Bei der Überprüfung dieser Antigene fällt allerdings auf, dass in den wenigsten Fällen eine Paraprotein-vermittelte Spezifität bewiesen wurde. Oftmals können antigene Kreuz- oder unspezifische Reaktionen nicht ausgeschlossen werden. Daher müssen bisherige wissenschaftliche Arbeiten, die die chronische Antigenstimulation als kausale Ursache für ein MGUS/MM sehen, kritisch diskutiert werden, denn häufig wurde keine überzeugenden Kontrollen zum Nachweis der Paraprotein-vermittelten Spezifität geführt, so dass antigenere Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden können.

III.VI. Stand der Forschung

Spezifische antigene Zielstrukturen der Paraproteine können also eine Rolle in der Pathogenese des MM/MGUS spielen. Allerdings konnten bis heute nur wenige dieser Zielstrukturen identifiziert werden. Ein Ansatz unserer Arbeitsgruppe zur Identifikation von Paraproteinzielstrukturen beruhte auf dem Screening von cDNA-Expressionsbibliotheken unterschiedlicher Herkunft mit hochverdünnten Paraprotein-haltigen Seren (Verdünnung 1:10⁸) mittels SEREX (serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning) [36]. Als cDNA Quelle für die antigenen Zielstrukturen wurden sowohl gesunde als auch maligne humane Gewebe sowie die wichtigsten Nahrungsmittel untersucht. Auf diesem Weg wurden die körpereigenen Antigene-TTP2 (Tripeptidyl-Peptidase-II), IGFBP2 (Insulin like growth Faktor Binding Protein-2) und ein Nahrungsmittelantigen – Kinesin aus Schweinefleisch (porcine kinesin) als Paraprotein Zielstrukturen identifiziert. All diese Antigene waren individualspezifisch, das heißt, sie reagierten jeweils nur mit einem Paraprotein.

Mit einem modifizierten Ansatz des SEREX, bei dem ein käuflicher rekombinanter humaner Protein-Makroarray aus fötalem menschlichen Gehirn als Grundlage diente, haben wir das körpereigene Paraprotein-Target „Paratarg-7“ identifiziert. Paratarg-7 reagierte spezifisch mit 15% aller damals getesteten Paraprotein-haltigen IgA/IgG Seren von europäischen Patienten bei hoher Verdünnung (1:10⁸). Durch diverse Absorptionsstudien konnte die Spezifität der Paraprotein-vermittelten Reaktion belegt werden. Nach Absorption mit P-7 verschwand der M-Gradient in der Eiweißelektrophorese, nicht jedoch nach Absorption mit dem Kontrolltarget.

III.VII. Charakterisierung von Paratarg-7

Paratarg-7 ist ein Protein mit noch weitgehend unbekannter Funktion, welches in nahezu allen menschlichen Geweben exprimiert wird. Synonym wurden in der Literatur die Bezeichnungen SLP-2 und STOML-2 verwendet. SLP-2 ist ein 31-kDa mitochondriales Membranprotein, das zusammen mit SLP-1 und SLP-3 zur Familie der Stomatine gehört [37]. Das kodierende Gen findet sich im mitochondrialen Intermembranraum auf Chromosom 9p13. In Erythrozyten findet sich SLP-2 in der Nähe zur Zellmembran, ist jedoch nicht direkt mit ihr verbunden. SLP-2 ist in verschiedenen Tumorgeweben, wie zu Beispiel in Larynx-, Endometriumandeno-,

Mamma-, Bronchial- und Ösophaguskarzinomen überexprimiert [38]. SLP-2 soll eine wichtige Rolle während des Zellwachstums, der Proliferation und der Zelladhäsion spielen, zudem sollte es an der Tumorgenese und Metastasierung beteiligt sein[39]. Polymorphismen und Mutationen als Ursache der Autoimmunogenität von P-7 konnten durch DNA-Sequenzierungen bei Patienten mit einem IgA-, IgG-MGUS ausgeschlossen werden. Es gab weder in der SDS-PAGE, der mRNA Sequenzanalyse, noch auf Ebene der DNA einen Anhalt für Unterschiede im Paratarg-7 -Molekül zwischen erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen. In der isoelektrischen Fokussierung jedoch zeigte sich ein unterschiedliches Laufverhalten von Paratarg-7 aus Lysaten von Patienten mit anti-Paratarg-7 reaktivem Paraprotein und gesunden Kontrollen bzw. von Patienten, mit einem Paraprotein anderer Spezifität [40]. Das Laufverhalten in der isoelektrischen Fokussierung zusammen mit der Sequenzanalyse von Paratarg-7 sprach für eine posttranslationale Veränderung von Paratarg-7 bei den Patienten. Eine Phosphatase-Behandlung führte zu einem identischen Laufverhalten der Paratarg-7 Varianten in der isoelektrischen Fokussierung, was eine Hyperphosphorylierung von Paratarg-7 in den Patienten mit einem Paratarg-7-reaktiven Paraprotein beweist [41]. (Siehe Abbildung 2 und Abbildung 3)

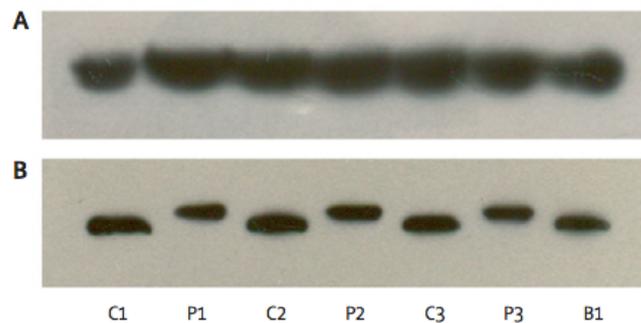


Abbildung 2: Western- Blot- Analyse von Paratarg-7 von Patienten mit Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (P1-P3), einen Patienten mit nicht-Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (B1) und drei gesunden Kontrollpersonen (C1-C3). A: In der SDS-PAGE migrieren alle Banden gleich. B: In der isoelektrischen Fokussierung zeigt sich ein divergentes Laufverhalten zwischen den Patienten mit P-7 spezifischem Paraprotein und Patienten mit einem nicht-P-7 spezifischen Paraprotein [42].

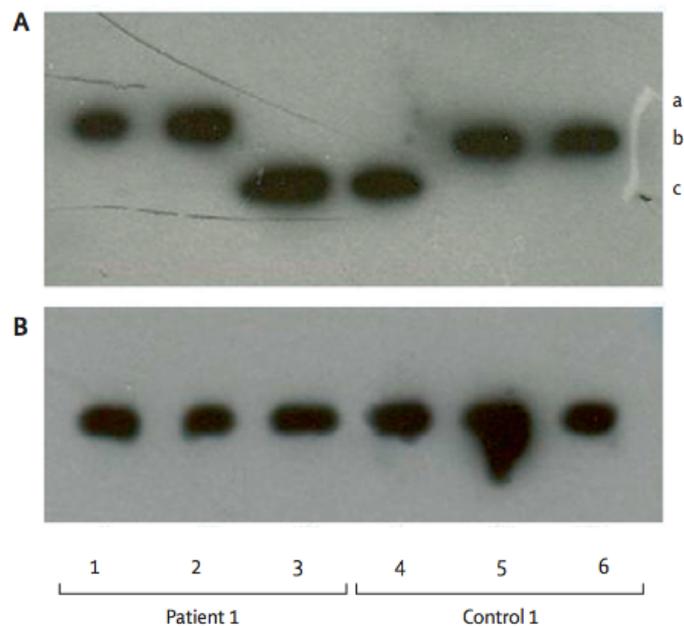


Abbildung 3: Phosphatase-Behandlung von P-7. A: Unbehandelte Lysate von Patienten mit P-7 spezifischen Paraprotein (Patient 1) bzw. einer gesunden Kontrollperson (Control 1) zeigt die isoelektrische Fokussierung ein divergenten Laufverhalten (Banden 3 u. 4). Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase zeigen die Lysate ein identisches Laufverhalten (Banden 2 u. 4)[42].

Die einzige zusätzliche Phosphorylierung findet an einem Serin in Position 17 statt. Mehrere Experimente zeigten, dass an dem untersuchten Phosphorylierungsstatus die Proteinkinase C sowie die Protein Phosphatase 2A (PP2A) eine entscheidende Rolle spielen [41]. (Siehe Abbildung 4)

