

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

**Hyperphosphoryliertes Paratarg-7 als
molekulare Zielstruktur von Paraproteinen bei
Patienten mit MGUS, Multiplen Myelom und
Makroglobulinämie Waldenström**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2013

vorgelegt von
Aleksandra Ciesiolka
aus Wroclaw (Polen)

Homburg, 2013

„Beeilen wir uns die Menschen zu lieben, sie gehen so schnell weg (...)“
„ Spieszmy sie kochac ludzi, tak szybko odchodza (...)“

Jan Twardowski

Für Peter.
Meiner Familie und meinen Freunden in Polen und in Deutschland.

Piotrowi.
Mojej rodzinie i przyjaciolom w Polsce i w Niemczech.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Monoklonale Gammopathien / Paraproteinämien	9
1.2. Multiples Myelom	9
1.3. MGUS (Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz)	10
1.4. Prävalenz der MGUS/MM in unterschiedlichen ethnischen Gruppen	10
1.5. IgM-MGUS	11
1.6. Prävalenz von unterschiedlichen MGUS Isotypen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen	11
1.7. Ätiopathogenese der MGUS und des Multiplen Myeloms	12
1.8. Genese der IgM-MGUS	14
1.9. Makroglobulinämie Waldenström / Lymphoplasmazytisches Lymphom / Immunozytom	14
1.10. Die Bedeutung der chronischen Antigenstimulation in der Pathogenese von MGUS, MM und MW	15
1.11. Stand der Forschung	15
1.12. Charakterisierung von Paratarg-7	16
1.13. Ziele der Arbeit	19
2. Patienten	21
2.1. Patienten und gesunde Spender	21
2.2. Rekrutierung der Patienten	21
3. Material	22
3.1. Reagenzien	22
3.2. Puffer und Medien	22
3.3. Kits	27
3.4. Antikörper	27
4. Methoden	28
4.1. Asservierung der Blutproben	28
4.2. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	28
4.3. Herstellung von rekombinanten SLP-2	29
4.4. Isoelektrische Fokussierung-IEF	30
4.5. Vorbereitung der Proben für die IEF	30

4.6.	Semi-Dry Transfer	30
4.7.	Western Blot	31
4.8.	Visualisierung durch die ECL - Enhanced Chemoluminescence.....	31
4.9.	Klonierung des B-Zell- Rezeptors (BCR)	32
4.10.	DNA-Präparation	33
4.11.	PCR-Polymerasenkettenreaktion	33
4.12.	Analytische PCR zur Bestimmung des leichten und schweren Kette des Immunglobulines.....	34
4.13.	Spezifische PCR zur Klonierung In den Expressionsvektor pCES.....	36
4.14.	Klonierung von PCR- Produkten	36
4.15.	Transformation kompetenter Bakterien und selektive Vermehrung der transformierten Bakterienklone	37
4.16.	Minipräparation von Plasmid-DNA mit der TENS-Methode	38
4.17.	Restriktionsenzymverdau von DNA-Konstrukten	38
4.18.	DNA-Gelelektrophorese.....	39
4.19.	Präparationsgele	39
4.20.	Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	40
4.21.	DNA-Sequenzierung	40
4.22.	Analyse der Immunglobulinensequenzen.....	40
4.23.	Ligation in den pCES-Vektor	40
4.24.	Ligation von DNA-Fragmenten	41
4.25.	Insertionskontrolle durch Probeverdau und Sequenzierung.....	42
4.26.	Expression und Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente.....	42
4.27.	Expression	42
4.28.	Lyse und Reinigung	43
4.29.	Reinigung löslicher Fab-Antikörper nach der IMAC Methode (Immobilised Metal Ion Affinity Chromatography).....	43
4.30.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
4.31.	Elektrophorese	45
4.32.	Coomassie-Gelfärbung.....	45
4.33.	Western Blot	45
4.34.	Kontroll-Färbung mit Ponceau-S Rot	46
4.35.	Trocknen der Membran	46
4.36.	Überprüfung der Spezifität des B-Zell-Rezeptors im ELISA	46

5. Ergebnisse	47
5.1. Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine bei japanischen Patienten mit IgA-, IgD- und IgG-MGUS/MM.....	47
5.2. Prävalenz von pP-7-Trägern bei japanischen Patienten und gesunden Kontrollen.....	48
5.3. Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine bei IgM-MGUS sowie bei Makroglobulinämie Waldenström	51
5.4. Ergebnisse der ELISA Untersuchungen von Serumproben von IgM-MGUS sowie Makroglobulinämie Waldenström Patienten auf Paratarg-7 spezifisches Paraprotein	51
5.5. Klonierung des B-Zell-Rezeptors	54
5.6. Analytische PCR auf VH bzw. VL	54
5.7. Sequenzanalyse der VH und der VK Ketten	57
5.8. Spezifische PCR zur Klonierung in den Expressionsvektor pCES	59
5.9. Klonierung der Produkte in den TOPO Vektor	60
5.10. Ligation in den Expressionsvektor pCES Vektor	61
5.11. Expression und Verifizierung der rekombinanten Fab-Fragmente.....	63
5.12. Serumantikörper und recombinante Fabs- Fragmente zeigen gleiche Spezifität	64
6. Diskussion.....	66
7. Abkürzungsverzeichnis.....	71
8. Reference List	74
9. Aus der Doktorarbeit hervorgehende Publikationen und Posters.....	79
10. Tabellenverzeichnis.....	80
11. Danksagung.....	81
12. Lebenslauf	82

Zusammenfassung

Paratarg-7 (P-7) ist ein körpereigenes Paraprotein-Ziel-Antigen, welches von 15% aller IgA- und IgG-paraproteinhaltiger Seren von Patienten mit einem Multiplen Myelom (MM) oder einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) spezifisch erkannt wird. Paratarg-7 ist bei allen Patienten, die ein Paratarg-7 spezifisches Paraprotein aufweisen, hyperphosphoryliert. Eine solche Modifikation findet sich nur bei 2% der gesunden Kontrollen. Polymorphismen und Mutationen von Paratarg-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 MGUS zu entwickeln.

Es ist bekannt, daß die Häufigkeit von MGUS/ MM in der japanischen Bevölkerung deutlich geringer ist als in der deutschen Bevölkerung. Deswegen untersuchten wir die Inzidenz von pP-7 Trägern in der japanischen Bevölkerung. Wir zeigten, daß die Prävalenz von pP-7 Trägern in der gesunden japanischen Bevölkerung im Vergleich zu Deutschland deutlich erniedrigt (1/278 (0.36%)) war, wobei das relative Risiko von pP-7 Trägern ein MGUS/MM zu entwickeln, bei den Japanern mit einer Odds Ratio von 13.1 deutlich erhöht war. Somit haben pP-7 Träger in beiden ethnischen Gruppen ein deutlich erhöhtes Risiko ein MGUS/ MM zu entwickeln.

Um die Frage zu beantworten, ob auch IgM-Paraproteine von IgM-MGUS- und Morbus Waldenström (oder auch Waldenström'sche Makroglobulinämie genannt (MW) Patienten eine P-7 Spezifität aufweisen, wurden die entsprechenden Seren im ELISA auf P-7 Reaktivität getestet. Zusätzlich wurde die Spezifität der durch das Paraprotein vermittelten Reaktion durch Absorptionsstudien und durch die Klonierung des B-Zell-Rezeptors aus Lymphknotengewebe betroffener Patienten belegt. Die IgM-Paraproteine von 18 von 161 (11%) Patienten (9 MW und 9 IgM-MGUS) reagierten spezifisch mit P-7. Isoelektrische Fokussierung und alkalische Phosphatase-Behandlung zeigten, dass P-7 in allen Patienten mit einem P-7 spezifischen IgM Paraprotein hyperphosphoryliert ist. Da nur 4 von 200 (2%) gesunden Blutspender Trägern von pP-7 sind, haben Träger von pP-7 ein hochsignifikant erhöhtes Risiko, ein IgM-MGUS oder eine MW (odds ratio= 6.2; p=0.001) zu entwickeln. Somit ist die MW neben dem IgA-/IgG-MGUS bzw. multiplem Myelom die zweite neoplastische Erkrankung, die mit dem Trägerstatus pP-7 assoziiert ist. Damit kann erstmals die oft beschriebene familiäre Häufung von MGUS/MM/ und MW strukturell erklärt werden. Zusammenfassend ist pP-7 der bisher erste molekular definierte Risikofaktor für eine hämatologische Neoplasie.

Summary

We recently described paratarg-7 (P-7) as the target of 13.9% of IgA and IgG paraproteins in MGUS and multiple myeloma (MM). Patients with P-7-specific paraproteins carry a hyperphosphorylated paratarg-7 (pP-7). Since only 2% of healthy Germans are carriers of pP-7, the pP-7 carrier state is associated with an increased risk (odds ratio=7.9) to develop MGUS/MM. Sequence analyses of P7 derived from patients with a P-7 specific paraprotein and healthy controls excluded mutations or polymorphisms as a cause of the autoimmunogenicity of P-7.

The frequency of MGUS/MM is lower in Japan than in Europe. As pP-7 is inherited in a dominant fashion, we determined the incidence of pP-7 carrier state in a Japanese population, and compared the frequency of pP-7-specific paraproteins and pP-7 carrier state in Japanese and German patients with MGUS/MM. Only 5 of 111 (4.5%) Japanese and 35/252 (13.9%) of German IgA-/IgG-MGUS/MM patients had a pP-7 specific paraprotein ($p=0.009$). The prevalence of healthy pP-7 carriers in the Japanese population was 1/278 (0.36%). The relative risk for pP-7 carriers to develop MGUS/MM has an odds ratio of 13.1 in the Japanese population. In conclusion, the fraction of pP-7 carriers with a pP-7 specific paraprotein is significantly lower ($P=0.166$) among Japanese than in German patients with MGUS/MM, but pP-7 carriers in both ethnic groups have a high risk to develop MGUS/MM.

To determine the frequency of paratarg-7 as a paraprotein target in IgM-MGUS and Waldenstrom's macroglobulinemia (MW), sera from patients with IgM-MGUS/MW were tested for reactivity with recombinant paratarg-7 by ELISA. The specificity of the paraprotein-mediated reaction was demonstrated by absorption studies and cloning of the respective B-cell receptor. The paraproteins of 18 of 161 (11%) patients (9 MW and 9 IgM-MGUS) reacted with paratarg-7. Isoelectric focusing and alkaline phosphatase treatment revealed that paratarg-7 was hyperphosphorylated (pP-7) in all patients with an anti-paratarg-7 specific IgM paraprotein tested. Since only 4/200 (2%) of healthy controls were carriers of pP-7, pP-7 carrier state is associated with a significantly increased risk (odds ratio= 6.2; $p=0.001$) for developing IgM-MGUS/MW. 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 dominant inheritance of pP-7 explains cases of familial IgM-MGUS/MW and enables the identification of family members at increased risk.

The fact that only MGUS/MM/MW patients who are carriers of pP-7 had a P-7 specific paraprotein suggests that the hyperphosphorylation of paratarg-7 induces auto-immunity and is involved in the pathogenesis of these diseases, probably by chronic antigenic stimulation.

1. Einleitung

1.1. Monoklonale Gammopathien / Paraproteinämien

Paraproteine sind im Blut und/oder im Urin nachweisbare monoklonale Immunglobuline oder Immunglobulin-Leichtketten, die ihren Ursprung in einer klonalen Proliferation von reifen B-Zellen (Plasmazellen oder B-Lymphozyten) haben. Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Expression von reifen und unreifen Plasmazellen im Knochenmark verbunden mit einem Nachweis von monoklonalem Immunglobulin im Serum bzw. von Leichtketten im Urin (Bence-Jones-Protein). Die Abgrenzung gegenüber einer benignen Gammopathie bzw. einem MGUS (monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz) kann schwierig sein und erfolgt aufgrund bestimmter Diagnosekriterien. Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass MGUS vom IgA oder IgG Typ eine obligate Vorstufe des Multiplen Myeloms und MGUS vom IgM Typ eine obligate Vorstufe der Makroglobulinämie Waldenström (MW) sind. Die Pathogenese der MM/MGUS/MW ist ungeklärt, obwohl eine chronische Stimulation durch das jeweilige Zielantigen der monoklonalen Immunglobuline schon seit längerem als pathogenetischer Mechanismus diskutiert wird.

1.2. Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne Plasmazell-Erkrankung, die durch eine klonale Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark, ein monoklonales Serumparaprotein, bzw. von Leichtketten im Urin sowie osteolytischen Knochenläsionen charakterisiert wird ¹. Das Multiple Myelom entwickelt sich in den meisten Fällen aus einer prämaligen Vorstufe - der monoklonalen Gammopathie von unbestimmter Signifikanz ². Die Genese der MGUS und des Multiplen Myeloms ist multifaktoriell. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer MGUS oder eines MMs gehören bestimmte berufsbedingte Expositionen, z.B. Landwirtschaft oder auch der Gebrauch von Pestiziden ³ sowie ionisierende Strahlung, was in einer Studie, die sich mit der den Überlebenden der Atombombenexplosion in Nagasaki in Japan beschäftigt hat, gezeigt wurde ³. Für eine genetische Disposition sprechen familiäre Häufungen sowie das Auftreten von Plasmazell-Erkrankungen bei Geschwistern und nahen Verwandten von MM und MGUS-Patienten sowie deutliche Unterschiede in der Prävalenz von beiden Erkrankungen in verschiedenen ethnischen Gruppen ^{4;5}.

1.3. MGUS (Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz)

Als monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz bezeichnet man die Proliferation eines Klons von B-Zellen mit der Bildung eines Paraproteins. Das Paraprotein gehört zu den Klassen IgG, IgA, IgM oder IgD ⁶. Es ist wichtig, zwei Arten von MGUS zu unterscheiden - ein IgM-MGUS und ein Non-IgM-MGUS. Bei den IgA-MGUS und IgG-MGUS handelt es sich um eine prämaligne Vorstufe des multiplen Myeloms ⁷. Die IgM-MGUS transformiert in MW, in ein Non-Hodgkin-Lymphom oder in eine chronische lymphatische Leukämie. Die MGUS-Patienten sind definitionsgemäß asymptomatisch und haben in der Regel einen monoklonalen Ig-Spiegel von weniger als 30 g/L, einen Hämoglobinwert von mehr als 12 g/dL sowie fehlende Knochenmarkinfiltration (< 10%) durch ein Lymphom. Es bestehen keine Osteolysen.

1.4. Prävalenz der MGUS/MM in unterschiedlichen ethnischen Gruppen

Es bestehen relevante Unterschiede in der Prävalenz der MGUS/MM in verschiedenen ethnischen Gruppen ^{8;9}. Die Prävalenz ist am größten bei den Afrikanern und Afroamerikanern mit 5,84% ¹⁰, ist seltener bei den Kaukasiern mit 3,2% und am seltensten bei Asiaten und Mexikanern mit 2,4% ¹¹. Siehe Abb.1.

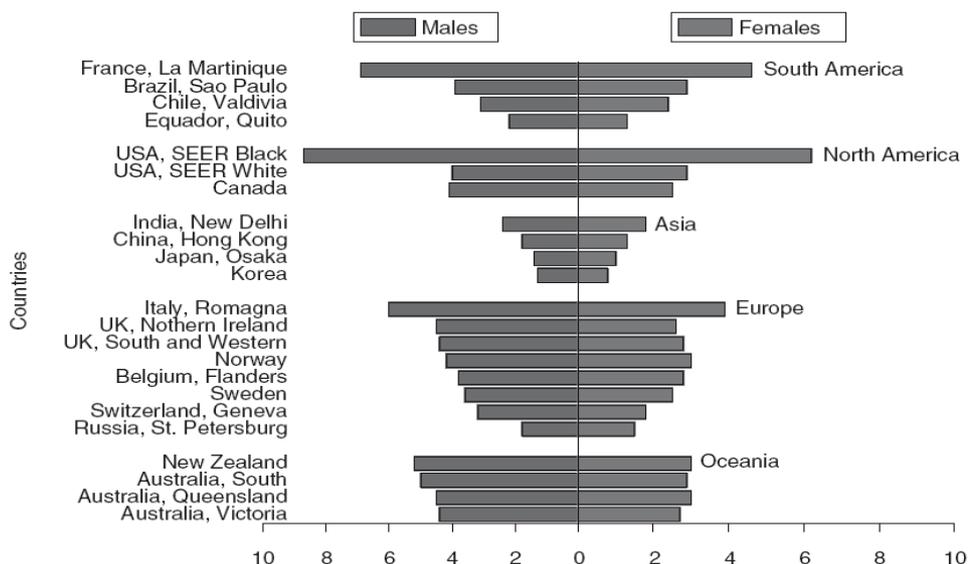


Abbildung 1: Die weltweite Inzidenz des Multiplen Myeloms (altersadaptiert pro 100.000 Personen pro Jahr) ⁸

Die Ursache dieser Diskrepanz ist unklar. Um die Frage zu klären, ob das erhöhte Risiko, an MGUS/MM zu erkranken, bei den schwarzen Amerikanern auf die genetische und mit der Rasse assoziierten Faktoren zurückzuführen ist oder ob Umweltfaktoren eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen, wurde eine Studie an West- Afrikanern in Ghana durchgeführt, weil sie mit den

Afroamerikanern ähnliche genetische Merkmale tragen ¹². Es wurde festgestellt, dass das Krankheitsrisiko bei den Ghanaern zweimal so groß wie bei weißen Amerikanern ist, was für die genetische Genese der MGUS spricht.

Die Prävalenz der MGUS/MM nimmt bei Kaukasiern im Alter zu, bei Menschen über 50 Jahren tritt MGUS in 3,2 %, bei den Menschen über 70 Jahren in 5,3% und über 85 Jahre in 7,5% auf. Bei Afrikanern entwickelt sich die Erkrankung früher¹⁰. In allen ethnischen Gruppen sind Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen (4,0% vs. 2,7%) ¹³; dabei ist die Progressionsrate des MGUS zum Multiplen Myelom in allen ethnischen Gruppen ähnlich.

1.5. IgM-MGUS

IgM-MGUS tritt bei 14% aller an MGUS erkrankten Patienten auf. Am häufigsten tritt die IgM-MGUS bei Kaukasiern (17%) auf, ist dagegen selten bei Afrikaner (6%) und schwarzen Amerikanern sowie bei Asiaten (7,5%) ¹⁴. Die Transformationsrate beträgt 1,5% pro Jahr, sie ist höher als bei anderen MGUS- Isotypen. IgM-MGUS transformiert üblicherweise in ein MW, selten in eine CLL, im Gegensatz zu den anderen MGUS- Isotypen, die eher in das MM übergehen.

1.6. Prävalenz von unterschiedlichen MGUS Isotypen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen

Bei weißen Kaukasiern tritt der Isotyp IgG in 68,9 % MGUS Patienten, der Isotyp IgM in 17,2% und IgA in 10% auf. Biklonale MGUS finden sich in 3% der MGUS- Patienten. Die Immunglobuline mit K-Leichtketten treten in 62%; mit λ - Leichtkette in 37,9% ¹³ auf.

Bei Japanern weisen 73,6% der MGUS Patienten den Isotyp IgG auf, IgA 17,7% und IgM 7,5%. Die Immunglobuline mit κ -Leichtketten machen 56%, mit λ -Leichtketten 41% aus.

Bei schwarzen Afrikanern weisen 74% der MGUS Patienten den Isotyp IgG auf, IgA 19%, IgM 6% und biklonal 2%. Die Immunglobuline mit K-Leichtketten machen 48% , mit λ -Leichtketten 50% und biklonale Immunglobuline machen 2% aus ¹¹.

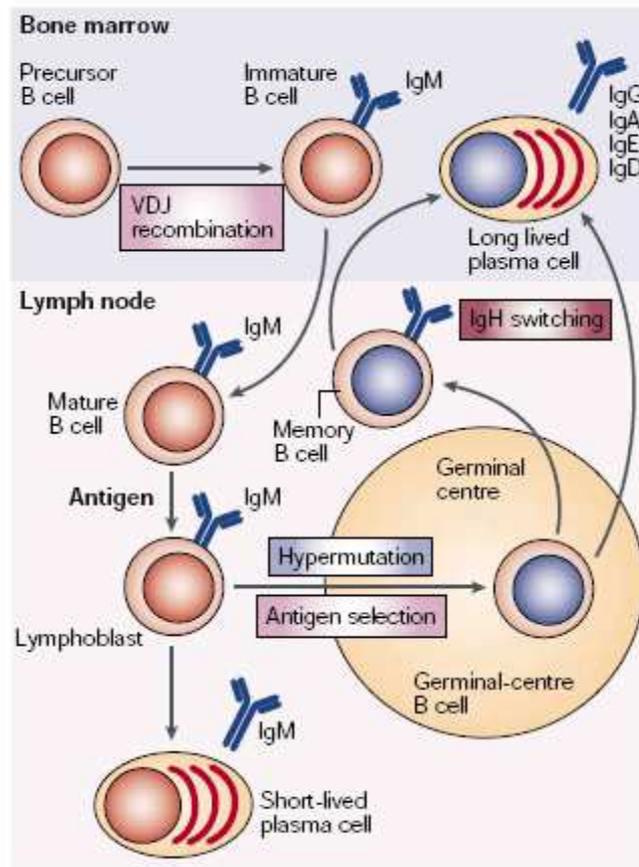


Abbildung 2: Entwicklung der B-Zellen und Tumorgenese.¹⁵

1.7. Ätiopathogenese der MGUS und des Multiplen Myeloms

Zur Entwicklung von MGUS und MM kommt es in Folge einer Kumulation von Ereignissen, die durch eine Immunantwort auf eine Antigenstimulation initiiert werden und zur Entwicklung einer immortalisierten und autonomen Plasmazelle führen (Abb.2). Beim multiplen Myelom erfolgen die ersten genetischen Veränderungen wahrscheinlich nach der Differenzierung in langlebige Plasmazellen, die bereits eine V(D)J-Rekombination der IgH- und IgL-Gene, somatische Hypermutationen der variablen IgH- und IgL-Genregionen und eine produktive IgH-Switch-Rekombination zu einem anderen Isotyp (IgG, IgA) vollzogen haben. Mit der FISH-Technik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) lassen sich in nahezu 100% der multiplen Myelome Chromosomenanomalien nachweisen. Bereits bei 50% der MGUS finden sich Hyperdiploidien. Nach den bisher vorliegenden Daten sind hypodiploide/pseudodiploide multiple Myelome mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf assoziiert.

Lympho-hämatopoetische Wachstumsfaktoren (IL-6, IL-6R α , GM-CSF, IFN- α , IL-10 u.a.) und Adhäsionsmoleküle unterstützen die Proliferation und Entwicklung der Tumorzellen im Knochenmark. Das möglicherweise in den Tumoren gebildete IL-1 β kann das pleiotrope IL-6 stimulieren, welches das Wachstum von Plasmazomzellen über den Ras-MPAK-Signalweg

fördert. Spätere aktivierende Mutationen von Ras-Genen können zur Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und zur Unterdrückung der Apoptose führen. Weitere genetische Veränderungen- (t(14:18), t(13q12-14), Mutationen des p53-Gens oder des Rb-Gens) können ebenfalls die Apoptose unterdrücken und zur Autonomie der Tumorzellen beitragen ¹⁶.

Der Übergang der MGUS zum multiplen Myelom erfolgt nach weiteren Mutationen, die das vom Knochenmarkstroma unabhängige Überleben des malignen Zellklons ermöglichen.

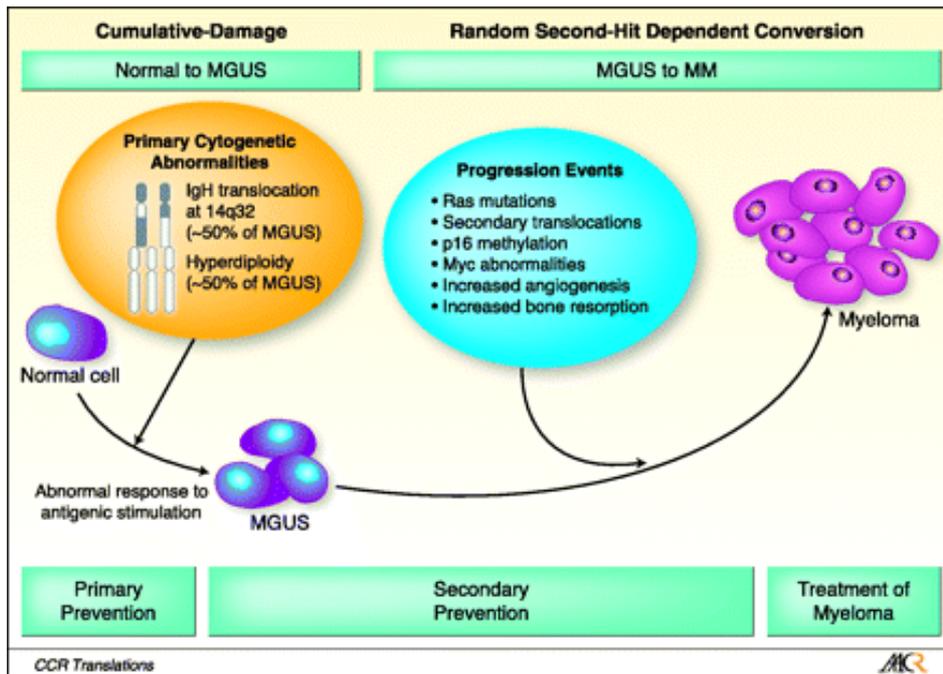


Abbildung 3: Pathogenese von MGUS und Übergang in das Multiple Myelom. Die Initiierung einer klonalen Plasmazellenproliferation ist wahrscheinlich durch eine pathologische Antwort auf eine Antigenstimulation in einem genetisch oder umweltlich anfälligen Milieu sowie durch Entwicklung von typischen zytogenetischen Veränderungen wie Hyperdiploidie oder IgH Translokation bedingt. Die Progression von MGUS zum Multiplen Myelom ist durch weitere Veränderungen in der klonalen Zelle sowie in dem Stromamikroenvironment verursacht. ¹⁷

1.8. Genese der IgM-MGUS

IgM-MGUS entwickelt sich aus den somatisch mutierten Postkeimzentrum- B-Zellen, die keinen Isotypswitch durchgemacht haben. Die IgM-MGUS ist eine biologisch andere Entität als IgG- oder IgA-MGUS ¹⁸.

1.9. Makroglobulinämie Waldenström / Lymphoplasmozytisches Lymphom / Immunozytom

Die MW wurde erstmals 1944 durch den schwedischen Internisten Jan Waldenström beschrieben (Waldenström J., Acta Med Scand 1944,216,117). Sie gehört zu der Gruppe der kleinzelligen lymphatischen Neoplasien und ist durch eine Knochenmarkinfiltration durch plasmazytoide Lymphozyten (> 10%) sowie durch den Nachweis von monoklonalem IgM-Paraprotein im Serum (>3/dl) charakterisiert ¹⁹. Nach der WHO Klassifikation gehört die MW zu der Gruppe der niedrigmalignen Lymphome ²⁰. Das IgM-MGUS ist eine prä maligne Vorstufe der MW ²¹.

Die Inzidenz von MW, im Gegensatz zu MGUS/MM, ist am höchsten bei Kaukasiern in den USA - 0,4 pro 100.000 pro Jahr, ist niedriger bei den Afro- Amerikanern (0,17 pro 100.000 pro Jahr) und ist am niedrigsten bei den Japanern (0,053 pro 100.000 pro Jahr). Männer sind häufiger betroffen als Frauen ²². Das mediane Erkrankungsalter der Patienten mit MW liegt bei 63 - 64 Jahren. Die Ätiologie der MW ist unklar. Eine familiäre Häufung ist beschrieben, was eine genetische Prädisposition nahe legt.

Das durch die malignen B-Lymphozyten exprimierte IgM weist eine große Anzahl an somatischen Mutationen auf, was für eine Selektion durch eine chronische Antigenstimulation spricht. Normalerweise kommt es im Laufe der B-Zellentwicklung zu einem Klassenwechsel, was allerdings bei MW B-Zellen nicht der Fall ist. Man könnte spekulieren, dass MW B-Zellen die Fähigkeit zum Klassenwechsel verloren haben und deshalb weiterhin IgM exprimieren ²³.

Die MW ist nicht assoziiert mit Translokationen, die die Immunglobulin-Schwerketten betreffen, was sie von den anderen Lymphomen unterscheidet ²⁴. In 55% der Patienten tritt eine Deletion des langen Armes des Chromosoms 6 auf ²⁵.

1.10. Die Bedeutung der chronischen Antigenstimulation in der Pathogenese von MGUS, MM und MW

Schon lange wird eine Rolle der chronischen Antigenstimulation bei der Entstehung von MGUS/MM/MW vermutet^{26;27}. Die Identifizierung von antigenen Stimuli der B-Zell Neoplasien unterstreicht den Einfluss der chronischen Antigenstimulation auf die Entstehung der MM/MGUS und MW. Bis jetzt wurden diese Strukturen nur durch Zufall entdeckt, entweder durch klinische Symptome, die durch die Antigenbindungsreaktivität des Paraproteins verursacht werden, z.B. Kryoglobulinämie Typ I²⁸, durch die Interferenz mit Laboruntersuchungen, z.B. im Falle eines HIV-positiven Patienten, dessen Paraprotein spezifisch mit dem HIV-1 p24 reagierte,²⁹ oder durch Screening der Paraproteine gegen prädefinierte Antigene, z.B.: Paraproteine mit Reaktivität gegen Streptolysin, gegen DNA und gegen IgG²⁸. Die Interpretation vieler dieser Beobachtungen wird aber dadurch erschwert, dass in den wenigsten Fällen der mit diesen Ansätzen beschriebenen Antigene der Nachweis der Spezifität mit überzeugenden Kontrollen geführt wurde, so dass antigene Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden können.