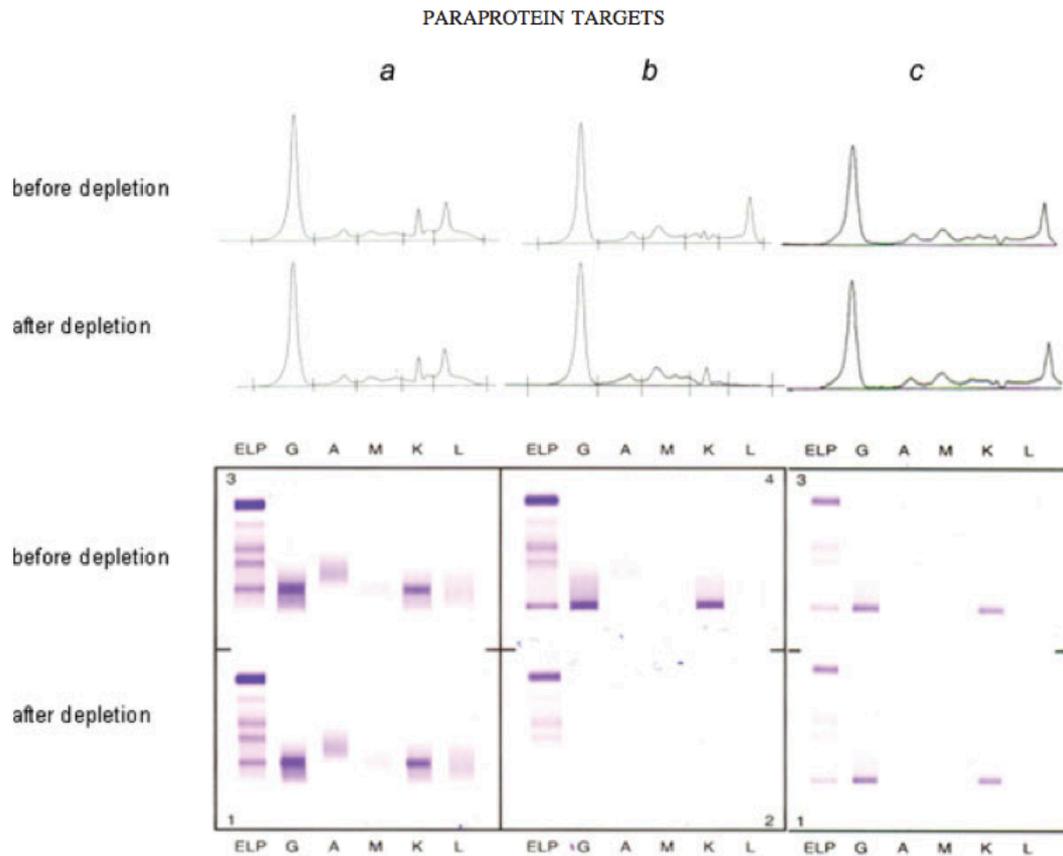


Abbildung 4: Absorption vom Serum eines IgG MM Patienten mit P-7 Spezifität. A: IgG Paraprotein ohne P-7 Spezifität und Absorption durch eine P-7 Säule. B: IgG Paraprotein mit P-7 Spezifität und Absorption durch eine P-7 Säule. C: Dasselbe P-7 spezifische Paraprotein IgG, aber Absorption durch eine Mitofilinsäule (Kontrolle). Obere Bilder: Serumelektrophorese vor und nach Absorption. Untere Bilder: Immunfixation vor und nach der Absorption mit P-7, nicht jedoch nach Absorption mit einem Kontroll-Target [43].

Die hyperphosphorylierte Version des P-7 bei Patienten mit einem P-7 spezifischen Paraprotein konnte inzwischen in acht verschiedenen Familien untersucht werden, hierbei zeigte sich eine autosomal dominante Vererbung von pP-7. (Siehe Abbildung 5)

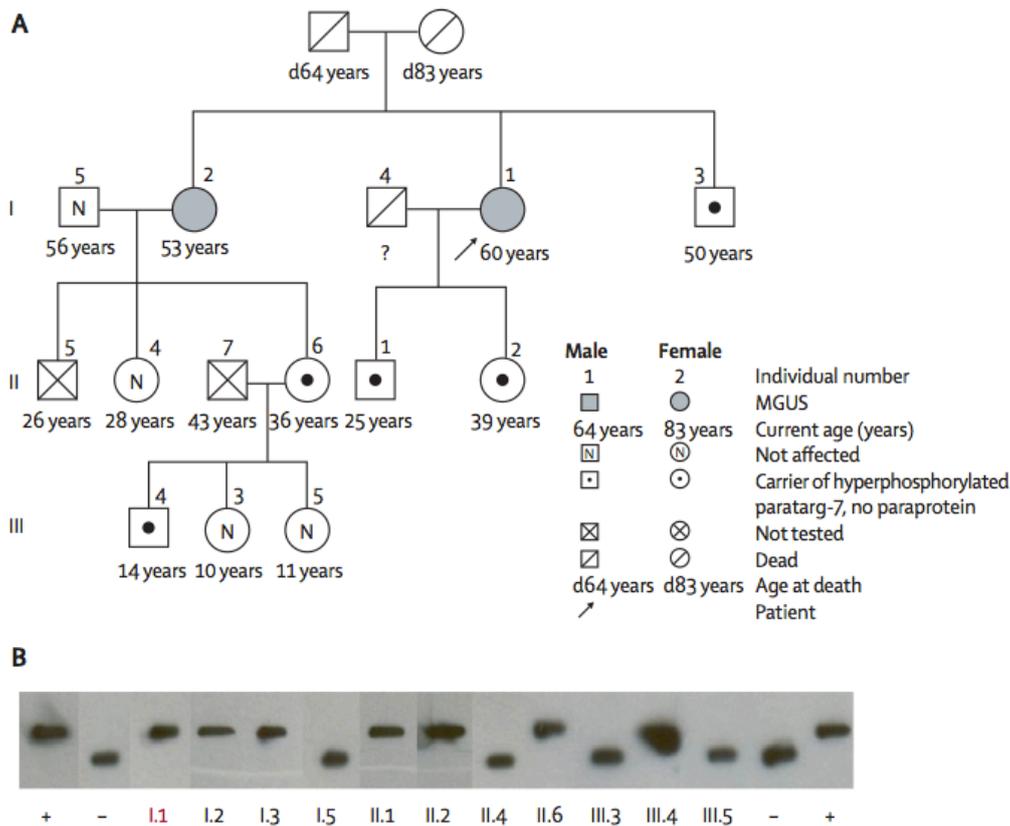


Abbildung 5: Stammbaum einer Familie in der zwei Schwestern eine MGUS mit einem P-7 spezifischen Paraprotein aufweisen. A: Der Stammbaum zeigt die Familienmitglieder zweier Schwestern, welche ein MGUS sowie ein P-7 spezifisches Paraprotein aufweisen. B: Analyse mittels isoelektrischer Fokussierung der Familienmitgliedern [42].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der pP-7 Trägerstatus mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, an einem MGUS/MM zu erkranken [42]. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es auch tatsächlich zum Auftreten eines MGUS/MM kommt. Viele Merkmalsträger sind trotz fortgeschrittenen Alters nicht an einem MGUS/MM erkrankt. pP-7 ist ungeachtet dessen der erste, molekular definierte, vererbare Risikofaktor, der je für eine bösartige hämatologische Erkrankung entdeckt wurde.

III.VIII. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten nun folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Bedeutung und Prävalenz hat pP-7 in Bezug auf andere ethnische Gruppen? Dabei sollten vor allem die Unterschiede zwischen der afroamerikanischen und deutschen Bevölkerung sollen untersucht werden.

2. Bisher gehörten alle pP-7 spezifischen IgG-Paraproteine gehören der Subklasse 3 von IgG an. Deshalb sollte geprüft werden, ob sich diese Beobachtung nach Steigerung der Probenanzahl weiter bestätigt, oder ob sich auch pP-7 spezifische Paraproteine der anderen IgG-Subklassen finden.

IV. Material

IV.I. Reagenzien

- Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropylthiogalactosid „IPTG“ (Biomol, Hamburg, Deutschland)
- Magermilchpulver (Saliter, Obergrünzburg, Deutschland)
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Nitrozellulosefolie (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Trishydrochlorid „TrisHCL“ (vwr International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Trishydroxymethylaminomethan (Sigma, St.Louis, USA)

IV.II. Puffer / Medien

- TBS-Stammlösung
 - ⇒ 8,78g NaCl
 - ⇒ 6,05g TrisHCL
 - ⇒ 1,4g TRIS
 - ⇒ 1L Aqua dest.
- Coating Puffer (ELISA)
 - ⇒ (A) 2,12 NaCO₃ + 100ml Aqua dest.
 - ⇒ (B) 1,68g NaHCO₃ + 100ml Aqua dest.
 - ⇒ 1,7ml A + 0,8ml B + 7,5ml Aqua dest.
- 10ml POX-OPD-Entwicklung
 - ⇒ 2,5ml Lösung A
 - a. 0,2M Dinatriumphosphat 2H₂O
 - b. 3,56 in 100ml Aqua dest.
 - ⇒ 2,5ml Lösung B
 - a. 0,1M Citronensäure 1H₂O
 - b. 2,1g in 100ml Aqua dest.
 - ⇒ 5ml Aqua dest.
 - ⇒ 1 Tbl. OPD

- ⇒ 5µl H₂O₂ 30%
- ⇒ abstoppen mit 3M HCL → 25µl auf 100µl Entwickler
- Western-Blot-Puffer (1.TBS 0,05% Tween = Waschpuffer)
 - ⇒ 8,8g NaCl
 - ⇒ 6,05g Tris
 - ⇒ 0,8ml 5M HCL
 - ⇒ 0,5ml Tween 20
 - ⇒ 1L Aqua dest.
- Lysis Puffer
 - ⇒ 20mM Tris pH8
 - ⇒ 1mM PMSF
 - ⇒ 1mg/ml Lysozym
 - ⇒ 0,05% Triton X
- 2.Blockpuffer
 - ⇒ 100ml Waschpuffer
 - ⇒ 10g Magermilchpuffer
 - ⇒ Bzw. 3g BSA
- Isoelektrische Fokussierung
 - ⇒ Fertiggele, Invitrogen, NovexR pH3-10, Karlsruhe
 - ⇒ Anodenpuffer, Invitrogen, NovexR pH3-10, Karlsruhe
 - ⇒ Kathodenpuffer, Invitrogen, NovexR pH3-10, Karlsruhe

IV.III. Antikörper

- Maus Anti-Flag mAb M2 (Sigma, München, Deutschland)
- Huhn anti-STOML2 (Antikörper online, Aachen, Deutschland),
gerichtet gegen stomatin-like protein 2 (= Paratarg-7)
- Ziege anti-human IgG-biotiniliert (Dianova, California, USA)
- Maus anti-human IgG-biotiniliert (Dianova, California, USA)
- Maus anti-human c-myc Antikörper (BioRad, California, USA)
- Anti-Maus-POX Antokörper (BioRad, California, USA)

V. Patienten und Methoden

V.I. Patienten und Kontrollen

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes und den anderen beteiligten Institutionen genehmigt. Sämtliche Probanden, die teilgenommen haben, Patienten sowie auch gesunde Kontrollen, unterschrieben eine schriftliche Einverständniserklärung. Als krank wurden Patienten mit einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz beziehungsweise einem multiplen Myelom, mit IgA, IgD oder IgG Paraprotein definiert. Als gesunde Kontrollen dienten uns Blutproben von gesunden Europäern, Japanern und Afroamerikanern. Als gesund definierten wir Probanden, bei denen mittels Serumelektrophorese und Immunfixation kein monoklonales Immunglobulin nachweisbar war. Des Weiteren wurden die gesunden Kontrollen durch einen Amtsarzt untersucht und mussten von ihm als klinisch gesund eingestuft werden. Die Seren der afroamerikanischen Patienten mit MGUS/MM oder weiteren malignen Erkrankungen wurden ebenso wie die Proben der gesunden afroamerikanischen Kontrollen am „Emory University Hospital“ in Atlanta (USA) gesammelt. Seren der an einer Autoimmunerkrankung leidenden Patienten wurden in der Abteilung I für Innere Medizin am Universitätsklinikum des Saarlandes gesammelt. Die Blutproben von sämtlichen Probanden wurden zentrifugiert, anschließend wurden die Zellen sowie das Plasma getrennt voneinander bei -20°C gelagert.

V.II. Isoelektrische Fokussierung zur Ermittlung des pP-7 Trägerstatus

V.II.1. Prinzip

In der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Aufgrund ihrer Aminosäurereste können Proteine positiv, negativ oder neutral geladen sein. Diese Nettoladung ist abhängig von dem jeweiligen pH-Wert der Umgebung. So ergibt sich für jedes Protein ein eigener Isoelektrischer Punkt, welcher dem pH-Wert entspricht, an dem die Nettoladung dieses Proteins neutral ist. Die Grundlage für eine funktionierende IEF ist somit ein pH-Gradient, welcher die Proteine auf einer Membran zu ihrem spezifischen isoelektrischen Punkt wandern lässt. Die Proteine werden also auf eine Trennmatrix aufgetragen, an die ein elektrisches Feld angeschlossen wird und somit ein konstanter pH-Gradient entsteht. Sobald die Proteine

im elektrischen Feld ihren jeweiligen isoelektrischen Punkt erreicht haben stoppt ihre Wanderung vom Auftragungsort in Richtung der Kathode.

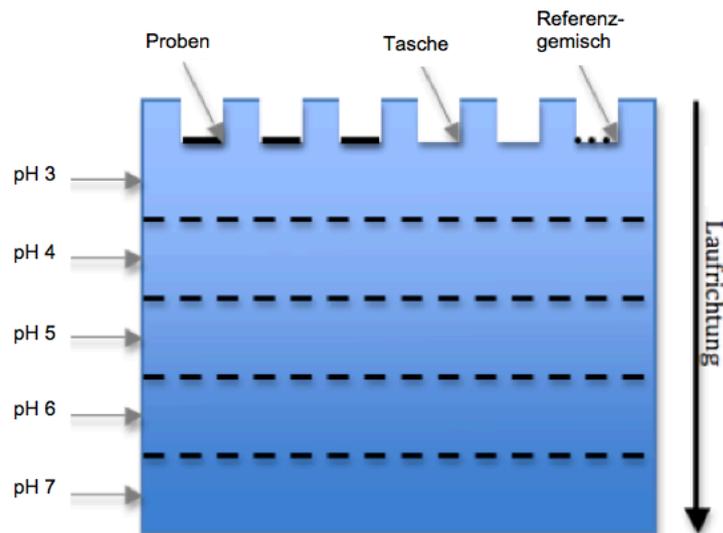


Abbildung 6: Schematische Darstellung der isoelektrischen Fokussierung. Die in die Taschen aufgetragenen Proben laufen nach Anlage der Spannung an das Feld in Richtung Kathode, bis zum Erreichen ihres elektrischen Punktes. (Grafik selbst erstellt)

V.II.2. Vorbereitung der Proben zur IEF

Von den gesammelten Blutproben wurden jeweils 100 µl Vollblut 3-malig mit PBS gewaschen und im Anschluss an jeden Waschgang 1 Minute bei 7000 rpm zentrifugiert. Dann wurden 100 µl PBS und 200 µl Harnstoffpuffer, welcher 8M Harnstoff, 0,1M Phosphat, 10mM Tris-HCL (pH8) und 0,1%ige NP-40 enthält, zur Lyse hinzugegeben. Nachfolgend wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

Zur Durchführung der Isoelektrischen Fokussierung wurden 5 µl der Proben mit 5 µl IEF Puffer gelöst und anschließend in die Ladetaschen übertragen. Anschließend wurde 1 Stunde lang eine Spannung von 100 V, eine weitere Stunde lang 200 mV, zuletzt dann noch 30 min lang eine Spannung von 500 mV angelegt. Hierfür wurden Gele der Firma Invitrogen genutzt (Novex R pH3-10, Invitrogen).

V.II.3. Semi-Dry Übertragung

Nach dem Auftrennen der Proteine sämtlicher Blutproben-Lysate in der IEF wurden diese auf eine Immobilon-P PVDF Membran übertragen (Millipore Immobilon), welche zuvor mit 100% Methanol hydrophilisiert, bewässert und anschließend in Transferpuffer inkubiert wurden. Im Rahmen der Durchführung des Blots wurde auf die Platin-

Anodenseite ein Transferpuffer-getränktes Whatman-Blotpapier gelegt, darauf die präparierte PVDF Membran, auf die das Gel folgt, und daraufhin wieder mit einem getränkten Blotpapier bedeckt. Zuletzt wurde die Platinkathodenplatte aufgelegt. Dann wurde eine Gleichspannung von 25 V bei 150 mA angelegt. Zur Blockade der freien Proteinbindungsstellen wurde die Membran zuletzt bei 4°C mit 10% Milch inkubiert.

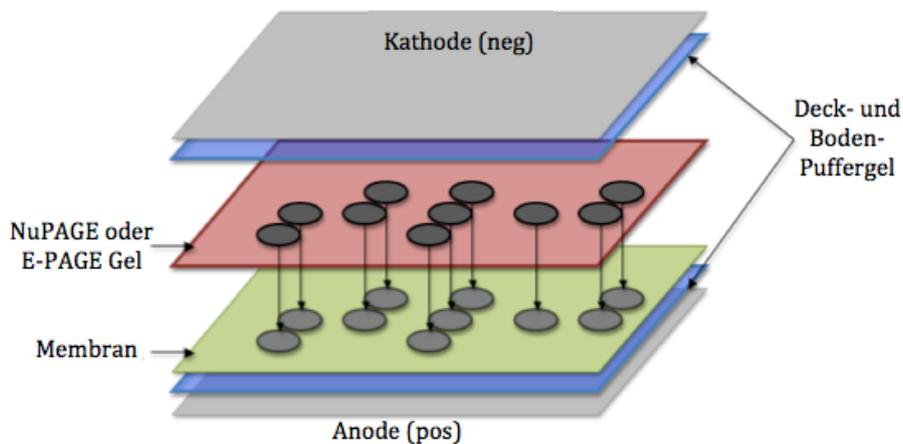


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfermethode. Die Blutproben-Lysate werden auf die PVDF Membran übertragen, diese wird auf ein Whatman-Blotpapier gelegt und von dem Gel und einem weiteren Blotpapier bedeckt. Unter Gleichspannung findet dann die Semi-Dry Übertragung statt. (Grafik selbst erstellt)

V.II.4. Immunoblot

Nach dem Blocken der Membran über Nacht wurde sie 3-malig mit TBS/0,1% TX100 gewaschen. Darauffolgend wurde die Membran eine Stunde lang mit dem Primärantikörper anti-STOML2 (1:250), der gegen stomatin-like protein 2 gerichtet ist, inkubiert. Nun folgte eine erneutes dreimaliges Waschen mit TBS sowie eine weitere Stunde Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten peroxidase markierten Sekundärantikörper (anti-Maus-POX, Verdünnung 1:3000 in TBS).

V.II.5. Darstellung durch Chemolumineszenz

Ausgewertet wurde der Immunoblot mittels der „enhanced chemoluminescence method“ (Pharmacias ECL, General Electric, Connecticut, USA). Hierbei wurden die Reagenzien für eine enzymkatalysierte Lichtreaktion auf die PVDF-Membran aufgetragen, wobei nach einer kurzen Inkubationszeit von einer Minute ein Bio-Max-Film aufgelegt wurde, welcher in der Dunkelkammer belichtet wurde. Abschließend

wurde dieser 3 min in der Entwicklerlösung entwickelt, danach gewässert, ca. 3 min in der Fixierlösung fixiert, nochmals gewässert und dann getrocknet.

V.III. P-7 ELISA zum Nachweis P-7 spezifischer Paraproteine

V.III.1. Prinzip

Zum Nachweis der Paratarg-7-Spezifität diente ein ELISA. Hierzu wird eine mit den Primärantikörpern beschichtete Mikrotiterplatte benötigt, an die ein in den zu untersuchenden Proben möglicherweise enthaltenes Antigen binden kann. Nach dem Auftragen der Proben auf die Mikrotiterplatte ist mindestens ein Waschschrift essentiell, um falsch positive Reaktionen zu hemmen. In einem weiteren Schritt werden Antikörper hinzugegeben, welche spezifisch an die bereits gebundenen Antigene binden. Somit entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, daher auch der Name ‚Sandwich-ELISA‘. Der zweite Antikörper ist in der Regel enzymgekoppelt und zeigt bei Reaktion einen Farbumschlag, welcher anschließend photometrisch erfasst werden kann.