1.11. Stand der Forschung

Verschiedene Untersuchungen sprechen dafür, dass spezifische Zielstrukturen der Paraproteine eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MM/MGUS spielen, doch konnten bis heute nur wenige spezifische Antigen-Targets (und die meisten nur zufällig) identifiziert werden. Systematische Ansätze zur Identifikation von Paraproteinzielstrukturen gab es nur zwei. Ein Ansatz unserer Arbeitsgruppe beruhte auf Screening von cDNA Expressionsbibliotheken unterschiedlicher Herkunft mit hochverdünnten Paraprotein-haltigen Seren (Verdünnung 1:10⁸) mittels SEREX (serological identification of antigens by cDNA expression cloning)³⁰. Als cDNA-Quelle für die antigenen Zielstrukturen wurden sowohl gesunde als auch maligne humane Gewebe sowie unsere Hauptnahrungsmittel untersucht. Auf diese Art und Weise konnten die körpereigenen Antigene -TPP2 (Tripeptidyl-Peptidase-II), IGFBP2 (Insulin-like Growth Faktor Binding Protein-2) und ein Nahrungsmittelantigen – Kinesin aus Schweinefleisch (porcine kinesin) als Paraprotein-Zielstrukturen identifiziert werden. Alle diese Antigene reagierten mit jeweils nur einem Paraprotein, waren also individualspezifisch.

Mit einem modifizierten Ansatz, beruhend auf einem sog. rekombinanten humanen Protein-Macroarray aus fötalem menschlichen Gehirn, konnten wir das körpereigene Paraprotein-Target „Paratarg-7“ identifizieren, welches mit 15% aller getesteten Paraprotein-haltigen IgA/IgG Seren (35/252) bei hoher Verdünnung (1:10⁸) spezifisch reagiert³¹.

1.12. Charakterisierung von Paratarg-7

Dieses Zielantigen war in der Literatur als SLP-2 beschrieben worden (Stomatin-like-protein (syn.: STOML-2)) und wird in fast allen menschlichen Geweben und Zellen exprimiert. SLP-2 ist ein 31-kDa mitochondriales Membranprotein, das zusammen mit SLP-1 und SLP-3 zu der Familie der Stomatinen gehört (Wang, Y., Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, Issue of March 17, pp. 8062-8071, 2000)³². Das kodierende Gen (HUSLP2) befindet sich auf dem Chromosom 9p13. Es ist in dem mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. In den Erythrozyten ist SLP-2 mit der Zellmembran assoziiert, aber nicht direkt mit ihr verbunden. Die Funktion des SLP-2 ist noch nicht geklärt. Verschiedene Studien weisen auf eine Überexpression von SLP-2 in verschiedenen Tumorgeweben hin, wie zum Beispiel bei Larynx-, Endometriumadeno-, Mamma-, Bronchial- sowie bei Ösophaguskarzinomen^{33;34}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SLP-2 eine bedeutende Rolle während des Zellwachstums, der Proliferation und Zelladhäsion einnimmt und auch an Prozessen der Tumorgenese und Metastasierung beteiligt ist³⁵.

Mutationen und Polymorphismen von Paratarg-7 als Ursache der Autoimmunogenität konnten durch DNA-Sequenzierungen von P-7 bei Patienten mit IgA-, IgG-MGUS, die ein Paratarg-7 spezifisches Paraprotein haben, ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Daten). Ebenso zeigten sich in der SDS-PAGE-Analyse aus Vollblutlysaten identische Banden für Paratarg-7 von Patienten und gesunden Kontrollen. Erst in der isoelektrischen Fokussierung zeigte sich ein unterschiedliches Laufverhalten von Paratarg-7 aus Lysaten von Patienten mit anti-Paratarg-7 reaktivem Paraprotein und gesunden Kontrollen bzw. mit Patienten, die ein Paraprotein einer anderen Spezifität aufweisen.

Die Identität der Paratarg-Sequenzen zusammen mit dem unterschiedlichen Verhalten von Paratarg-7 in der isoelektrischen Fokussierung deutete auf eine posttranslationale Veränderung von Paratarg-7 in diesen Patienten hin. Nach Phosphatase-Behandlung zeigte sich in der isoelektrischen Fokussierung ein identisches Laufverhalten der beiden Paratarg-7-Varianten, was eine Hyperphosphorylierung des Paratarg-7-Proteins in den entsprechenden Patienten im Vergleich zu den Kontrollen beweist. Siehe Abb. 4 und 5³⁶.

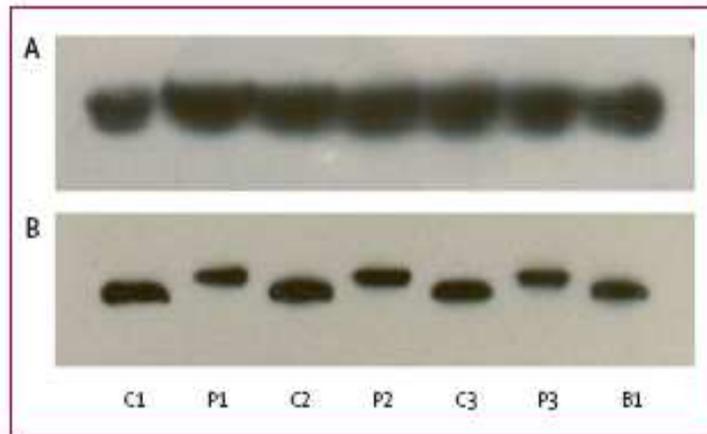


Abbildung 4: Western- Blot- Analyse von Paratarg-7 von Patienten mit Paratarg-7 spezifischem Paraprotein (P1-P3), einem Patienten mit nicht-Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (B1) und drei gesunden Kontrollpersonen (C1-C3). A: In der SDS-PAGE migrieren alle Banden gleich. B: In der isoelektrischen Fokussierung zeigen die Patienten mit Paratarg-7 spezifischen Paraprotein ein unterschiedliches Laufverhalten im Vergleich zu den Patienten mit nicht-Paratarg-7 spezifischen Paraprotein und zu den Kontrollpersonen.

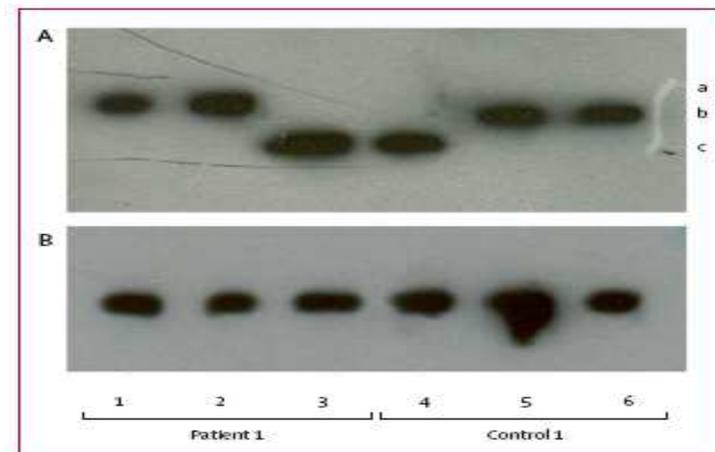


Abbildung 5: Phosphatase Behandlung von Paratarg-7. A: Isoelektrische Fokussierung. In unbehandelten Lysaten von Patienten mit anti-Paratarg-7 spezifischen Paraprotein (Patient 1) bzw. im Lysat einer gesunden Kontrollperson (Control 1) zeigt die isoelektrische Fokussierung unterschiedliches Laufverhalten (Bande 3,4). Dies bleibt nach Inkubation mit dem Lysepuffer unverändert (Banden 2 und 5). Nach Behandlung der Lysate mit alkalischer Phosphatase zeigen die Banden aus dem Patientenlysat und aus dem Kontrolllysat identisches Laufverhalten (Banden 3,4). B: SDS-PAGE-Analyse. Es zeigen sich identische Banden für Paratarg-7 von Patienten und Kontrollen.

Weitere Experimente zeigten, dass die einzige zusätzliche Phosphorylierung an einem Serin in Position 17 stattfindet. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass an dem untersuchten Phosphorylierungsstatus sowohl die Proteinkinase C ζ (PKC ζ) als auch die Protein Phosphatase 2A (PP2A) eine wichtige Rolle spielen³⁷.

Die Spezifität der Paraprotein-vermittelten Reaktion wurde u. a. auch durch Absorptionsstudien belegt. Der M-Gradient in der Eiweißelektrophorese verschwand nach Absorption mit Paratarg-7, nicht jedoch nach Absorption mit einem Kontroll-Target (Abb. 6).

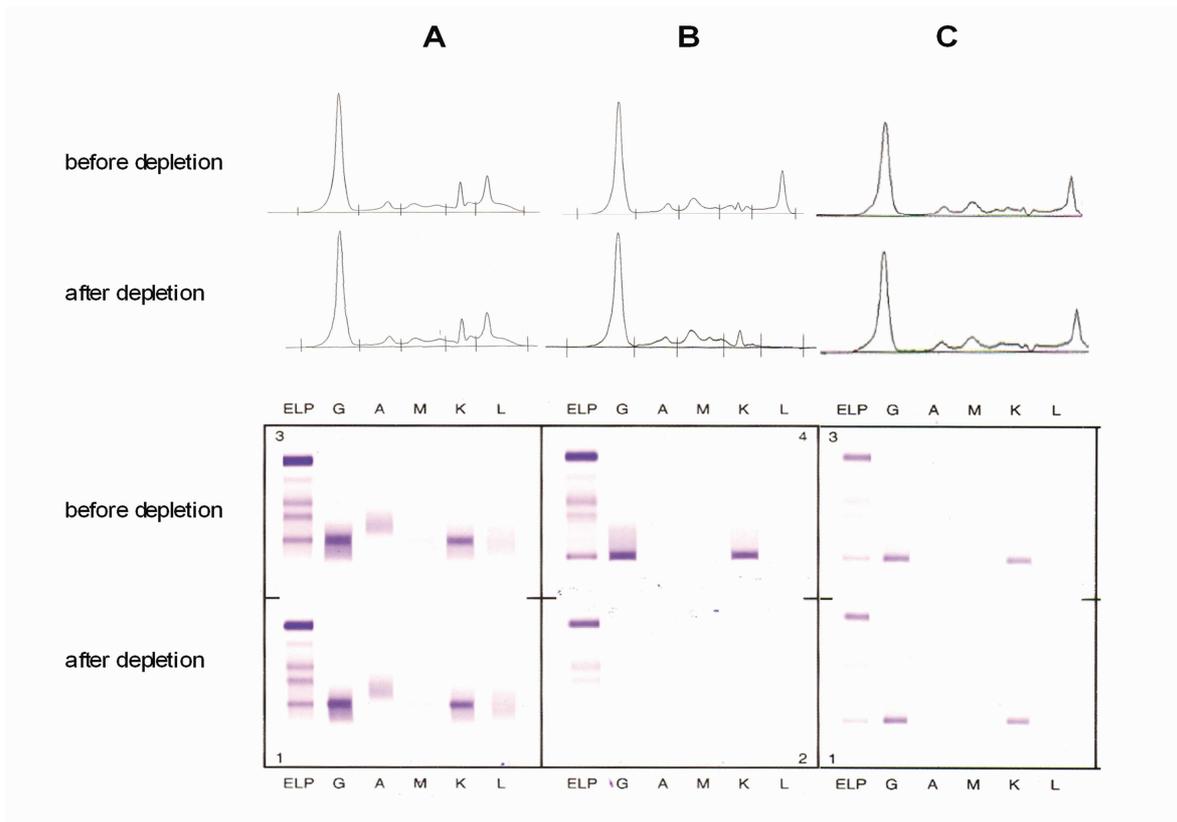


Abbildung 6: Absorption vom Serum eines IgG MM Patienten mit P-7 Spezifität. A: IgG Paraprotein ohne P-7 Spezifität und Absorption durch eine P-7 Säule. B: IgG Paraprotein mit P-7 Spezifität und Absorption durch eine P-7 Säule. C: Dasselbe P-7 spezifisches Paraprotein IgG, aber Absorption durch eine Mitofilinsäule (Kontrolle). Obere Bilder: Serumelektrophorese vor und nach Absorption, untere Bilder: Immunfixation vor und nach der Absorption. Der M-Gradient in der Eiweißelektrophorese verschwand nach Absorption mit Paratarg-7, nicht jedoch nach Absorption mit einem Kontroll-Target³⁸.

Untersuchungen innerhalb von Familien von MM/MGUS-Patienten, die ein Paratarg-7 spezifisches Paraprotein aufweisen, zeigten, dass pP-7 autosomal dominant vererbt wird (Abb. 7).

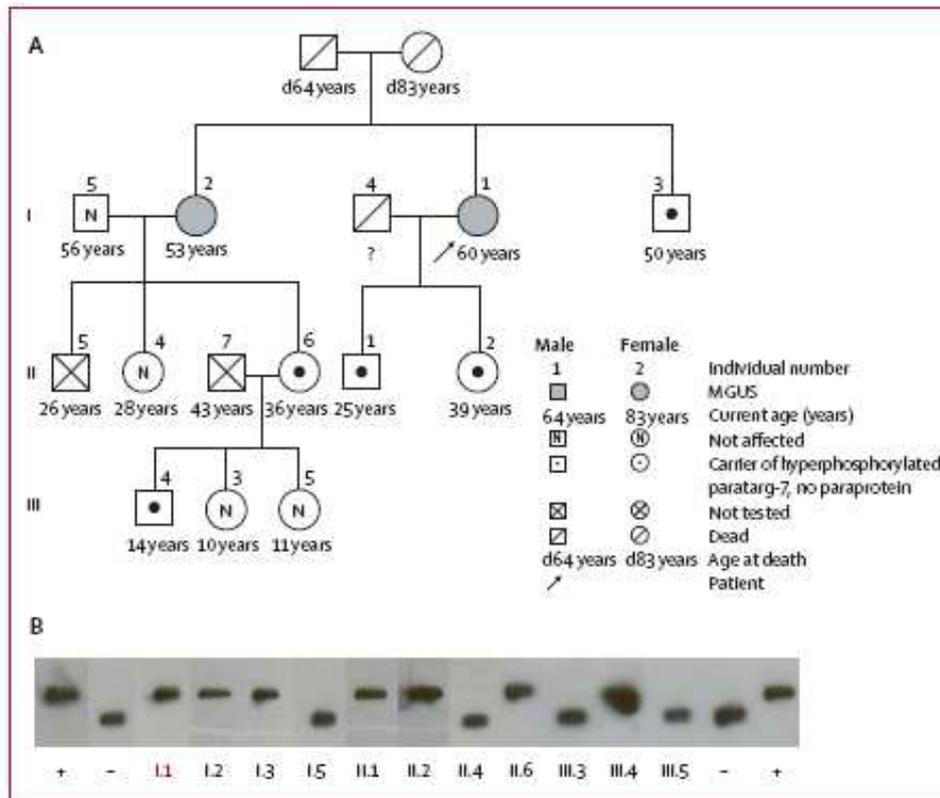


Abbildung 7: Erbgang des hyperphosphoryliertem Paratarg-7 in einer Familie, in der beide Schwestern MGUS mit einem Paratarg-7 spezifischen Paraprotein haben. Die dem jeweiligen Individuum zugeordnete IEF ist in den Blots im unteren Teil der Abbildung zu sehen. Quelle ^{39:39}

Nur 2% aller untersuchten gesunder Kontrollen (4/200) sind Träger von pP-7. Somit haben Träger von pP-7 ein 7,9-fach erhöhtes Risiko (odds ratio 7,9; 95% CI: 2,8-22,6, p = 0,0001), im Laufe ihres Lebens ein MM/MGUS zu entwickeln. Allerdings ist dieser Effekt nicht unmittelbar mit dem Auftreten der Erkrankung gekoppelt. Viele Merkmalsträger innerhalb der jeweiligen Familien sind trotz ihres hohen Alters nicht an einem MM/MGUS erkrankt.

1.13. Ziele der Arbeit

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Prävalenz und Bedeutung hat pP-7 in anderen ethnischen Gruppen? Hier sollten vor allem die Unterschiede zwischen der japanischen und deutschen Bevölkerung untersucht werden.
2. Ist Paratarg-7 auch eine antigene Zielstruktur von IgM-Paraproteinen?
3. Wenn ja, welche Prävalenz und welche Bedeutung hat pP-7 bei IgM-MGUS und Makroglobulinämie Waldenström?
4. Zum Nachweis der Paraprotein-vermittelten Reaktion mit dem Antigen pP-7 soll der B-Zell-Rezeptor von einem Patienten mit Paratarg-7 Spezifischen IgM Paraprotein kloniert werden.

Dank der Kooperationen mit Prof. Dr. Steven Treon und Dr. Zachary Hunter (Bing Center for Waldenström's Macroglobulinemia, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) sowie den Professoren Evangelos Terpos und A. Dimopoulos (University of Athens School of Medicine, Department of Clinical Therapeutics in Athens, Griechenland) standen uns 161 Proben von Patienten mit MW zur Verfügung. Dank Prof. Ueda aus Nagoya City University in Japan standen uns insgesamt 389 Proben von MGUS/MM Patienten sowie gesunden Spendern zur Verfügung. Zur Beantwortung der oben genannten Fragen sollten alle Blutproben in dem von uns etablierten ELISA auf Paratarg-7-spezifische Paraproteine untersucht werden. Des Weiteren sollte bei allen Patienten bzw. gesunden Blutspendern mit Hilfe der IEF eine Charakterisierung des Paratarg-7-Proteins bezüglich der Hyperphosphorylierung durchgeführt werden. Die hohe Spezifität der Paraprotein-Reaktivität sollte durch zusätzliche Klonierung des B-Zell-Rezeptors aus Lymphknotengewebe betroffener Patienten und durch Absorptionsstudien demonstriert werden.

2. Patienten

2.1. Patienten und gesunde Spender

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes sowie durch die Interne Kommission der Nagoya City University genehmigt und nach den Regeln der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Patienten, die Patientenangehörigen und die gesunden Spender haben vor dem Einschluss in die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Als erkrankt wurde ein Patient bezeichnet, bei dem in der Elektrophorese ein M- Gradient festgestellt wurde zusammen mit der Identifikation eines monoklonalen IgA-, IgG-, IgM-Antikörpers in der Immunfixation. Es gab keine Unterschiede bezüglich des Patientenalters, des Geschlechts, des M-Proteinlevel und des Krankheitsstadiums zwischen den pP-7 positiven und den pP-7 negativen Patienten.

Als gesund wurde ein Spender betrachtet, bei dem kein monoklonales Immunglobulin in der Serumelektrophorese und in der Immunfixation nachweisen ließ und bei dem keine Auffälligkeiten in der körperlichen Untersuchung sowie keine Beschwerden in der Anamnese zu erheben waren. Die Patientenangehörigen wurden durch die Patienten kontaktiert. Wenn immer möglich wurden die Proben während der Routine- oder therapeutischen Untersuchungen gesammelt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2. Rekrutierung der Patienten

In die Studie wurden Patienten mit folgenden Krankheitsentitäten eingeschlossen: Multiples Myelom (MM), Makroglobulinämie Waldenström (MW), und Monoklonale Gammopathie Unbestimmter Signifikanz (MGUS) vom Typ IgA, IgG, IgD, und IgM.

3. Material

3.1. Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien mit Angaben der Hersteller

Reagenzien	Land
Agarose für DNA-Elektrophorese	Sigma, St. Louis
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNA and Gel Purification Kit Amersham	Biosciences, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Saliter, Obergrünzburg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosefolie	Sartorius, Göttingen
TOPO-Kit	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Trishydrochlorid (TrisHCL)	Sigma, St. Louis
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma, St. Louis

3.2. Puffer und Medien

LB-Medium mit Kanamycin:

- 1% Bactotrypton
- 0,5% Hefe-Extract
- 1% NaCl
- pH 7.0
- autoklavieren
- 50 µg/ml Kanamycin hinzufügen

LB- Agarplatten mit Kanamycin:

- 500 ml LB-Medium
- 7,5g Bacto-Agar (1,5%ig)

- Autoklavieren
- 50 µg/ml Kanamycin in Platten auftragen
- Bei 4°C lagern

Top-Agar:

- 500 ml LB-Medium autoklaviert
- 2 g Agar
- 2 g Agarose

SOC Medium:

- 2% Bacto Tryptone
- 0,5% Hefe Extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glucose

2-TY-Medium:

- 16 g Bacto Tryptone
- 10 g Yeast Extract
- 5 g NaCl
- ad 1 l a.dest.
- 2% Glucose
- 100 µg/ml Ampicillin

PBS-Lösung:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,14 g NaH₂PO₄
- 0,24 g KH₂PO₄
- ad 800 ml Aqua dest.
- ergibt 1l Lösung, sterilisieren

TBS-10x-Stammlösung:

- 87,8 g NaCl
- 60,0 g TrisHCl

- 14,0 g TrisBase
ad 1 l Aqua dest.

Agarosegel- Ladepuffer (10 ml):

- 10 mg 0,1% Bromphenolblau
- 20 mg 0,2% Xylencyanal
- 20 mg 0,2 Orange G
- 5 g 50% Sucrose
- 20 µl 1mM EDTA

Proteingele-Lauf-Puffer 5x:

- 144 g Glycin
- 30,34 g TRIS
- 10 g SDS
- ad 2 l a. Dest

Protein-SDS-Probenpuffer 5x:

- 0,6 ml 1M Tris pH 6,8
- 2,5 ml 100% Glycerol
- 2 ml 10% SDS
- 0,5 ml Bromphenolblau
- 3,9 ml a.dest.

Protein-Reduzierender SDS-Probenpuffer:

- 50µl Mercaptoethanol in 1 ml
- 5xSDS-Probenpuffer

ELISA

Coating-Puffer:

- 2,12 NaCO₃ ad 100 mla.dest.
- 1,68g NaHCO₃ ad 100 ml a.dest
- 1,7 ml A + 0,8 ml B + 7,5 ml a.dest

TBS-Lösung:

- 8,78 g NaCl

- 6,05 g TrisHCl
 - 1,4 g TrisBase
- ad 1 l Aqua dest.

POX-OPD-Entwicklung:

- Lsg.A:
- 0,2 M Dinatriumphosphat 2 H₂O
- 3,56g in 100 ml a.dest
- Lsg.B:
- 0,1 M Citronensäure 1 H₂O
- 2,1 g in 100 ml a.dest
- 5µl H₂O₂ 30% für 10 ml Entwickler

Western Blot

Western-Blot-Puffer

1.TBS 0,05% Tween = Waschpuffer

- 8,8 g NaCl
- 6,05 g Tris
- 0,8 ml 5M HCl
- 0,5 ml Tween 20
- ad 1 l a.dest

SDS-Page

Coomassie- Farbstoff:

- 1 g Coomassie brilliant Blue250
- 450 ml Methanol
- 450 ml H₂O
- 100 ml Essigsäure
- mind. 30 min Coomassie
- 1 h Coomassie Destain

Entfärber für Coomassie- Gele:

- 100 ml Methanol

- 100 ml Eisessig
- 800 ml a.dest
- NaAc 3M pH 5,2
- Lösen von 408,1g von NaAc

LB-Agar Platten mit Kanamycin bzw. Ampicillin:

- LB-Medium
- 15 g/l Agar
- Autoklavieren
- 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µ/ml Ampicillin in Platten auftragen
- Bei 4°C lagern

Lysis –Puffer:

- 20 mM Tris pH 8
- 1 mM PMSF
- 1 mg/ml Lysozym
- 0,05% Triton X

Poncaeu- Färbung 10x:

- 2 g Poncau S
- 30 g Trichloressigsäure
- 30 g Sulfosalicylsäure
- ad 100 ml a.dest

SDS 10%:

- 100 g SDS in 900 ml a.dest auf
- 68°C erhitzen um es in Lösung zu bringen.
- Mit 10 M NaOH auf pH7 einstellen

TAE 50x Stammlösung:

- 242 g Tris- Base

2. Blockpuffer:

- 100 ml Waschpuffer
- 10 g Magermilchpulver

- Bzw. 3 g BSA

Isoelektrische Fokussierung- IEF

- Fertiggele der Firma Invitrogen, NovexR pH 3-10, Karlsruhe
- Kathodenpuffer, NovexR pH 3-10, Invitrogen, Karlsruhe
- Anodenpuffer, NovexR pH 3-10, Invitrogen, Karlsruhe

DNA-Gele

- 2%iges Agarose-Gel:
- 3 g Agarose
- 50 ml 1x TAE
- Suspension aufkochen
- nach Abkühlen auf ca. 60°C Zugabe von 100 µl Ethidiumbromid (Konzentration 0,5 µg/ml)

3.3. Kits

- Plasmid DNA purification kit by Machery-Nagel
- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)
- QIAamp DNA FFPE Tissue-Kit, Qiagen, Germany, Hilden)

3.4. Antikörper

Tabelle 2: Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Hersteller

Antikörper	Hersteller
Mouse Anti-FLAG mAb M2	(Sigma, München, Deutschland)
Mouse anti-STOML2	(BioRad, California, USA)
Goat anti-human IgG- biotiniliert	(Dianova, California, USA)
mouse anti-human IgG-biotiniliert	(Dianova, California, USA)
mouse anti c-myc Antikörper	(BioRad, California, USA)
anti-mouse –POX Antikörper	(BioRad, California, USA)

4. Methoden

4.1. Asservierung der Blutproben

Frisch abgenommenes Vollblut wird zur Vorbereitung für den ELISA wird das Vollblut über 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Davon werden 200 µl Serum abgenommen und bei -20°C eingefroren.

4.2. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Um die Paratarg-7-Spezifität nachzuweisen, wurde ein ELISA verwendet. Der von uns entwickelte indirekte ELISA basiert auf in der Zelllinie HEK293 rekombinant hergestelltem Volllänge-Paratarg-7, welches an seinem C-terminalen Ende ein FLAG Tag besitzt; damit wird eine Bindung des Paratargs-7 an die mit anti-FLAG mAb gecoatete Nunc MaxiSorb Mikrotiterplatte ermöglicht.

Der erste Schritt des ELISA besteht darin, den Antikörper an die feste Phase zu binden „coat“ (Abb.8). In diesem Prozess kommt es zur Adsorption des Antikörpers an die Mikrotiterplattenfläche.

Nachdem die Platte gecoatet und bei 4°C über Nacht inkubiert wurde, erfolgte das Abblocken freier Proteinbindungsstellen mit Gelatine. Zunächst wurde auf die Platte das HEK-Paratarg-7 Zelllysat aufgetragen und über 1 Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Seren aufgetragen. Die Seren der Patienten mit MW/MM/MGUS wurden auf 1:10⁸ verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationsphase (1 Std.) wurde die Platte gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers (goat Anti-human-IgG-biotiniert, 1:2500), der mit IgG reagiert und Kreuzreaktion mit IgM und IgA zeigt. Im nächsten Schritt wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Conjugat (1:50000) auf die Platte aufgetragen. Nach der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde ein Entwickler dazu gegeben (OPD). Das chromogene Substrat-OPD wird vom Enzym-Peroxidase zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag festgestellt werden kann. Die Reaktion wurde mit 3 M HCl gestoppt. Der quantitative Nachweis erfolgte bei 490 nm im Photometer (Wallac).

Zwischen den einzelnen Schritten des Prozesses erfolgte das Waschen mit TBS-TX100, was zu Entfernung der nicht gebundenen Reagenzien diente.

ELISA

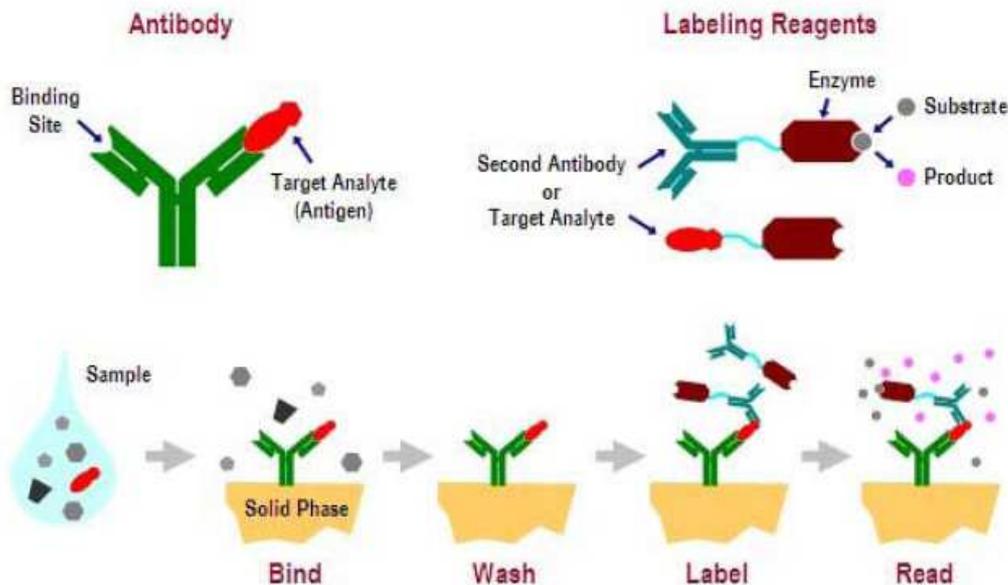


Abbildung 8: Schema der ELISA Untersuchung. Die Methodenbeschreibung erfolgt im Text.