Für diese Studie wurde zu Beginn in HEK293 Zellen rekombinantes Volllängen P-7 hergestellt, welches an seinem C-terminalen Ende einen FLAG Tag besitzt. Ein FLAG tag (Kennzeichnungsfahne) beschreibt eine Aminosäuresequenz aus Asp-Tyr-Lys-Asp₄-Lys, welche an rekombinante Proteine angehängt werden kann und ein starkes Reaktionspotential mit anti-FLAG-Antikörpern besitzt. Über das FLAG tag kann das P7-Protein an eine mit anti-FLAG mAb gecoatete Maxisorb Mikrotiterplatte (Sigma, München) binden. Daran können nun P7-Antikörper aus dem Serum binden, welche dann mittels dem Sekundärantikörper anti-human Antikörper nachgewiesen werden.

V.III.2. Vorbereitung der Proben für den ELISA

Das Vollblut der Probanden wurde bei 3000 rpm 10 min lang zentrifugiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

V.III.3. Herstellung des SLP2-Flag bzw. G11/anti pPSLP2-Fab-Konstrukt

Die Zelllinie HEK-293-psfi-SLP-2-VL-Flag war bereits im Labor vorhanden. RPMI 1640, 10% FCS, 4mM Glutamin und Selektionsantibiotikum G418 500 µg/ml wurde über 3-7 Tage kultiviert, bis humanes FLAG-getagtes SLP-2 produziert wurde. Konfluente Zellen wurden geerntet und im Anschluss 3x mit PBS gewaschen. Nach jedem Waschvorgang

wurden die Zellen mit 1200 rpm 10 min lang abzentrifugiert und anschließend in der Zählkammer gezählt. 1×10^7 Zellen wurden in 100 μ l Lysispuffer gelöst, für 30 min auf Eis gestellt und 30 min bei 1300 rpm bei 4°C zentrifugiert. Zuletzt erfolgte eine Proteinbestimmung und Einstellung des Lysats auf 1 mg/ml, was dann unserer Stocklösung entsprach.

V.III.4. ELISA zum Nachweis von P-7-Antikörpern

Der Vorgang startete mit dem Coaten, was dem Aufbringen eines Antikörpers auf die Mikrotiterplatte entspricht; hierbei wurde ein Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma, München) auf die Platten aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde auf die Mikrotiterplatte 1,5%ige Gelatine (VWR, International) aufgetragen, um so ein Blocken der freien Proteinbindungsstellen zu erreichen, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Nach Inkubation der Platte über eine weitere Stunde bei Raumtemperatur wurden 10 μ g/ml des rekombinanten SLP2-FLAG (im Labor bereits vorhandenes HEK-P-7 Zelllysats) aufgetragen. Nach weiterer Inkubation des Zelllysats für 1 h wurden die nicht gebundenen Reagenzien ebenfalls mit TBS 0,1% TX100 wieder abgewaschen. Als nächstes wurden die Probandenseren mit einer Verdünnung von 1:10⁸ aufgetragen und nach 1 h Inkubation mit TBS-TX 100 gewaschen. Nachdem eventuell vorhandene p-7 Antikörper gebunden haben, wurde im nächsten Schritt ein Detektionsantikörper (Biotin-Ziege-anti-human IgG-Fab mit einer Verdünnung von 1:2500) hinzugegeben, welcher präferenziell mit dem humanen IgG reagiert, zusätzlich jedoch auch Kreuzreaktionen mit IgM und IgA zeigt. Danach wurde wieder 1 h inkubiert und im Anschluss gewaschen. Zuletzt wurden dann Streptavidin Peroxidase (Roche, Germany) mit einer Verdünnung von 1:50000 für 10 min und OPD Entwickler für 5-10 min aufgetragen. Letzterer wurde am Ende mit 3 molarer HCL (VWR, International) gestoppt.

Der optische Nachweis erfolgte im Elisareader ‚Wallac Victor‘ bei 490nm.

V.III.5. ELISA zum Nachweis von pP-7

Wie zuvor schon beschrieben, wurde bei dem ELISA zum Nachweis von pP-7 die Mikrotiterplatte mit Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma, München), welcher gegen Stomatin-like protein 2 gerichtet ist, gecoatet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun wurde jedoch statt des zuvor verwendeten Maus-anti-STOML2, ein Huhn-anti-STOML2

Antikörper genutzt. Anschließend erfolgte wie zuvor ein Blocken der freien Proteinbindungsstellen mit 1,5%iger Gelatine zur Fehlervermeidung, dann wurden die Blutlysate mit einer Verdünnung von 1:2 aufgetragen, wieder 1 h inkubiert und gewaschen. Nachfolgend wurde ein synthetisches Fab-Konstrukt (G11 / anti-pPSLP2, im Labor bereits vorhanden) aufgetragen. G11/ anti-pPSLP2 erkennt spezifisch phosphoryliertes P-7, nicht jedoch den wt-P7 (unphosphoryliert) [44]. Im Anschluss wird wieder 1 h inkubiert und dann gewaschen. Wie zuvor wurde nun der Biotin-Ziege-anti-human IgG-Fab, diesmal jedoch mit einer Verdünnung von 1:2500 aufgetragen, 1 h inkubiert und gewaschen. Am Ende folgten nun der Reihe nach Streptavidin-Peroxidase für 10 min und OPD-Entwickler für 5-10 min, welcher mit 3 molarer HCL gestoppt wurde.

Die optische Quantifizierung erfolgte mit dem Elisareader ‚Wallac Victor‘ bei 490nm. Als positiv wurden Signale definiert, deren Wert 3x größer war als der der negativen Seren.

VI. Statistische Methoden

Die Odds Ratio mit dem 95% Konfidenzintervall und den p-Werten wurden angegeben, um das Risiko, an einem MGUS oder MM zu erkranken, für alle drei ethnischen Gruppen separat im Vergleich zu den gesunden Kontrollen darzustellen. Um die ethnischen Gruppen weiter zu vergleichen, wurde der Breslow-Day-Test durchgeführt. Chi-Quadrat und, falls dies nötig war, auch der Fisher-Test wurden verwendet, um Unterschiede zwischen den ethnischen Gruppen bezüglich der Prävalenz von pP-7 für MM/MGUS- Patienten und gesunde Kontrollen darzustellen. Im Falle signifikanter globaler Tests über alle drei Volksgruppen wurden paarweise Tests durchgeführt. Für Unterschiede in Bezug auf Patientencharakteristika sowie zur Bestimmung der Prävalenz von pP-7 Trägern unter gesunden Kontrollen und MGUS/MM-Patienten aller drei ethnischen Gruppen wurde Chi-Quadrat berechnet und gegebenenfalls der Fisher –Test eingesetzt. Für qualitative Daten hingegen wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p=0,05$ festgelegt.

VII. Ergebnisse

VII.I. Untersuchung der MGUS/MM Patienten Proben

Es wurden 252 europäische, 176 japanische und 81 afroamerikanische MGUS und MM Patienten untersucht. Teilweise lagen die Ergebnisse der europäischen und japanischen Proben bereits vor, die Anzahl der Probanden wurde für diese Studie weiter aufgestockt.

Tabelle 1: Nachweis von P-7 spezifischen Paraproteinen unter afroamerikanischen, europäischen und japanischen MGUS/MM Patienten

	MGUS	MM	Total
Afroamerikaner			
IgA	2/6 (33,3%)	2/4 (50,0%)	4/10 (40,0%)
IgD	0/0	0/1	0/1
IgG*	8/22 (36,4%)	18/24 (42,9%)	26/64 (40,6%)
leichte Ketten	0/0	0/6	0/6
Total	10/28 (35,7%)	20/53 (37,7%)	30/81 (37,0%)
Europäer			
IgA	1/7 (14,3%)	4/24 (16,7%)	5/31 (16,1%)
IgD	0/0	0/0	0/0
IgG**	5/45 (11,1%)	32/176 (18,2%)	37/221 (16,7%)
Total	6/52 (11,5%)	36/200 (18,0%)	42/252 (16,7%)
Japaner			
IgA	0/4	1/32 (3,1%)	1/36 (2,8%)
IgD	0/0	0/11	0/11
IgG**	0/13	6/116 (5,2%)	6/129 (4,7%)
Total	0/17	7/159 (4,4%)	7/176 (4,0%)

* alle pP-7 spezifischen IgG Paraproteine gehören zur Subklasse IgG₃ bis auf eine Ausnahme welche zur IgG₁ Subklasse gehört

** alle pP-7 spezifischen IgG Paraproteine gehören zur Subklasse 3

Von den 81 afroamerikanischen MGUS/MM Patienten wiesen 30 von 81 ein Paratarg-7 spezifisches Paraprotein auf (siehe Tabelle 1). Nachfolgende Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen auf der Y-Achse die jeweiligen Absorptionswerte der photometrischen Messung sowie die Bezeichnungen der Patientenseren und die Kontrollen auf der X-Achse.

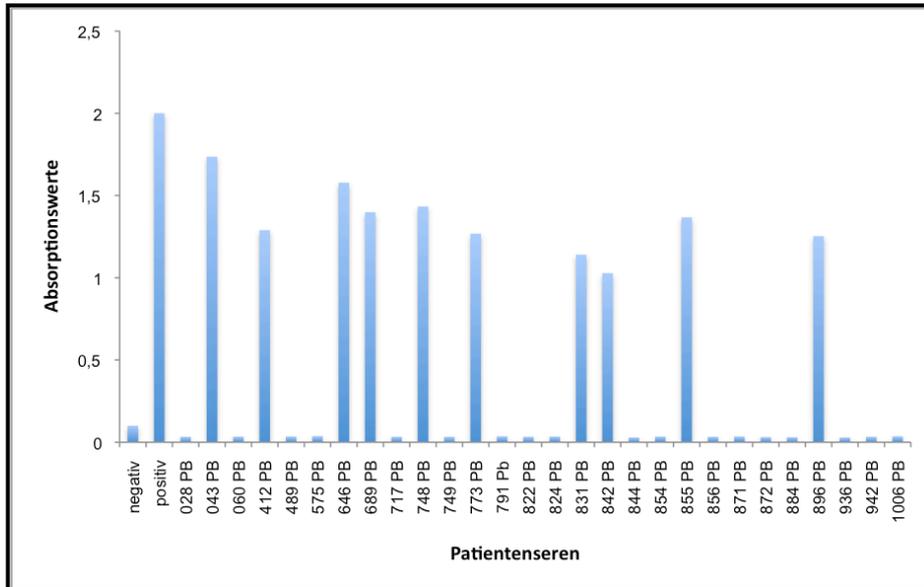


Abbildung 8: ELISA mit 28 Proben der afroamerikanischen MGUS Patienten. 10 der 28 Proben reagierten spezifisch mit Paratarg-7. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Absorptionsmesswerte angegeben, auf der X-Achse hingegen die Bezeichnungen der einzelnen Patientenseren.

Hierbei zeigten sich, wie in Abbildung 8 bereits ersichtlich, 10 von 28 (35,7%) MGUS Proben als spezifisch für P-7. Des Weiteren haben wir uns die Proben von 53 afroamerikanischen multiplen Myelom Patienten angesehen.

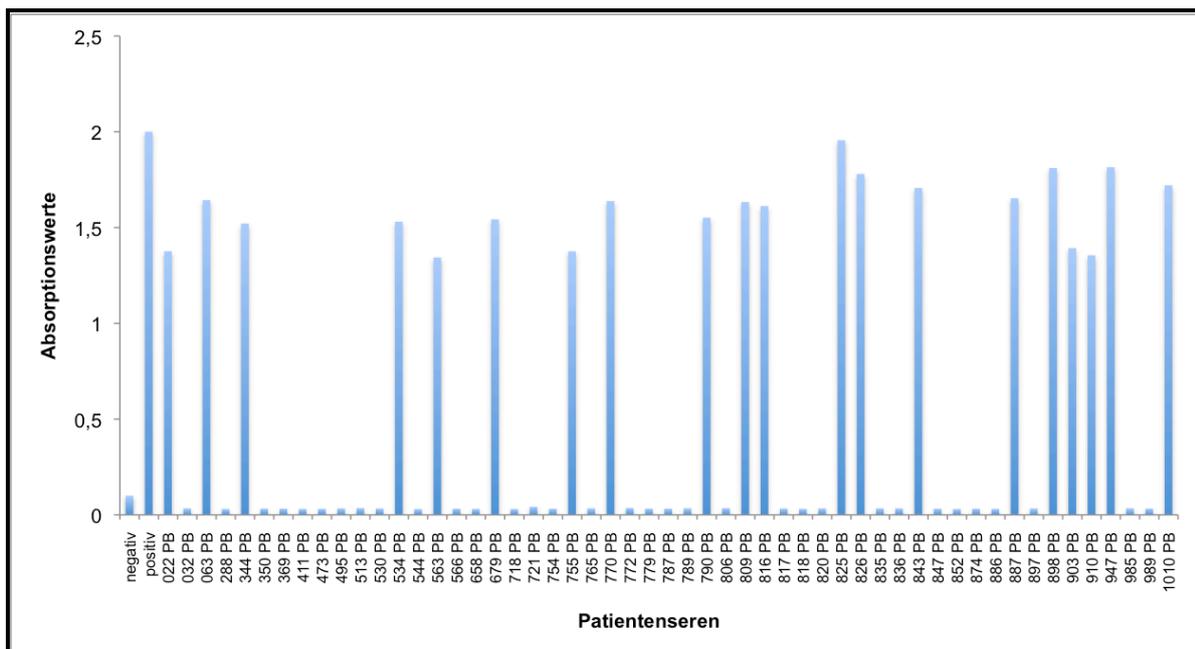


Abbildung 9: ELISA mit 53 Proben von afroamerikanischen MM Patienten. 20 der getesteten Proben reagierten spezifisch mit Paratarg-7. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Absorptionsmesswerte angegeben, auf der X-Achse hingegen die Bezeichnungen der einzelnen Patientenseren.

Insgesamt wurde bei 20 von den 53 (37,7%) getesteten Proben von Myelom-Patienten ein Paraprotein nachgewiesen, welches spezifisch mit Paratarg-7 reagierte. Zusammenfassend wiesen also 30 der insgesamt 81 Proben von schwarz-afrikanischen MGUS/MM Patienten ein Paratarg-7-spezifisches Paraprotein auf. Wir führten sodann eine isoelektrische Fokussierung durch, um den Phosphorylierungsgrad des Paratarg-7 in den Proben der Patienten mit einem Paratarg-7 spezifischen Paraproteinen zu ermitteln. Hierbei zeigte sich bei allen MGUS/MM Patienten mit einem Paratarg-7 spezifischen Paraprotein ein Paratarg-7, welches in hyperphosphorylierter Form vorlag. Bisher gehörten alle Paratarg-7 spezifischen Paraproteine der pP-7 positiven Patienten der IgG₃ Subklasse an. Unter den Proben der afroamerikanischen Patienten befand sich eine positive Probe mit einem Paraprotein der IgG₁-Subklasse. Merkmale wie Alter, Krankheitsstadium, lytische Läsionen, Hämoglobin, Kreatinin, Calcium, β 2 Mikroglobulin und zytogenetische Variationen zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Patienten mit einem P-7 spezifischen Paraprotein und einem anderer Spezifität (Siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Merkmale von afroamerikanischen MGUS und MM Patienten, welche pP-7 positiv und pP-7 negativ getestet wurden.

	pP7+	pP7	p-Wert
	n= 30	n=51	
Alter (Jahre)			
Median	64	64	0,325
Range	43-89	32-84	
Diagnose			
MGUS	10 33,3%	17 33,3%	1,000
MM	19 63,3%	32 62,7%	0,958
Stadium I	3 15,8%	3 9,7%	0,778
Stadium II	7 36,8%	11 35,5%	
Stadium III	9 47,4%	17 54,8%	
unbekannt		1 3,1%	
Plasmozytom	1 3,3%	2 3,9%	1,000
Paraprotein			
IgG	26 86,7%	38 74,5%	0,194
IgG ₁	1 3,3%	23 45,1%	<0,001
IgG ₂	0 0,0%	0 0,0%	-
IgG ₃	25 83,3%	15 29,4%	<0,001
IgG ₄	0 0,0%	0 0,0%	-
IgA	4 13,3%	6 11,8%	1,000
IgD	0 0,0%	1 2,0%	1,000
Leichtketten	0 0,0%	6 11,8%	0,080
Osteolysen			
Ja	14 48,3%	27 52,9%	0,688
Nein	5 51,7%	24 47,1%	
unbekannt	1 3,3%		
Hämoglobin (g/dl)			
Median	11,1	11,3	0,491
Range	7,2-14,9	6,7-15,8	
Kreatinin (mg/dl)			
Median	1,1	1,4	0,082
Range	0,7-5,0	0,6-20,0	
Calcium (mg/dl)			
Median	10,0	9,4	0,221
Range	2,9-13,0	7,0-14,0	
β2 Mikroglobulin (mg/dl)			
Median	3,0	3,6	0,637
Range	2,0-31,6	1,5-19,9	
Zytogenetik			
normal	10 33,3%	25 49,0%	0,169
Trisomie 3	1 3,3%	0 0,0%	0,370
Trisomie 8	0 0,0%	1 2,0%	1,000
komplex	12 40,0%	12 23,5%	0,117
Unbekannt	7 23,3%	13 25,5%	

Auffällig war jedoch, dass bei den pP-7 positiv getesteten Patienten keine über der Norm liegende Frequenz an Autoimmunerkrankungen gefunden werden konnte. Wir gehen davon aus, dass die Autoimmunität von pP-7 Trägern spezifisch für P-7 ist. Siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei europäischen Trägern von pP-7.

Rheumatoide Arthritis	1 / 100
Systemischer Lupus Erythematoses	0 / 30
Polymyalgia Rheumatica	0 / 15
Granulomatose mit Angiitis	0 / 10
Multiple Sklerose	0 / 10
Morbus Crohn	0 / 10
Churg Strauss Vaskulitis	0 / 5
SAPHO Syndrom	0 / 5
Sjögren's Syndrom	0 / 5
Total	1 / 190 (0,5%)
Europäische gesunde Kontrollen	8 / 550 (1,5%)

Im Globalen Test zeigten sich signifikante Unterschiede der Prävalenz zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen. Der Unterschied zwischen Afroamerikanern (37,0%) und Europäern (16,7%) betrug $p < 0,001$, zwischen Afroamerikanern und Japanern (4,0%) $p < 0,001$ sowie zwischen Europäern und Japanern ebenfalls $p < 0,001$ (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Prävalenz von P-7 spezifischen Paraproteinen in den einzelnen ethnischen Gruppen

	MGUS	MM	Total
Afro-Amerikaner			
Total	10/28 (35,7%)	20/53 (37,7%)	30/81 (37,0%)
Europäer			
Total	6/52 (11,5%)	36/200 (18,0%)	42/252 (16,7%)
Japaner			
Total	0/17	7/159 (4,4%)	7/176 (4,0%)

VII.II. Odds Ratio

Hierbei handelt es sich um ein Quotenverhältnis, welches eine Aussage über die Stärke des Zusammenhangs zweier Merkmale erlaubt. In der Medizin beschreibt sie die Stärke mit der ein vermuteter Risikofaktor mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert ist.

Verglichen werden typischerweise Probanden mit dem vermuteten Risikofaktor und Probanden ohne diesen Faktor, des Weiteren unterscheidet man, ob bereits eine Erkrankung eingetreten ist oder bisher noch nicht (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Kreuztabelle des Vergleichs von Probanden mit bzw. ohne einen bestimmten Risikofaktor.