4.3. Herstellung von rekombinanten SLP-2

Im Labor vorhanden war die rekombinante Zelllinie HEK-293-psfi-SLP-2-VL-Flag. Sie wächst über 3 bis 7 Tage in Kultur mit RPMI 1640, 10% FCS (fetal calf serum), 4mM Glutamin und Selektionsantibiotikum G418 (Geneticindisulfat) 500 µg/ml und produziert rekombinantes humanes Flag-getagtes SLP-2. Wenn die Zellen konfluent sind, erfolgt eine Zellernte - die Zellen werden dreimal im PBS gewaschen; nach jedem Waschvorgang werden die Zellen bei 1200 rpm über 10 Minuten abzentrifugiert. Daraufhin werden die Zellen in einer Zellzählkammer gezählt - 1×10^7 Zellen werden in 100 µl Lysispuffer lysiert, danach für 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 30 Minuten bei 1300 rpm bei 4°C abzentrifugiert. In dem nächsten Schritt erfolgt eine Proteinbestimmung und Einstellung des Lysat auf 1 mg/ml (Stocklösung).

4.4. Isoelektrische Fokussierung-IEF

Die isoelektrische Fokussierung stellt eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einem Gel aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten dar. Als isoelektrischen Punkt (IEP) bezeichnet man denjenigen pH-Wert eines Proteins, bei dem die positiven und negativen Ladungen gleich sind, d.h. die Gesamtladung des Proteins Null beträgt. Dieser IEP ist spezifisch für jedes Protein. Er wird durch die Zusammensetzung sowie durch die Anzahl und Ladungen in der Proteinprimärstruktur bedingt. Durch Beimischung von Ampholyten (besitzen amphotere Eigenschaften) zur Trennmatrix wird nach Anlegung eines elektrischen Feldes ein stabiler pH-Gradient ausgebildet. Die Proteine wandern gemäß ihrer Ladung vom Punkt des Probenauftrags in Richtung Kathode bis zu der Stelle im pH-Gradienten, der ihrem IEP entspricht (pH 3-10). Dort besitzen die Proteine keine Ladung mehr. Somit unterbleibt eine weitere Wanderung der Proteine im elektrischen Feld.

Zur IEF wurden für 1 Stunde eine Spannung von 100 V, danach für 1 Stunde eine Spannung von 200 V und anschließend für 30 Minuten 500 V in einem vertikalen Elektrophoresekammer angelegt. Für unsere Untersuchungen haben wir die Gele der pH3-10, Invitrogen, Germany, Karlsruhe).

4.5. Vorbereitung der Proben für die IEF

Es wurde 100 µl Vollblut abgenommen und 3-mal in 1 ml PBS gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Probe für 1 Minute bei 7000 rpm (Zentrifugalkraft 4500 g) zentrifugiert. Anschließend wurde zum Pellet 100 µl PBS und 200 µl Harnstoffpuffer zur Lyse zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben bei -20°C weggefroren.

Für die Durchführung der IEF wurden 5 µl des Lysats mit 5 µl IEF Puffer gelöst und anschließend in die Ladetaschen aufgetragen.

4.6. Semi-Dry Transfer

Die in der IEF aufgetrennten Proteine wurden von dem Gel auf eine PVDF- Membran mittels der semi-dry-blot Methode nach Kyhse- Anderson übertragen. Für den Blot wurde auf die Platin-Anodenseite ein mit Transferpuffer vollgesogenes Whatmann-Blotpapier gelegt. Hierauf wurde dann eine präparierte PVDF-Membran (Millipore Immobilon, Eschborn, Germany) gelegt. Die Präparation der PVDF-Membran wurde folgendermaßen durchgeführt: zunächst wurde sie in 100% Methanol hydrophilisiert, dann bewässert und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Auf die PVDF-Membran wurde das Gel gelegt. Dieses wurde wieder in einem in Transferpuffer getränkten Whatmann-Blotpapier bedeckt. Die Luftblasen wurden durch gleichmäßiges

Überrollen des Blotpapiers mit einem Glasstab entfernt. Dann wurde eine Platin-Kathodenplatte aufgelegt und für 40 Minuten eine Gleichspannung von 25 V bei 150 mA angelegt. Um die freien Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde die PVDF-Membran anschließend über Nacht in 10% Milch bei 4°C inkubiert.

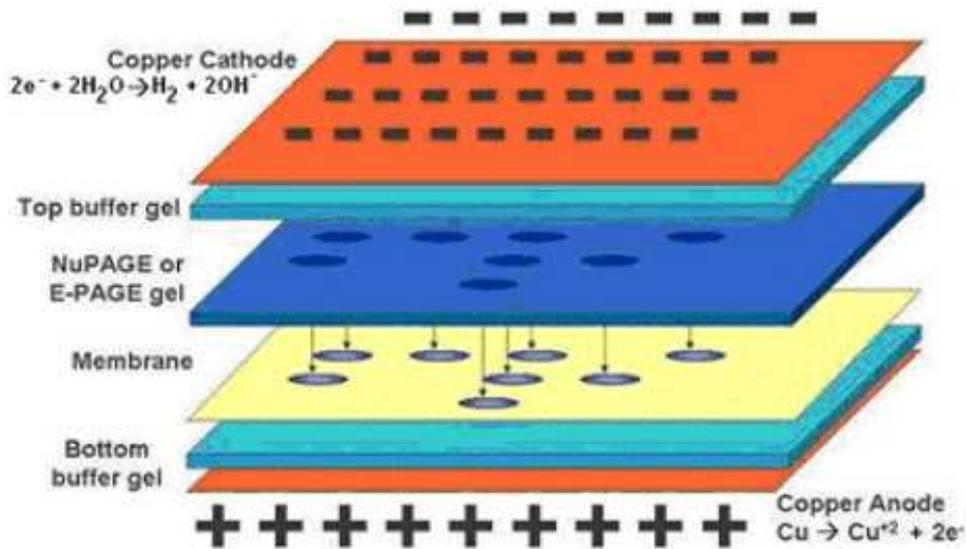


Abbildung 9: Schema der Semi Dry Transfer Methode. Die Methodenbeschreibung erfolgt im Text.

4.7. Western Blot

Nach Übernachtinkubation wurde die PVDF-Membran zunächst 3-mal mit TBS gewaschen. Daraufhin wurde sie über 1 Stunde mit dem Primärantikörper-Anti-STOML2 (1:250), BioRad, Dreieich, Germany, inkubiert. Dann wird die PVDF-Membran 3-mal in TBS gewaschen und anschließend über 1 Stunde mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (α -mouse-POX, Verdünnung 1:3000 in TBS), BioRad, California, USA) inkubiert.

4.8. Visualisierung durch die ECL - Enhanced Chemoluminescence

Der Nachweis von gebundenen Peroxidase-markierten Detektionsantikörper wurde mittels der „enhanced chemoluminescence method“ durchgeführt (Pharmacia`s ECL, General Electrics, Connecticut, USA). Die Methode basiert auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion, bei der es zur Emission von Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 428 nm kommt:



Die Membran wurde mit der „Gesichtsseite“ nach oben zwischen 2 Folien in eine Filmkassette gelegt. Daraufhin erfolgte eine einminütige Inkubationszeit der ECL-Reagenzien mit der PVDF-Membran. Anschließend wurde in einer Dunkelkammer auf die PVDF Membran ein Bio-Max-Film aufgelegt. Die Belichtungszeiten betragen zwischen 30 sec. und 30 min. Anschließend wurde der Film in Entwicklerlösung gelegt, gewässert, fixiert, wieder gewässert und dann trocken gelassen.

4.9. Klonierung des B-Zell- Rezeptors (BCR)

Um nachweisen zu können, dass der B-Zell-Rezeptor die gleiche Spezifität hat wie das Paraprotein, haben wir den B-Zell-Rezeptor (BCR) eines Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström kloniert und exprimiert. Es wurden rekombinante Fab-Fragmente des B-Zell-Rezeptors hergestellt. Den Aufbau eines Antikörpers zeigt die Abb.10.

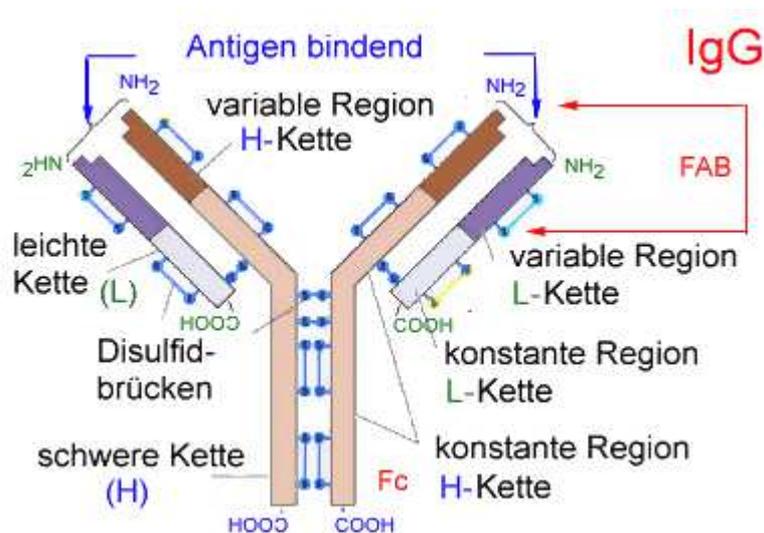


Abbildung 10: Schema eines Immunglobulins

Die Klonierung des B-Zell-Rezeptors ist ein mehrstufiger Prozess, der im Folgenden zuerst übersichtsmäßig und anschließend in Einzelschritten beschrieben wird.

Aus einem Lymphknotenpräparat eines Patienten mit M. Waldenström wurde als Ausgangsmaterial genomische DNA isoliert (Abschnitt 2.3.3.1.). Daraus wurden die variablen Bereiche der Immunglobulin-Gene (VH/VL) in parallelen Amplifikations-Schritten jeweils in zwei aufeinander folgenden PCR Reaktionen vervielfältigt und anschließend sequenziert (Abschnitt 2.3.3.4.). Mit Hilfe der so gewonnenen Sequenzinformationen wurde eine weitere spezifische PCR Reaktion aus dem Produkt der ersten PCR Reaktion angesetzt, um sowohl die für

die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen einzufügen als auch den Leserrahmen der VH/VL-Regionen an den Leserrahmen des Expressionsvektors anzupassen (Abschnitt 2.3.3.5). Die PCR-Produkte wurden, um die Handhabung zu vereinfachen, zuerst in den TOPO-Vektor und anschließend in den E.coli-Expressionsvektor pCES (Abschnitt 2.3.3.14.) kloniert. Dieser Expressionsvektor enthält eine verkürzte schwere Kette der Immunglobuline (nur CH1), die leichte Kette ist vollständig vorhanden. Dieser Vektor produziert nach Induktion Fab-Fragmente, die sich hinsichtlich Epitoperkennung wie Antikörper mit vollständigen konstanten Regionen verhalten.

4.10. DNA-Präparation

In Kooperation mit dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Leitung: Professor Dr. Rainer Bohle) wurden von einem mit malignen Zellen hoch angereicherten Lymphknoten eines Patienten mit M.Waldenstöm Schnitte angefertigt und direkt in eine Eppendorf-Tuibe transferiert. Daraus wurde unter Benutzung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits genomische DNA isoliert.

4.11. PCR-Polymerasenkettenreaktion

Die PCR ist eine enzymatische Synthese (Amplifikation) eines bestimmten DNA-Fragments anhand einer vorhandenen DNA-Matrize (Template). Durch zyklische Veränderungen der Temperatur initiieren gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) die Amplifikation. Die Primer sind jeweils einem Template-Strang komplementär und definieren so das zu amplifizierende Fragment. Eine DNA-Polymerase synthetisiert anhand des Einzelstranges der denaturierten DNA-Matrize in der Anwesenheit von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) und Primern einen neuen zur DNA-Matrize komplementären DNS-Strang. Da auch der bereits synthetisierte Strang als Matrize dient, findet eine exponentielle Vermehrung des DNS-Fragmentes statt. Diese DNA Vermehrung erfolgt durch eine zyklische Wiederholung von drei nacheinander folgenden Schritten:

1. Denaturierung – durch Erhitzen der doppelsträngigen Template-DNA (dsDNA) auf etwa 95°C, dabei erfolgt die Aufspaltung der dsDNA in deren Einzelstränge.
2. Annealing – bei einer bestimmter Temperatur (ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, gewöhnlich 55 – 80 °C) erfolgt die Anlagerung der Primer an die jeweils komplementären Abschnitte der DNA-Matrize, wodurch der Startbereich für die DNA Polymerase definiert wird.

3. Elongation – ausgehend vom 3'-Ende des Primers synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72°C anhand des Templates einen neuen komplementären DNA-Strang.
4. Wiederholung von Schritt 2 bis 4 für 35-40 Zyklen
5. Schritt: 72°C Endelongation
6. 4°C Ende des Prozesse

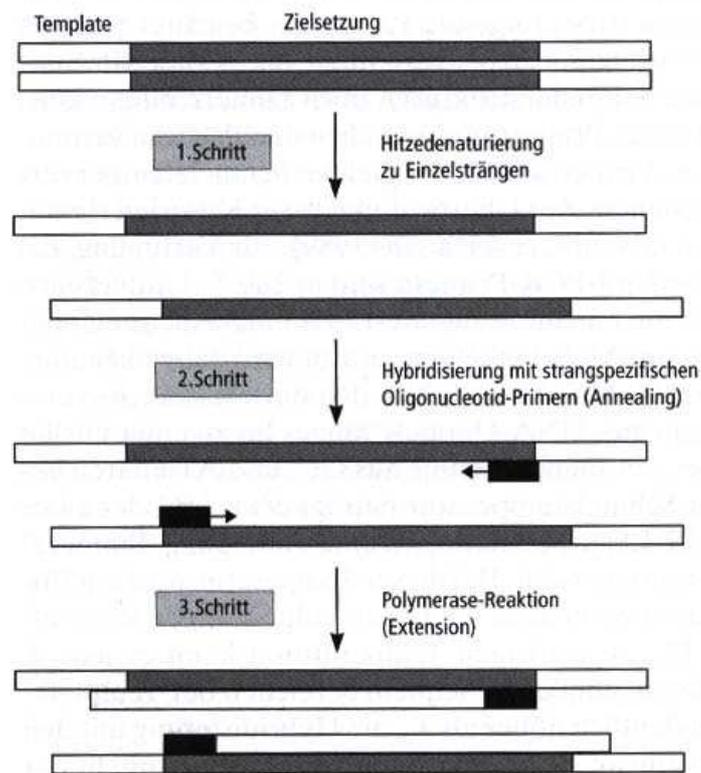


Abbildung 11: Schematische Darstellung des PCR-Ablaufs²⁷

4.12. Analytische PCR zur Bestimmung des leichten und schweren Kette des Immunglobulines
 Jede der malignen B-Zellen enthält in ihrem Genom die für die Immunglobulin-Leicht- und Schwereketten des B-Zell Rezeptors kodierende Sequenz, ein sog. VDJ-Segment. Wir haben die variable Domäne der Immunglobulinleicht- und Schwereketten des B-Zell Rezeptors charakterisiert, um Fab-Fragmente herzustellen.