	Krank	Gesund
MIT Risikofaktor	a	b
OHNE Risikofaktor	c	d

Man unterscheidet ‚a‘ Probanden mit einem bestimmten Risikofaktor, welche bereits erkrankt sind. ‚c‘ erkrankte Probanden, welche den Risikofaktor nicht aufweisen. ‚b‘ gesunde Probanden mit und ‚d‘ gesunde Probanden ohne den Risikofaktor.

Für die Odds-Ratio ergibt sich dann folgende Formel:

$$\text{Odds-Ratio} = (a / c) / (b / d) = (a \cdot d) / (b \cdot c)$$

Das Quotenverhältnis nimmt Werte zwischen 0 und ∞ an. Ein Wert von 1 spricht für ein gleich hohes Risiko mit bzw. ohne den bestimmten Risikofaktor zu erkranken. Ein Wert von > 1 spricht für ein dem Wert entsprechend höheres Risiko an einer bestimmten Krankheit zu erkranken.

Für die vorliegende Studie wurden die verschiedenen Odds Ratios von Frau Dr. Marita Ziepert (Universität Leipzig ‚Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie‘, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig, -NHL Studiensekretariat-) berechnet.

VII.III. Ergebnis der Untersuchung der gesunden Kontrollen

Bei den Proben der MGUS/MM Patienten lag in allen Fällen, in denen ein P-7 spezifisches Paraprotein nachgewiesen wurde, dieses auch in der hyperphosphorylierten Form vor. Da im Durchschnitt nur 4% der gesunden Spender Träger der hyperphosphorylierten Variante des Paratarg-7 sind, ist der Trägerstatus mit einem fast 5-fach erhöhten Risiko, an einem MGUS/MM zu erkranken, verbunden. Wir verglichen die zum Teil bereits vorliegenden 550 europäischen, die 278 japanischen sowie die jetzt neu hinzugekommenen 100 afroamerikanischen Kontrollen miteinander. Von den 550 europäischen gesunden Kontrollen waren 8 Träger des hyperphosphorylierten Paratarg-7, von den 278 Japanischen Kontrollen nur einer der

Probanden und bei den afroamerikanischen Kontrollen zeigte sich in 11 von 100 untersuchten gesunden Kontrollen ein hyperphosphoryliertes Paratarg-7. Siehe Abbildung 10.

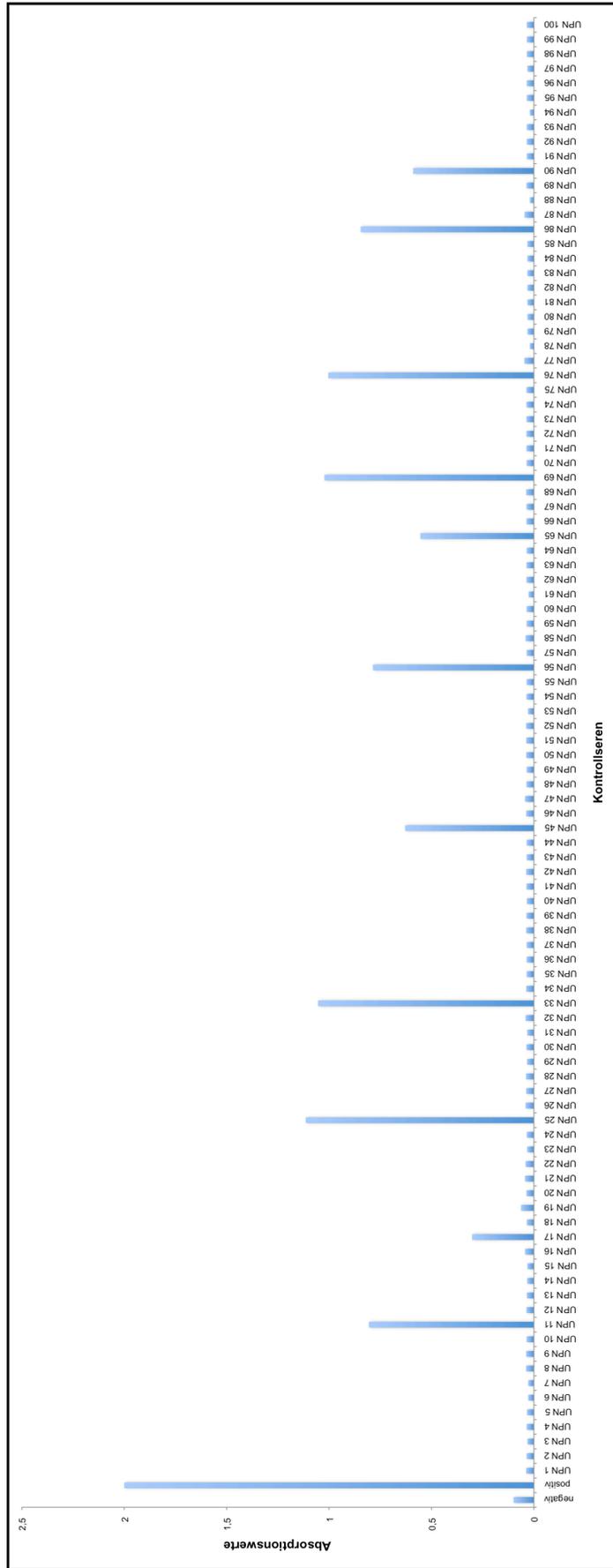


Abbildung 10: ELISA mit 100 afroamerikanischen gesunden Kontrollen. Es zeigte sich bei 11 Proben ein hyperphosphoryliertes P-7. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Absorptionsmesswerte angegeben, auf der X-Achse hingegen die Bezeichnungen der einzelnen Patientenseren.

Die

Prävalenz der gesunden Träger von pP-7 war in den verschiedenen ethnischen Gruppen signifikant unterschiedlich, der Vergleich der afroamerikanischen Kontrollen mit den europäischen und japanischen zeigte signifikante Unterschiede. Die Prävalenz der gesunden pP-7 Träger betrug unter den Afroamerikanern 11/100 (11%), bei den Europäern 8/550 (1,5%) und bei den Japanern nur 1/128 (0,4%). Des Weiteren lag die Prävalenz gesunder pP-7 Träger unter den Afroamerikanern signifikant höher als in der europäischen und japanischen Bevölkerung ($p < 0,001$ und $p < 0,001$).

Schließlich stellte sich in allen drei ethnischen Gruppen eine deutlich niedrigere Prävalenz von pP-7 Trägern bei den gesunden Kontrollen als bei den MGUS und MM Patienten heraus (Afroamerikaner: 11% vs. 37%, $p < 0,001$; Europäer: 1,5% vs. 16,7%, $p < 0,001$; Japaner: 0,4% vs. 4,0%, $p < 0,001$). Daraus resultiert für gesunde pP-7 Träger ein erhöhtes Risiko, an MGUS oder MM zu erkranken (Odds Ratio: Afroamerikaner: 4,8 [95%-KI: 2,2 – 10,3], $p < 0,001$; Europäer: 13,6 [95%-KI: 6,3 – 29,3], $p < 0,001$; Japaner: 11,5 [95%-KI: 1,4 – 94,1], $p = 0,023$). pP-7 ist somit der bisher stärkste molekular definierte Risikofaktor für MGUS und MM in allen drei ethnischen Gruppen. Der p-Wert für die Unterschiede in den Odds Ratios für MGUS/MM bei den gesunden pP-7 Trägern war 0,058 zwischen Afroamerikanern und Europäern, 0,430 zwischen Afroamerikaner und Japanern und 0,884 zwischen Europäern und Japanern.

VIII. Diskussion

Verschiedene Studien haben sich bereits mit der Beziehung zwischen der Entstehung von MGUS/MM und chronischer Antigenstimulation beschäftigt. Zusammenfassend scheint die chronische Antigenstimulation zwar eine Rolle zu spielen, jedoch konnten keine eindeutigen Beweise dafür erbracht werden [5][45]. Zweifelhaft war auch der Nachweis Paraprotein-vermittelter Reaktionen von Antigenen mittels Epitop-Rekonstruktionen, da diese nur mit einem Titer von 1:2500 nachgewiesen werden konnten [46]. Dies gilt auch für Studien, die CMV oder HIV als antigene Zielstruktur von Paraproteinen proklamierten [35][46].

Wir haben in der vorliegenden Studie mit einer sehr hohen ($1:10^8$ -fachen) Verdünnung der Seren gearbeitet, und dennoch fanden wir heraus, dass 37% der afroamerikanischen paraproteinhaltigen Seren spezifisch mit Paratarg-7 reagierten. Das Auftreten von Paratarg-7-spezifischen Paraproteinen bei mehr als einem Drittel der afroamerikanischen MGUS/MM Patienten deutet darauf hin, dass Paratarg-7 eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen in allen drei ethnischen Gruppen einnimmt. Träger des pP-7 haben ein höheres Risiko, an MGUS/MM oder Waldenström Macroglobulinämie zu erkranken, nicht jedoch für andere Malignome, was für die Relevanz von pP-7 zur chronischen Antigenstimulation spricht [47]. Somit erscheint ein höheres Entartungspotential von pP-7 tragenden Zellen eher unwahrscheinlich.

Ebenso ist die Autoimmunität von pP-7 Trägern offenbar spezifisch für P-7, da keine über der Norm liegende Frequenz an Autoimmunerkrankungen bei pP7 Trägern nachweisbar war (siehe Tabelle 3, S. 30).

Leider ist das Alter der gesunden Kontrollen unbekannt, es wird vermutet, dass sie tendenziell jünger waren als die MGUS- und MM- Patienten. Dies lässt die Prävalenzdaten jedoch unbeeinflusst, da der pP-7 Trägerstatus von der Geburt bis hin zum Tod nachweisbar bleibt. Der pP7-Trägerstatus ist im Genom kodiert und in Folge dessen als konstant zu betrachten. Es wäre denkbar, dass einige der gesunden Spender im weiteren Verlauf ein MGUS/MM entwickeln. Dies würde allerdings die Odds Ratio noch weiter erhöhen.

Wir haben alle Proben der gesunden Kontrollen wie auch die Patientenseren zuvor auf Anti-P-7 Antikörper untersucht. Wir erwarten, dass es im Vorfeld zu einer gesteigerten polyklonalen Anti-P-7 Reaktivität kommt, aus der sich ein immortalisierter Klon

entwickelt. Theoretisch wäre es also denkbar, eine gesteigerte Anti-P-7 Reaktivität vor dem Auftreten eines MM nachzuweisen. Bisher konnten wir jedoch noch keine solche Reaktivität in Seren von gesunden pP-7 Trägern finden. Dies wird auch in Zukunft noch eine spannende Frage bleiben.

Belegt sind zwar Unterschiede in der Prävalenz von MM/MGUS in verschiedenen ethnischen Gruppen (3,2% der Kaukasier, 5,84% der Afroamerikaner und 2,4% der Asiaten und Mexikaner). In der Inzidenz wurde lediglich zwischen Afroamerikanern und Europäern ein Unterschied gezeigt ($p=0,058$). Im Vergleich von Europäern mit Japanern konnten wir keine Differenz feststellen. Am ehesten lag dies an der begrenzten Anzahl der Patienten.

Ursachen für die Risikovarianz verschiedener ethnischer Gruppen ein MGUS/MM zu entwickeln, sind bisher nicht ausreichend erforscht. Diskutiert werden vor allem Umwelt- und genetische-Faktoren. In diesem Zusammenhang scheint es aussichtsreich und interessant, Studien mit afrikanischen Probanden direkt aus Afrika durchzuführen, da hier genetische Variationen im Vergleich mit Afroamerikanern erwartet werden oder Studien mit japanischen Probanden aus Hawaii durchzuführen, da diese anderen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind als die direkt in Japan lebende Bevölkerung. Doch leider konnte trotz intensiver Bemühungen bisher kein Zugang zu diesen Populationen gefunden werden.

Aufgrund der autosomal dominanten Vererbung von pP-7, welche bereits nachgewiesen war [47], schien es uns möglich, gesunde Träger von pP-7 zu identifizieren und im folgenden deren Neoplasieentwicklung zu beobachten, da mit fortschreitendem Alter das Risiko, ein MM/MGUS zu entwickeln, steigt. Durch die Testverfahren ELISA und IEF wäre es zweifelsfrei möglich, Probanden auf den Trägerstatus des pP-7 zu untersuchen. Dadurch könnte ein eventuell vorhandenes erhöhtes Risiko ein MGUS/MM zu entwickeln, eindeutig nachgewiesen werden.

Aufgrund der deutlichen Varianz in der Anzahl der pP-7 Träger in den verschiedenen ethnischen Gruppen ergibt sich für gesunde pP-7 Träger ein unterschiedliches Risiko, an einer MGUS, einem MM bzw. einem MW zu erkranken. Wenn auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass hierfür Umwelteinflüsse mitverantwortlich sind, wurde gezeigt, dass eine unterschiedliche Frequenz ‚permissiver‘ HLA-DR-Allele in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen für das unterschiedlich hohe Risiko verantwortlich ist. Beim Vorliegen eines permissiven HLA-DR Haplotyps ist das

Immunsystem in der Lage, pP-7 zu präsentieren und zu erkennen, sodass pP-7 spezifische CD4 T-Helferzellen eine spezifische Immunantwort vermitteln können, das heißt, P-7 spezifische B-Zellen zu stimulieren und ihre Proliferation zu induzieren, was schließlich zur Bildung eines bösartigen B-Zell-Klons als Ursprung von MGUS/ MM mit einem P-7 spezifischen Paraprotein führt [48]. Daher wäre es nun erstmals möglich, bestimmte prophylaktische Strategien für gesunde Träger von pP-7 mit einem permissiven Haplotyp zu entwickeln. Beispielsweise könnte man eine Therapie entwickeln, bei welcher es nach der Konjugation mit einem Toxin zur Bindung von antigenem P-7 an den Antigenrezeptor der B-Lymphozyten mit Spezifität für P-7 kommt was schließlich zur Internalisierung des Komplexes und Tötung dieser Zelle führt. Es wäre weiterhin denkbar, das Epitop, der Teil des P-7-Moleküls welcher, an den Rezeptor von den spezifischen T-Helfer-Zellen bindet und aktiviert, so zu verändern, dass er zwar immer noch eine Bindung mit den T-Zellen eingeht, sie hierbei jedoch inaktiviert. Die dritte denkbare Variante wären rekombinante Antikörper oder relevante Teile davon (rekombinanten Fab Fragmente), die spezifisch an den HLA-DR / Phosphopeptid-Komplex auf der pP-7 spezifischen T-Helfer-Lymphozyten binden und somit spezifisch nur die T-Helferzellen hemmen, welche spezifisch für pP-7 sind.

Mitverantwortlich für die Risikovarianz in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen ist weiterhin eine unterschiedliche Frequenz bestimmter MHC-II-Haplotypen. Dies erklärt, warum ‚permissive‘ HLA-DR-Allele bei einem pP-7 positiven MGUS/MM Patienten aus einer ethnischen Gruppe mit einem hohen Risiko (Europäer) wesentlich häufiger sind, als aus einer ethnischen Gruppe mit einem geringeren Risiko (Afroamerikaner).

Zur Entstehung einer MGUS, eines MM bzw. eines MW müssen also folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1) Die wichtigste Voraussetzung ist das Vorliegen eines immunogenen Autoantigens. Im Falle von P-7 ist diese Autoimmunogenität auf die zusätzliche Phosphorylierung der Aminosäure Serin 17 des P-7 Moleküls zurückzuführen, die durch eine Inaktivierung der Phosphatase PP2A bedingt ist.

2) Zur Präsentation dieser Peptid-Epitope bedarf es eines ‚permissiven‘ MHC-II-Haplotyps, der diese modifizierten Epitope prozessieren und präsentieren kann. Wenn beide Voraussetzungen erfüllt sind, kann es zur Stimulation pP-7-spezifischer T-Helferzellen kommen, die dann ihrerseits Paratarg-spezifische B-Zellen bzw. Plasmazellen oder deren Vorläufer stimulieren. Die chronische Antigenstimulation

induziert dann eine verstärkte Proliferation der Paratarg-spezifischen Zellen der B-Zellreihe, die damit einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, maligne zu entarten. Siehe Abbildung 11.

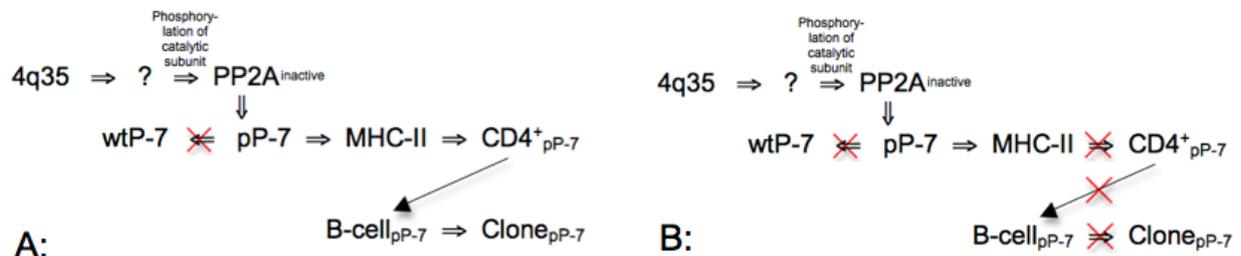


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Hypothesen zur Entstehung eines MGUS/ MM.
 A: Patientenfall: Bei Vorliegen eines MHC-II Haplotypes, welcher in der Lage ist das pP-7 Epitop zu präsentieren, führt dies zur Proliferation pP-7 spezifischer B-Zellen. Damit steigt das Risiko der malignen Entartung. B: Gesunde Merkmalsträger: Hier liegt ein MHC-II Haplotyp vor, welcher nicht in der Lage ist das P-7 Phosphoepitop zu präsentieren. Demzufolge entstehen keine pP-7 spezifischen B-Zellen und keine maligne Entartung derselben.

Langfristig ist es unser Ziel pP-7 positive gesunde Menschen durch ein Screening rechtzeitig zu erkennen und durch die Entwicklung einer antigenspezifischen Therapie die Progression zu einem MGUS/ MM vor dem Auftreten von Langzeitschäden zu verhindern.