Die analytische PCR wurde nach dem Protokoll von van Dongen durchgeführt⁴⁰. In dieser PCR wurde eine Mischung von allen bekannten Primern benutzt, die für die unterschiedlichen Familien von VH- bzw. VK/VL-Segmenten spezifisch sind.

Für die Amplifikationen wurden folgende Primer eingesetzt:

VH:

- VH1-FR2: ctgggtgcgacaggccccctggacaa
 - VH2-FR2: tggatccgtcagccccaggggaagg
 - VH3-FR2: ggtccgccaggctccagggaa
 - VH4-FR2: tggatccgccagccccaggggaagg
 - VH5-FR2: ggggtgcgccagatgcccgggaaagg
 - VH6-FR2: tggatcaggcagtccccatcgagag
 - VH7-FR2: ttgggtgcgacaggccccctggacaa
-
- JH consensus: cttacctgaggagacggtgacc

VK:

- VK1/6 : tcaaggttcagcggcagtggatctg
 - VK2 : ggctccatctcctgcaggtctagtc
 - VK3 : cccaggctcctcatctatgatgcattc
 - VK4 : caactgcaagtccagccagagtgtttt
 - VK5 : cctgcaaagccagccaagacattgat
 - VK7 : gaccgatttcaccctcacaattaatcc
-
- JK1-4 : cttacgtttgatctccaccttggtccc
 - JK5 : cttagctttaatctccagtcgtgtccc

Der Ansatz war laut Protokoll folgendermassen:

50µl Ansatz, 10 µmol Primer, 1,5 mM Mg²⁺, 5 µl 10xAbi-Puffer#2, 1 U AmpliTag Gold. (Enzym und Puffer: Applied Biosystems (Darmstadt)).

PCR-Bedingungen:

7' 95°C
30'' 95°C |
30'' 60°C |35 Zyklen
30'' 72°C |
10' 72°

Die Produkte dieser analytischen PCR werden zur Bestimmung der genauen Subtypen der VH und VK/VL sequenziert.

Aus dem Ergebnis dieser Sequenzierungen werden Primer abgeleitet, die in der weiteren spezifischen PCR 1) Restriktionsschnittstellen einführen und 2) an den vom Expressionsvektor pCES vorgegebenen Leserahmen adaptieren.

4.13. Spezifische PCR zur Klonierung In den Expressionsvektor pCES

Diese PCR dient zur Adaption der amplifizierten Fragmente der VH/VK/VL-Regionen an den Expressionsvektor pCES.

In der spezifischen PCR haben wir für die Schwerkette (in unserem Falle VH4-59) folgende Primer benutzt:

VH:

- VH4-59-NcoI ccatggcccaggtgcagctgcaggagtgcg
- JH4-02-BstEII-as ctcgagtgaggagacggtgaccaggg

Zur Amplifikation der Leichtkette (in unserem Falle VK1-39) wurden folgende Primer benutzt:

VK:

- VK1-39-ApaLI-s agtgcacaggacatccagatgaccagtct
- JK1-01-XhoI-as ggatcctttgatctcgagcttggtcccttgcc

Es wurde nach dem Protokoll wie bei der analytischen PCR vorgegangen.

4.14. Klonierung von PCR- Produkten

Die in der PCR amplifizierten Produkte (in unserem Falle VH4-59 und VK1-39) wurden zur besseren Handhabung in den TOPO-TA-Vektor zwischenkloniert. Dazu wurden 0,5 µl TOPO-Vektor zu 0,2 µl PCR-Produkt pipettiert und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die PCR-Produkte haben an ihren 3'-Enden Adenosin-Überhänge, weil die Taq-Polymerase eine vom Template unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, die einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR Produktes anhängt. Der linealisierte TOPO-TA-Vektor besitzt dafür 3' dazu komplementäre einzelne Deoxythymidinüberhänge, die es ermöglichen, die PCR-Produkte ohne vorherigen Restriktionsenzymverdau in den TOPO-TA-Vektor einzubringen. Die dazu benötigte Energie wird von einer energiereichen Tyrosinbindung geliefert. Diese energiereiche Tyrosinbindung stammt von der Spaltung des DNA-Phosphodiesterückgrads durch die Topoisomerase I des Vaccinia Virus (Schumann, 1994). Das entstandene Plasmid wurde in DH5α E.coli Bakterien transformiert.

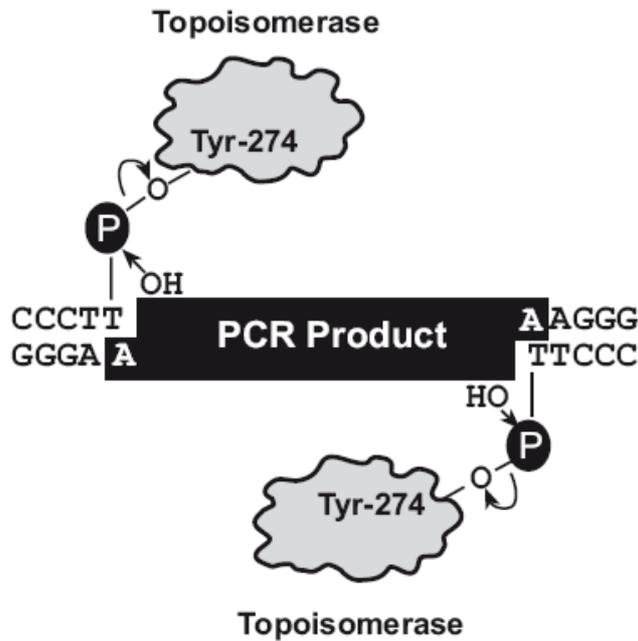


Abbildung 12: Modell des TOPO-TA-Vektors (TOPO TA Cloning Manual 2006)

Es wurde das TOPO-Klonierungs-Kit der Firma Invitrogen, Karlsruhe benutzt, und es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

4.15. Transformation kompetenter Bakterien und selektive Vermehrung der transformierten Bakterienklone

Als Transformation wird eine Genübertragung durch freie DNA auf Bakterienzellen bezeichnet, die anschließend diese DNA replizieren. Die Transformation wird nach Sambrook et al(1989) durchgeführt. E.coli Bakterien, die mit kaltem Kalziumchlorid behandelt und anschließend kurz erwärmt werden, sind in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen (Cohen and Chang 1973). Auf diese Weise können Plasmide zur Expression in prokaryontische Zellen aufgenommen werden oder durch Expansion des entsprechenden Bakterienklons in großen Mengen hergestellt werden. Wir haben chemisch kompetent gemachte DH5 α Bakterien unseres Hauses benutzt. Es wurden zu 100 μ l kompetenten DH5 α Bakterien je 5 μ l des Ligationsproduktes hinzupipettiert und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein 45 Sekunden dauernder Hitzeschock bei 42°C durchgeführt, wodurch die Membran der E.coli durchlässig wird und die Transformationseffizienz positiv beeinflusst wird. Nach einer weiteren einminütigen Inkubation auf Eis wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten DH5 α - (bzw. TG-1) E.coli Bakterien werden ursprünglich durch Ampicillin und Kanamycin in ihrem Wachstum gehemmt, so dass ihnen gegenüber die transformierten Bakterien mit Antibiotikaresistenzgenen einen Wachstumsvorteil haben. Es wurden isoliert wachsende Bakterienkolonien gepickt und dann über Nacht, schüttelnd, bei 37°C in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz inkubiert. Die

rekombinante Plasmid-DNA hat eine vom Zellzyklus unabhängige, sehr hohe Replikationsrate, wodurch große Menge an rekombinanter DNA hergestellt werden können.

In einer folgenden Mini-Plasmidpräparation mit anschließendem Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese wurde die Reinheit der Kultur und der Erfolg der Transformation überprüft werden.

4.16. Minipräparation von Plasmid-DNA mit der TENS-Methode

Um eine korrekt abgelaufene Transformation zu überprüfen, wird eine sogenannte Minipräparation von Plasmiden durchgeführt werden. Die Plasmid-Präparation dient dazu, die zirkulär geschlossenen Plasmid-DNA von chromosomaler supercoiled DNA und RNA der Bakterien zu isolieren.

Bei der TENS-Mini-Präparation handelt es sich um eine schnelle Methode, allerdings weist die erhaltene Plasmid-DNA nur eine geringe Reinheit auf, so dass dieses Verfahren nur für analytische Zwecke eingesetzt werden kann.

Es wurden 1,5 ml der Bakterienkultur, die über Nacht gewachsen war, entnommen und 20 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50-100 µl abpipettiert. Danach wurden 100 µl P1-Puffer + RNA-ase zugegeben und der Ansatz wurde mittels Vortex vermischt. Nach Zugabe von 300 µl TENS-Puffer wurde erneut ca. 5 Sekunden lang mit dem Vortex gemischt. Daraufhin wurden 150 µl 3 M NaOAc mit einem pH Wert von 5,2 zugegeben, wodurch Proteine, genomische DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert wurden. In einem nächsten Schritt wurde für 5 Sekunden gevortext und anschließend 10 Minuten lang bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 1 ml eiskaltem 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, indem es 3 Minuten bei 13.000 rpm (Zentrifugalkraft 16100 g) zentrifugiert wurde. Ethanol wurde abgegossen, und das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl Aqua dest. resuspendiert. In einem anschließenden Restriktionsabbau mit folgender DNA-Gelelektrophorese wurde dann die Präparation überprüft.

4.17. Restriktionsenzymverdau von DNA-Konstrukten

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die für den Schutz der Bakterien vor Fremd-DNA sorgen. Sie erkennen spezifisch 4-8bp lange Palindrome, d.h. Sequenzen, die in Sense- und Antisense- Richtung gelesen gleich sind. Die erzeugten Schnittenden können entweder glatt (blunt) oder überlappend (sticky) sein. Wir haben Restriktionsenzyme für die Klonierung der VH- und VK-Segmente in die entsprechenden Stellen der Schwer- und Leichtkettensequenzen des pCES-Vektors kloniert. Die Inserts und die Vektoren wurden mit den gleichen

Restriktionsenzymen verdaut und dann ligiert. Desweiteren haben wir die Restriktionsenzyme zu Insertionskontrollen eingesetzt. Je nach Länge der entstandenen Restriktionsfragmente konnten wir Rückschlüsse über eine erfolgreiche Klonierung eines Inserts in ein Plasmid ziehen.

Der Restriktionsenzymverdau der Konstrukte ermöglicht auch eine Kontrolle der Aufnahme des Inserts in den Vektor. Dazu werden Restriktionsenzyme verwendet, die jeweils nur einmal auf beiden Seiten des Inserts in der MCS (multiple cloning site) des Plasmids, in die das Insert inkloniert wurde, schneiden. Man erhält auf diese Weise, sofern keine interne Schnittstelle im Insert vorliegt, beim Auftragen auf ein Agarosegel eine Bande, die dem Plasmid – in diesem Fall dem TOPO-Vektor - entspricht und eine zweite, die das Insert darstellt. Eine Längenbestimmung der Fragmente erfolgt über einen mitlaufenden Längenmarker.

Wenn das Insert interne Schnittstellen enthält, so dass man ein, zwei oder mehrere Insertfragmente erhält, entspricht die Insertlänge der Summe der einzelnen Fragmente. Zur Durchführung eines Verdau wurde in einem geeigneten Volumen (20-50 ml) die zu verdauende Menge DNA mit dem zum Restriktionsenzym passenden Puffer angesetzt. Nach Zusatz der Restriktionsenzyme erfolgte dann der Verdau bei 37°C für 1,5 - 2,5 Stunden (je nach DNA-Menge). Die optimale Funktionsfähigkeit des Restriktionsenzym wurde bei einer Konzentration von 1-2 U Enzym pro mg DNA erreicht. Zum Verdau der TOPO-Klone wurde das Restriktionsenzym EcoRI verwendet. Der Restriktionsenzymverdau wurde mittels DNA-Gelelektrophorese kontrolliert.

4.18. DNA-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Durch Zugabe des interkalierenden Ethidiumbromids wird DNA unter UV-Licht sichtbar. DNA-Fragmentgrößen können mithilfe eines mitlaufenden DNA-Längenmarkers relativ genau bestimmt werden.

Für DNA-Gele wurde 1xTAE-Puffer mit 2% Agarose gekocht, nach Abkühlung auf etwa 60°C mit 0,05% Ethidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Nach Abkühlung und Aushärtung wurde das Gel in eine mit TAE- Elektrophoresepuffer gefüllte Gelkammer gegossen. Die Proben wurden in die Ladetaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 30 Minuten. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und mit einem Printer zur Dokumentation fotografiert.

4.19. Präparationsgele

Zur Isolierung relevanter DNA-Gelbanden mit DNA aus Agarosegelen wurden frisch gereinigte Elektrophoresekammern und frische TAE-Elektrophoreselaufpuffer verwendet. Die relevanten Gelbanden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Es war aber wichtig, die

Gelbanden nur so kurz wie möglich UV-Licht auszusetzen und das Gel auf eine Folie zu legen, um das Mutations- und Kontaminationsrisiko zu minimieren. Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden dann mit dem „Gel Band Purifikation Kit“ (Zymo, USA) aufgereinigt.

4.20. Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA wurde mit dem Photometer nach dessen Kalibrierung mit Aqua destillata bestimmt. Die DNA wurde mit Aqua destillata in einem Verhältnis 1:50 verdünnt, und dann wurde in einer Quarzküvette die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde das Photometer mit PBS oder Lysispuffer kalibriert, und danach wurden die Proben in einer 1:50 Verdünnung ausgewertet.

4.21. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde kommerziell von Labor Thieme in Kaiserslautern durchgeführt.

4.22. Analyse der Immunglobulinensequenzen

Zur Analyse der variablen-Immunglobulinen-Segmente haben wir die Datenbanken ImMunoGeneTics (IMGT) System (<http://imgt.org>) benutzt.

4.23. Ligation in den pCES-Vektor

Zur Expression des BCR wurde der E.coli Expressionsvektor pCES benutzt.⁴¹

Nach korrekter Einklonierung der VH und VL in die entsprechenden Positionen der schweren und leichten Ketten produziert dieser Vektor eine vollständige humane κ -Leichtkette sowie eine verkürzte humane Schwerekette (nur CH1). Im Periplasma bildet sich daraus ein funktionelles Fab-Fragment.

In der Abb.13 ist die pCES-1-Vektorkarte vor Klonierung der VH und VL gezeigt.

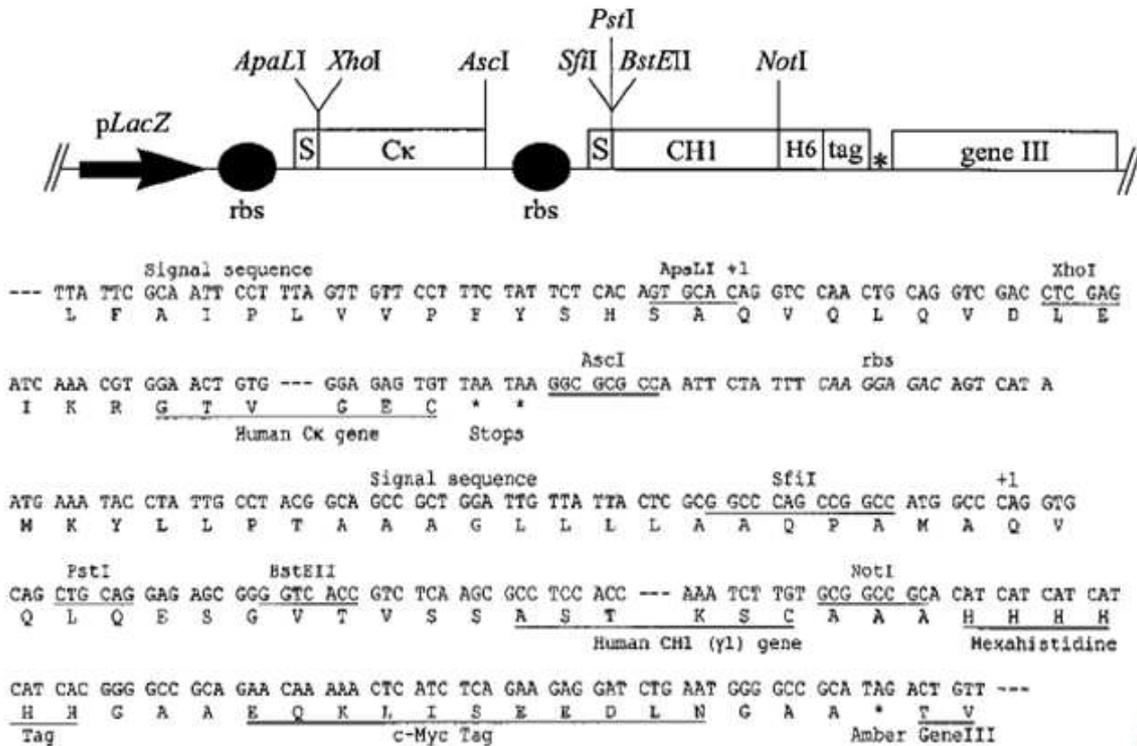


Abbildung 13: Struktur des pCES-1 Vektors vor Klonierung der VH und VL. pLacZ: LacZPromotor, rbs: Ribosomenbindungsstelle (ribosomal binding site); S: Signalsequenz; His6: Hexa-Histidin-tag; myc: c-myc-tag; CH: konstante Region der Schwerkette; ApaLI, XhoI, AscI, SfiI, BstEII, NotI und EcoRI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Das Stop codon (*) zwischen den Antikörpergenen und dem Gen III ermöglicht die Produktion löslicher Fab-Fragmente durch E.coli. Die Expression des bizistronisches Operons ist unter der Kontrolle des LacZ Promotors (pLacZ).

4.24. Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase ist in der Lage, DNA-Moleküle mit Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl und 5'-Phosphat -Enden der DNA zu ligieren (Richardson et al.1968). Auf diesem Weg können die über Restriktionsenzyme erzeugten kompatiblen Enden so miteinander verknüpft werden, dass die gezielte Herstellung von DNA-Konstrukten möglich ist. Zur Ligation pipettiert man folgenden Ansatz:

- 2 µg geschnittene Vektor-DNA
- 4 µg geschnittene Insert-DNA
- 1 µl T4 Ligase 10xPuffer
- 1 µl T4 DNA-Ligase
- ad 10 µl H₂O

Man inkubiert 12-16 h bei 14°C und kann die Ligationsprodukte dann zur Transformation kompetenter Bakterien verwenden. Nach der Ligationsreaktion erfolgte eine Transformation der kompetenten DH5α-Bakterien mit den Ligationsprodukten. Es wurden auf Eis zu je 80 µl

Bakteriensuspensionen je 20 µl der Ligationsprodukte für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C im Wärmebad durchgeführt, anschließend wurde auf Eis je 500 µl SOC-Medium hinzugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 Stunde auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert und auf LB-Agar-Schalen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Bakterienkulturen gepickt, die jeweils in 2 ml LB-Amp bei 37°C unter schütteln für 12 Stunden kultiviert wurden. Anschließend wurden mittels TENS-Methode die Plasmide-DNA aus den Bakterienzellen isoliert.

4.25. Insertionskontrolle durch Probeverdau und Sequenzierung

Die Identifikation der Plasmide, die die variablen Region VH, VL in Schwer- und Leichtkette enthielten, erfolgte mit Restriktionsenzymen. Mini-Präparationen, bei denen die Insertionskontrollen positiv waren, wurden über die Säule aufgereinigt und mit den entsprechenden Primern zur Sequenzierung gegeben. Auf diese Art und Weise wurde eine korrekte Insertion in den Vektor abgesichert, möglich neu aufgetretene Mutationen wurden aufgespürt und die Produktivität der Sequenz wurde überprüft.

4.26. Expression und Aufreinigung löslicher Fab-Fragmente

Durch Expression des pCES Konstruktes und Reinigung werden die von E.coli TG-1 Zellen produzierten Fab-Fragmente aus dem Periplasma der Bakterien isoliert. Im Periplasma wird dabei die Signalsequenz, welche den Transport der Proteine veranlasst hat, abgetrennt, und der Antikörper wird durch korrekte Faltung sowie durch Ausbilden von Disulfidbrücken voll funktionsfähig.

4.27. Expression

Aus der Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:100 eine Induktionskultur (50 µl) angesetzt. Am nächsten Tag wurden 50 µl der Übernachtskultur frisch angesetzt mit zweifacher TY mit 125 µl 40% Glucose sowie 50 µl Ampicillin. Die Kultur wurde bei 37°C zwei Stunden geschüttelt, danach erfolgte die OD Messung. Der OD Wert der Kultur soll 0,6-0,9 betragen. Wenn die Bakterien OD sich in dem erwünschten Bereich befand, wurde eine IPTG Lösung auf 2mM Endkonzentration dazugegeben. Durch Zugabe von IPTG kommt es zur Produktion und Sekretion von Fab-Antikörpern ins Periplasma der Bakterien. Danach wurde die Kultur 4 Stunden auf dem Schüttler bei 30°C induziert. Im nächsten Schritt erfolgte die Bakterienernte. Die Kultur wurde 15 Minuten bei 4.000 RPM abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet eingefroren bei -20°C. Durch das Einfrieren der Bakterien wird die Bakterienmembran löchrig und somit später das Herauslösen der Peptide aus dem Periplasma erleichtert.

4.28. Lyse und Reinigung

500 µl Lysispuffer (8M Harnstoff im Phosphatpuffer von pH-8 mit Zusatz von 1% Triton X) wurden zu dem Bakterienpellet zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde dann für 30-60 Minuten auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt erfolgte eine 30- minütige Zentrifugation bei 13.000 RPM bei 4°C. Der daraus resultierende Überstand enthielt nun die löslichen Fab-Antikörper, so dass mit der Reinigung begonnen werden konnte.

Der Überstand wurde in neue Eppis abpipetiert und das Pellet wurde verworfen.

4.29. Reinigung löslicher Fab-Antikörper nach der IMAC Methode (Immobilised Metal Ion Affinity Chromatography)

Für die Reinigung der Fab-Antikörper benutzt man den 6x Histidin-Tag, weil über diese Markierung die Fab-Antikörper an Talon-Beads gebunden werden können. Die Talon-Beads enthalten Co-Ionen, woran die freien N-Atome des Histidin binden (Chaga et al., 1999; Porath, 1992).

Es wurde weiter nach dem folgendem Protokoll vorgegangen: Zu dem Überstand wurden 20 µl TalonBeads dazugegeben, die Lösung wurde dann für 30 Minuten auf den Rolltisch im Kühlraum gestellt. Dabei kommt es zur Bindung der Fab-Antikörper mittels des Histidin-Tags an die Talon-Beads. Dann wurde die Lösung über eine Minute bei 10.000 RPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und zu dem Pellet wurden 500 µl viermolares Harnstoff dazugegeben. Dieser Schritt wurde dreifach wiederholt. Die Lösung wurde dann wieder bei einer Minute bei 10.000 RPM abzentrifugiert. Nachfolgend wurde schrittweise von 4-molarem Harnstoff auf nullmolarem Harnstoff bzw. im PBS umgepuffert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschgang in PBS, und anschließend wurde der Fab-AK in 50 µl 150 molarem Imidazol in PBS eluiert. Das Imidazol verdrängt dabei das Histidin aus der Bindung zum CO_2^+ aufgrund seiner höheren Affinität. Dies konnte man auch anhand eines Farbwechsels der Talon-Beads erkennen, die ihre Farbe von einem eher farblosen Rosa zu einem intensiven Pink veränderten. Danach wurde der AK bei 10.000 RPM über eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand enthält Fab-Antikörper. Der Überstand wurde in neue Eppis überführt und nachfolgend wurde der Antikörper in PBS dialysiert. Bei dieser Dialyse soll das enthaltene Imidazol ausgewaschen werden. Um die Reinheit der Peptide zu kontrollieren, wurde eine Auftrennung mittels SDS-PAGE (12%) und anschließend einer Coomassie-Färbung durchgeführt.

4.30. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nachdem die Fab-Fragmente hergestellt waren, haben wir ihre Integrität mittels SDS-PAGE Analyse überprüft. Die SDS-PAGE trennt Proteine nach ihrer Molekularmasse auf. Bei angelegter Spannung migrieren die Proteine umso schneller durch die Maschen des Netzes, desto kleiner sie sind. Auf diese Weise werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Polymerisation der Acrylamidmonomere wird durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („Stacking Gel“) und Auftrennung anschließend im unteren Gelabschnitt (Separationsgel) erhöht dabei die Auflösung der Gele (King et al., 1971).

Die Analyse der Fabs wurde mit einem 12%iges Trenngel durchgeführt, dazu wurden 5 µl Antikörper und 5 µl Ladepuffer gemischt. Die Antikörper wurden auf 2 verschiedene Arten verarbeitet:

- 1) reduzierend: Zugabe von Ladepuffer mit Mercaptoethanol, anschließend 5 Min. bei 95°C
- 2) somit zur Trennung von Leicht- und Schwereketten des Fab-Antikörpers. Im SDS-Gel erkennt man dies daran, dass der Fab-Antikörper mit intakter Disulfidbrücke bei ca. 48 kDa, die Leicht- und Schwereketten bei ca. 22-25 kDa detektiert werden.
- 3) nicht reduzierend: Zugabe von Ladepuffer

Durch das im reduzierenden Ladepuffer enthaltene β-Mercaptoethanol kommt es zur Aufspaltung der Disulfidbrücke und bei ca. 48 kDa, die Leicht- und Schwereketten bei ca. 22-25

Zur Durchführung wurden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, und mit den denaturierten Proteinen (5 min/100°C) geladen. Die anschließende Elektrophorese wurde unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) bei 20 mA durchgeführt.

- 3 ml Ansatz für 2 Sammelgele (stacking gel)

Tabelle 3: Sammelgelansatz

	stacking gel
H ₂ O	2,1 ml
30% Acrylamide	0,5 ml
1,9% M Tris (pH 6.8)	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

- 10 ml Ansatz für 2 Trenngele (resolving, separation gel)

Tabelle 4 Separationsgelansatz

	12%
H ₂ O	3,3 ml
30% Acrylamide	4 ml
1,5% M Tris (pH 8.8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Die Proteingele wurden anschließend entweder geblottet oder mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt.

4.31. Elektrophorese

Zur Elektrophorese wurde für etwa 45 bis 60 Minuten eine Spannung von 100-200 V in einer vertikalen Elektrophoresekammer in Lämmli-Puffer angelegt (Biometra, Göttingen).

4.32. Coomassie-Gelfärbung

Die SDS-Gele wurden für ca. 2 Stunden mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Anschließend wurde mit Entfärbelösung inkubiert, um den Hintergrund zu minimieren. Die Coomassie-Färbung kann Proteinbandstärken ab etwa 500 ng nachweisen.

4.33. Western Blot

Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern. Die zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dies erfolgt im sog. Semi-Dry-Verfahren. Dabei bleibt das sich bei der Auftrennung ergebende Proteinmuster erhalten und es entsteht eine Kopie des Gels. Die Proteine werden auf der Membran immobilisiert, indem sie bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkung an die Membran binden. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Die für den Proteintransfer eingesetzte Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF Membran, Immobilon-P Membran) wurde vor Beginn des Proteintransfers für 15 Sekunden in 100% Methanol eingeweicht, anschließend 2 Minuten in H₂O dest. gelegt und im letzten Schritt für mindestens 10 Minuten in einen Transfer-Puffer gegeben.

4.34. Kontroll-Färbung mit Ponceau-S Rot

Nachdem der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran abgeschlossen war, wurde mit Ponceau-Lösung angefärbt. Hierbei war die „Gesichtsseite“ der Blots nach oben gerichtet. Die prominenten Größenmarkerbanden wurden markiert und die Membran beschriftet. Der Ponceau-S-Farbstoff wurde anschließend mit a.dest ausgewaschen.

4.35. Trocknen der Membran

PVDF-Membran wurde für 15 Sekunden in 100% Methanol gelegt und anschließend wurde sie 15 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Um freie Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde die Membran mit 10% Milch-TBS inkubiert.

4.36. Überprüfung der Spezifität des B-Zell-Rezeptors im ELISA

Die Spezifität des B-Zell-Rezeptors wurde im ELISA überprüft. Es wurden rekombinant hergestellte und gereinigte Fab-Antikörper benutzt. Als Kontrolle wurde ein B-Zell-Rezeptor von einem Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie mit FAM32A Protein Spezifität benutzt. Es wurde nach dem ELISA-Protokoll vorgegangen; wobei der anti-human-IgG durch einen anti-human-Fab ersetzt wurde.

5. Ergebnisse

5.1. Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine bei japanischen Patienten mit IgA-, IgD- und IgG-MGUS/MM

Wegen der niedrigen Prävalenz von MGUS und MM bei Asiaten haben wir die Paratarg-7-Spezifität bei japanischen MGUS/MM Patienten sowie die Trägerschaft der hyperphosphorylierter Paratarg-7 Form bei gesunden japanischen Spendern untersucht.