IX. Literaturverzeichnis

1. Rajkumar, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., al, e.: International Myeloma Working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15, 538-548 (2014)
2. Kyle, R., Therneau, T., Rajkumar, S., al., e.: Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*(102(10)), 3759-64 (2003)
3. Robert A. Kyle, M., Francis Buadi, M., Steven Rajkumar, M.: Management of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Smoldering Multiple Myeloma (SMM). *Oncology (Williston Park)*(257), 578-586 (2011)
4. Kyle, R., Rajkumar, S.: Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematology*(134), 573-589 (2006)
5. Landgren, O., Gridley, G., Turesson, I., al., e.: 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)), 904-906 (2006)
6. LL, A., DL, B.: Familial multiple Myeloma. II. Final pathological findings in two brothers and a sister. *J Natl Med Assoc* 59, 278-281 (1967)
7. Grosbois, B., Gueguen, M., Fauchet, R., Lebouc, H., Guenot, A., Lancelin, F., Lauvin, R., Leblay, R., Genetet, B.: Multiple myeloma in two brothers. An immunochemical and immunogenetic familial study. *Cancer* 58 (1986)
8. Landgren, O., Weiss, B.: Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia* 23, 1691-1697 (2009)
9. Kyle, R., Thernau, T., Rajkumar, S.: Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 354, 1362-1369 (2006)
10. Kyle, R., Kumar, S.: The significance of monoclonal gammopathy of undetermined signiicance. *Haematologica*(94(12)), 1641-1644 (2009)
11. Korde, N., Kristinsson, S., Landgren, O.: Monoclonal gammopathy od undetermined significance (MGUS) an smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early traetment strategies. *Blood*(117(21)), 5573-5581 (2011)

12. Landgren, O., Kyle, R., Hoppin, J.: Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 113, 5412-5417 (2009)
13. Moore, P., Boshoff, C., Weiß, R., Chang, Y.: Molecular mimicry of human cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*(274), 1739-1744 (1996)
14. Burger, R., Neipel, F., Fleckenstein, B., Savino, R., Ciliberto, G., Kalden, J., Gramatzki, M.: Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood*(91), 1858-1863 (1998)
15. Chng, W., Glebov, O., Bergsagel, P., Kuehl, W.: Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 20, 571-596 (2007)
16. Potter, M., Boyce, C.: Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*(193), 1086-1087 (1962)
17. Pilgrim, H.: The relationship of chronic ulceration of the ileocecal junction to the development of reticuloendothelial tumors in C3H mice. *Cancer Res*(25), 53-65 (1965)
18. Rask-Nielsen, R., McIntire, K., Ebbesen, P.: Plasma cell leukemia in BALB/c mice inoculated with subcellular material. II serological changes. *J Natl Cancer Inst*(41), 495-504 (1968)
19. Mc Intire, K., Princler, G.: Prolonged adjuvant stimulation in germ-free BALB-c mice: development of plasma cell neoplasia. *Immunology*(17), 481-487 (1969)
20. Byrd, L., McDonald, A., Gold, L., Potter, M.: Specific pathogen-free BALB/cAn mice are refractory to plasmacytoma induction by pristane. *J Immunol*(147), 3632-3637 (1991)
21. Jack, H., Beck-Engeser, G., Lee, G., Wofsy, D., Wabl, M.: Tumorigenesis mediated by an antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*(89), 8482-8486 (1992)
22. Friedmann, D., Cho, E., Goldman, J., Carmack, C., Besa, E., Hardy, R., Silberstein, L.: The role of clonal selection in the pathogenesis of an autoreactive human B cell lymphoma. *J exp Med* (174), 525-537 (1991)
23. Metzger, H.: Myeloma proteins and antibodies. *Am J Med* (47), 837-844 (1969)
24. Imahori, S., Moore, G.: Multiple Myeloma and prolonged stimulation of reticuloendothelial system. *N Y State J Med* (72), 1625-1628 (1972)

25. Penny, R., Hughes, S.: Repeated stimulation of the reticuloendothelial system and the development of plasma-cell dyscrasias. *Lancet*(1), 77-78 (1970)
26. Rosenblatt, J., Hall, C.: Plasma-cell dyscrasia following prolonged stimulation of reticuloendothelial system. *Lancet*(1), 301-302 (1970)
27. Seligmann, M., Sassy, C., Chevalier, A.: A human IgG myeloma protein with anti-2-macroglobulin antibody activity. *J Immunol*(110), 85-90 (1973)
28. Ho, F., Lortan, J., MacLennan, I., Khan, M.: Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*(16), 1297-1301 (1986)
29. Bakkus, M., Heirman, C., Van, R., Van Camp, B., Thielemans, K.: Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intracлонаl variation. *Blood*(80), 2326-2335 (1992)
30. Corradini, P., Boccadoro, M., Voena, C., Pileri, A.: Evidence for bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to C mu sequence in immunoglobulin (IgG)- and IgA-secreting multiple myelomas. *J Exp Med*(178), 1091-1096 (1993)
31. Bakkus, M., Van, R., Van Camp, B., Thielemans, K.: Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol*(87), 68-74 (1994)
32. Seligmann, M., Brouet, J.: Antibody activity of human myeloma globulins. *Semin Hematol*(10), 163-177 (1973)
33. Colwell, N., Tollefsen, D., Blinder, M.: Identification of a monoclonal thrombin inhibitor associated with multiple myeloma and a severe bleeding disorder. *Br J Haematol*(97), 219-226 (1997)
34. Seligmann, M., Danon, F., Basch, A., Bernard, J.: IgG Myeloma cryoglobulin with antistreptolysin activity. *Nature*(220), 711-712 (1968)
35. Konrad, R., Kricka, L., Goodman, D., Goldman, J., Silberstein, L.: Brief report: myeloma-associated paraprotein directed against the HIV-1-seropositive patient. *N Engl J Med*(328), 1817-1819 (1993)
36. Preuss, K., Held, G., Kubuschok, B., Hung, C., Malatsidze, N., Wagner, M., Pfreundschuh, M.: 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 (2007)

37. Laptasina, L., Brand, J., Poole, K., Daumke, O.: Stomatin-domain proteins. *European Journal of Cell Biology* 91, 240-245 (2012)
38. Cao, W., Zhang, L., Liu, M.: 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 (2007)
39. Chang, D., Ma, K., Gong, M.: SLP-2 overexpression is associated with tumor distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 15, 104-110 (2010)
40. Zwick, C., Held, G., Auth, M., al., e.: Over one third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal-dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. *International Journal of Cancer*(135), 876-887 (2014)
41. Preuss, K., Pfreundschuh, M., Fadle, N.: Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 118, 3340-3346 (2011)
42. Grass, S., Preuss, K., Ahlgrim, M., Fadle, N., Regitz, E., Pöhler, C., Murawski, N., Pfreundschuh, M.: Association if 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 (2009)
43. Preuss, K.-D., Pfreundschuh, M., Ahlgrim, M., Fadle, N., Regitz, E., Murawski, N., Grass, S.: A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int.J.Cancer*(125), 656-661 (2009)
44. Preuss, K., Fadle, N., Regitz, E., Held, G., Pfreundschuh, M.: Inactivation of proteinphosphatase-2a causing hyperphosphorylation of autoantigenicparaprotein targets in MGUS/MM is due to an exchange of its regulatory subunits. *Int. J. Cancer* 135, 2046-2053 (2014)
45. Lewis, D., Pottern, L., Brown, L.: Multiple Myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation. *Cancer Causes Control* 5, 529-539 (1994)
46. Sompuram, S., Bastas, G., Vani, K., Bogen, S.: Accurate identification of

paraprotein antigen targets by epitope reconstruction. *Blood*(111), 302-208 (2008)

47. Grass, S., Preuss, K., Wikowicz, A.: 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 (2011)
48. Neumann, F., Pfreundschuh, M., Preuss, K.-D., Schormann, C., Zwick, C., Murawski, N., Kubuschok, B.: CD4+ T-Cells in chronic autoantigenic stimulation in MGUS, multiple Myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Int J Cancer*, in press. (2015)

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die weltweite Inzidenz des Multiplen Myeloms (altersadaptiert pro 100.000 Personen pro Jahr).....	7
Abbildung 2: Western- Blot- Analyse von Paratarg-7 von Patienten mit Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (P1-P3), einen Patienten mit nicht-Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (B1) und drei gesunden Kontrollpersonen (C1-C3).....	12
Abbildung 3: Phosphatase-Behandlung von P-7	13
Abbildung 4: Absorption vom Serum eines IgG MM Patienten mit P-7 Spezifität	14
Abbildung 5: Stammbaum einer Familie in der zwei Schwestern eine MGUS mit einem P-7 spezifischen Paraprotein aufweisen	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der isoelektrischen Fokussierung	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfermethode	21
Abbildung 8: ELISA mit 28 Proben der afroamerikanischen MGUS Patienten.....	27
Abbildung 9: ELISA mit 53 Proben von afroamerikanischen MM Patienten.....	27
Abbildung 10: ELISA mit 100 afroamerikanischen gesunden Kontrollen	33
Abbildung 11: Grafische Darstellung der Hypothesen zur Entstehung eines MGUS/ MM	38

XI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweis von P-7 spezifischen Paraproteinen unter afroamerikanischen, europäischen und japanischen MGUS/MM Patienten.....	26
Tabelle 2: Gegenüberstellung der Merkmale von afroamerikanischen MGUS und MM Patienten, welche pP-7 positiv und pP-7 negativ getestet wurden.....	29
Tabelle 3: Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei europäischen Trägern von pP-7.	30
Tabelle 4: Prävalenz von P-7 spezifischen Paraproteinen in den einzelnen ethnischen Gruppen.....	30
Tabelle 5: Kreuztabelle des Vergleichs von Probanden mit bzw. ohne einen bestimmten Risikofaktor.....	31

XIII. Abkürzungsverzeichnis

Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ca.	Circa
cDNA	Complementary DNA
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemoluminescence
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
Et. al.	et alli
Fab	Antigen bindendes Fragment eines Antikörpers
H-Kette	schwere Kette
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
L-Kette	Leichte Kette
M	Molar
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
Min.	Minute
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
MW	Makroglobulinämie Waldenström, Immunozytom
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

P-7	Nicht hyperphosphoryliertes Paratarg-7
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered Saline
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pP-7	Hyperphosphoryliertes Paratarg-7
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Revolutions per minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEREX	Serological identification of antigens by rekombinant cDNA expression cloning
SLP-2	stomatin-like-protein-2
SMM	Smoldering Multiple Myeloma
SNP	Singel nucleotide polymorphisms
sog.	sogenannte
Std.	Stunde
STOML2	stomatin-like-protein-2
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
Temp.	Temperatur
WtP-7	Wild-type-P7
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

XIV. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.