Wir haben 389 japanische Proben untersucht. Es wurden insgesamt 111 Blutproben von japanischen Patienten mit MM/MGUS untersucht (100 MM, 11 MGUS Blutproben). In 5 der 111 Serumproben (4,5%) konnte ein Paratarg-7-spezifisches Paraprotein nachgewiesen werden. Das ist weniger als in der deutschen Population-13,9% (35/252).

Tabelle 5: Patientenpopulationen, Krankheitsentitäten und Anzahl untersuchten Proben

Japanische Patienten	111
MM	100/111
MGUS	11/111
Gesunde Spender	278
Total	389

Bei den 5 positiven japanischen Serumproben handelte es sich um Patienten mit Multiplen Myelom. Es wurde eine Klassenanalyse der fünf P-7 positiven Paraproteine durchgeführt. Eines dieser Paraproteine gehörte zur Klasse IgA, die vier anderen zu der Klasse IgG. Alle P-7 spezifischen IgG-Paraproteine gehörten zur Subklasse IgG3 bei den japanischen (4/38-10,5%) sowie bei den deutschen Patienten (24/57-42,1%).

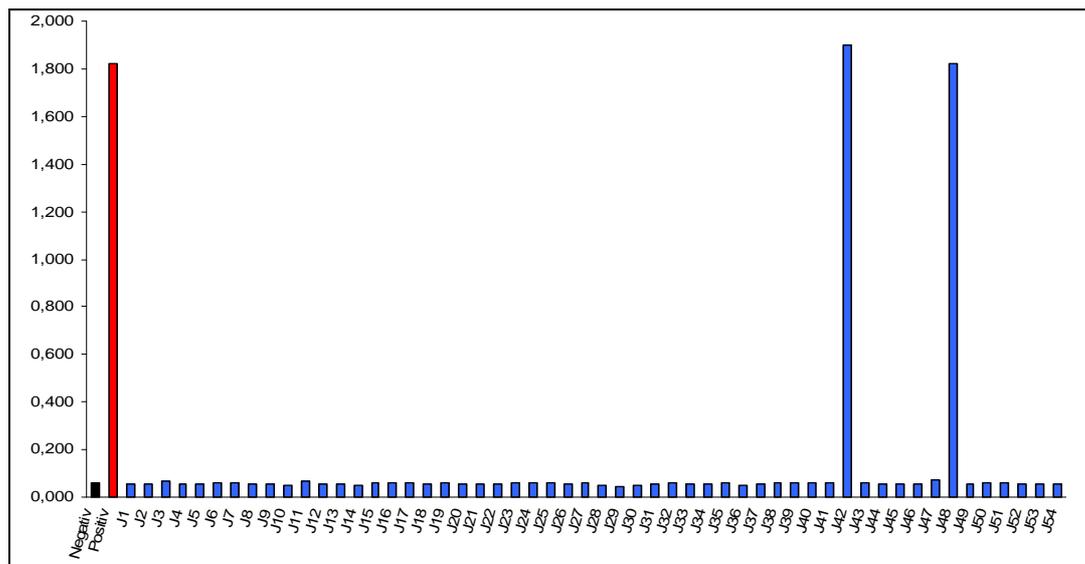


Abbildung 18: Beispiel-ELISA mit 54 Serumproben von japanischen Patienten mit MM/MGUS auf Paratarg-7 spezifisches Paraprotein. Zwei von 54 Proben reagieren positiv mit Paratarg-7.

Tabelle 6: Ergebnisse des ELISA bei den japanischen und den deutschen MM/ MGUS Patienten.

	MGUS (%)	MM(%)	Total (%)
Japanische Patienten			
IgA	0/3 (0)	1/22 (4,5)	1/25
IgD	0/0 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)
IgG	0/8 (0)	4/70 (5,3)*	4/78 (5,1)*
Total	0/11 (0)	5/100 (5,0)	5/111 (4,5)
Deutsche Patienten			
IaA	2/24 (8,3)	4/21 (19)	6/45 (13,3)
IgD	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
IgG(14,0)*	15/117 (12,8)*	14/90 (15,5)*	29/207
Total (13,9)	17/141 (12,1)	18/118 (16,2)	35/252

*Alle Paratarg-7 spezifische Paraproteine gehörten zur Subklasse IgG3

5.2. Prävalenz von pP-7-Trägern bei japanischen Patienten und gesunden Kontrollen

Um den Phosphorylierungsstatus des Paratargs-7 bei den japanischen MM Patienten mit einem Paratarg-7- spezifischen Paraprotein zu überprüfen, wurde eine isoelektrische Fokussierung des Erythrozytenlysates durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Patienten ein hyperphosphoryliertes Paratarg-7- Paraprotein besitzen.

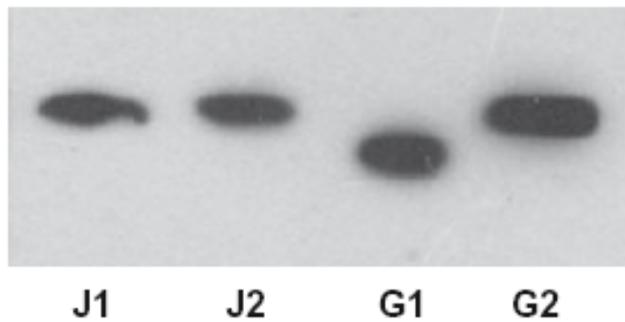


Abbildung 19: Western Blot nach Durchführung einer isoelektrischen Fokussierung von Vollblutlysaten von japanischen und deutschen MGUS/MM Patienten mit Paratarg-7 spezifischen Paraprotein. J1,J2- japanische Patienten. G1-deutscher Patient ohne P-7 Spezifität, G2- deutscher Patient mit P-7 Spezifität.

Es wurden ebenfalls 278 Proben der gesunden japanischen Spender untersucht. Das Ziel der Untersuchungen war, die Trägerschaft der hyperphosphorylierter Paratarg-7 Version in der japanischen Population im Vergleich zu der deutschen Population zu bestimmen und damit das Risiko für Entwicklung eines IgA-, IgD-, IgG-MGUS/MM in beiden ethnischen Gruppen zu erfassen. In der deutschen gesunden Population sind 2% (4/200) der Menschen Träger der pP-7 Variante. Für die besteht ein 8faches Risiko an MGUS/MM zu erkranken⁴².

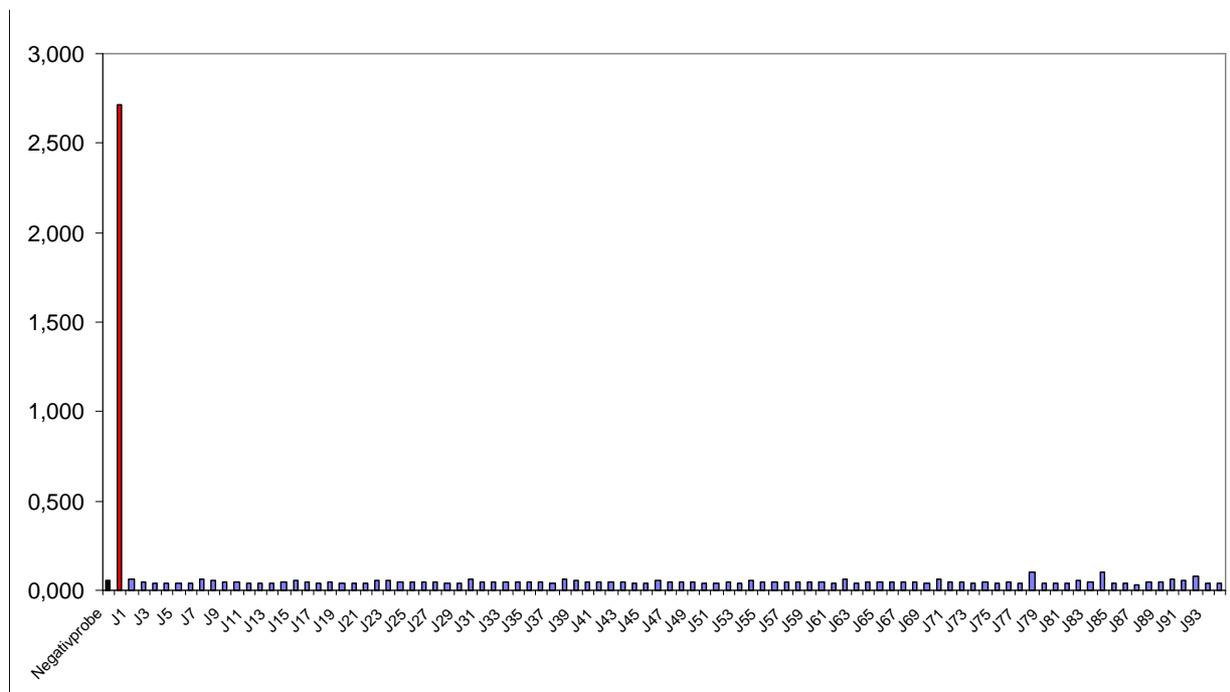


Abbildung 20: ELISA auf Paratarg 7-spezifisches Paraprotein bei 178 gesunden japanischen Probanden (Proben 1-94). Keine der Proben weist das Paratarg-7 spezifische Paraprotein nach.

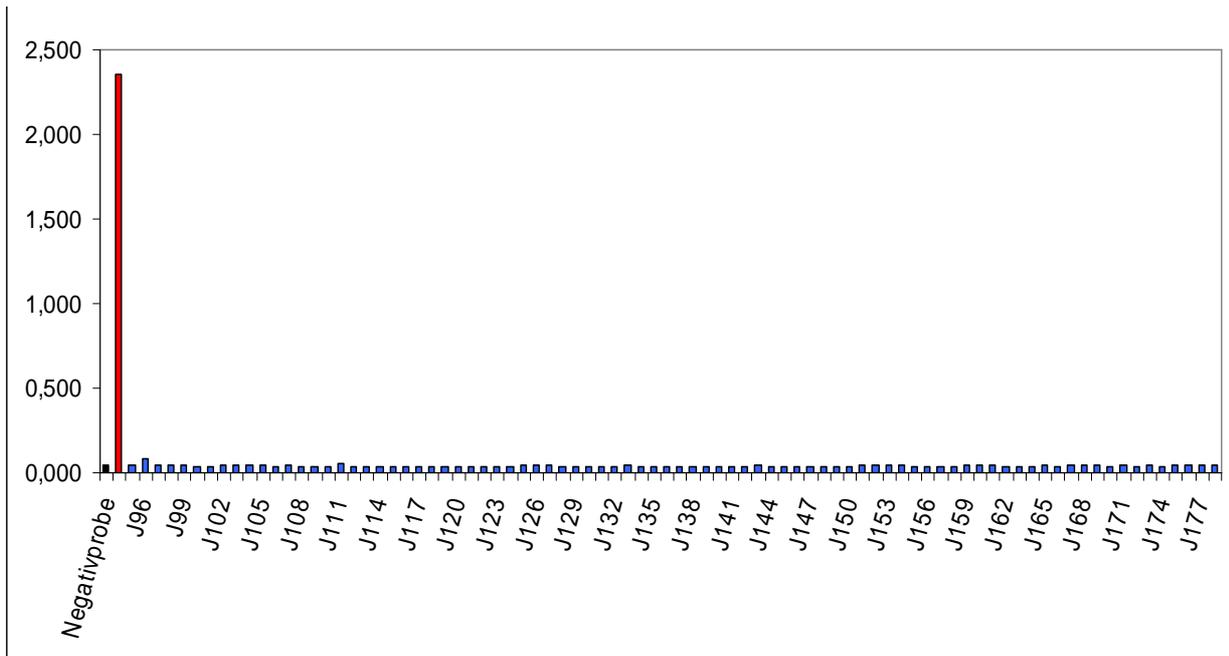


Abbildung21: Elisa auf Paratarg-7-spezifisches Paraprotein bei 178 gesunden japanischen Probanden (Proben 95-178). Keine der Proben weist das Paratarg-7 spezifische Paraprotein nach.

Im ELISA konnte kein Paraprotein in den 278 Serumproben nachgewiesen werden.

Alle 278 Proben der gesunden japanischen Spender wurden aufs Vorhandensein einer hyperphosphorylierter Paratarg-7 Variante mittels isoelektrischer Fokussierung untersucht.

Nur in einer der 278 Proben wurde hyperphosphoryliertes Paratarg-7 nachgewiesen.

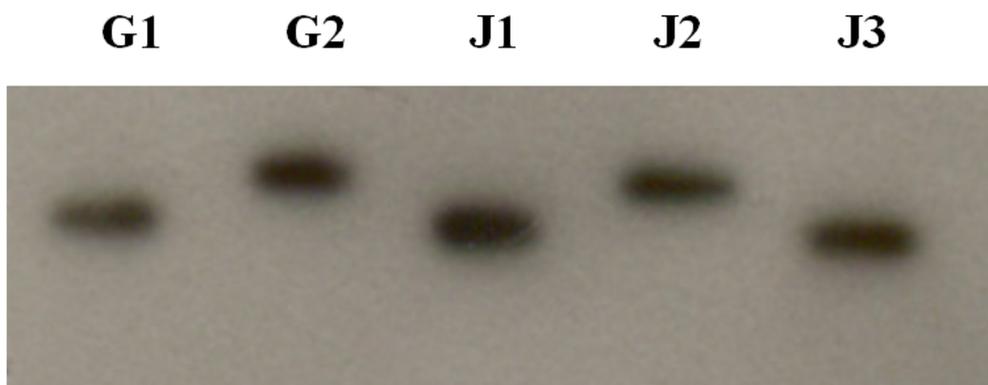


Abbildung 22: Isoelektrische Fokussierung auf Paratarg-7. **G1:** deutscher gesunder Blutspender mit nicht hyperphosphoryliertem Paratarg-7- die Bande zeigt keinen Schift. **G2:** deutscher gesunder Spender mit hyperphosphoryliertem Paratarg-7 -die Bande zeigt einen Schift. Die japanischen Proben **J1** und **J3** zeigen keinen Schift. Die Probe **J2** von einem gesunden japanischen Spender zeigt einen Schift - es handelt sich um eine hyperphosphorylierte Paratarg-7 Variante.

Damit beträgt die Prävalenz des hyperphosphorylierten Paratarg-7 Proteins in der gesunden japanischen Population 0,36% (1/278). Im Vergleich zu unseren Untersuchungen an den gesunden deutschen Spendern ist die Prävalenz von pP-7 in der gesunden deutschen Bevölkerung mit 2%

(4/200) deutlich höher ($p=0.166$). Gleichzeitig hat das relative Risiko für die gesunden deutschen pP-7 Träger, ein MM/MGUS zu entwickeln eine Odds Ratio von 7,9 (95% CI:2.8-22.6; $p<0,001$). Für die gesunden japanischen pP-7 Trägern beträgt die Odds Ratio 13.1 (95% CI:1.5-113.1; $p=0.020$). Zusammenfassend: die Prävalenz der hyperphosphorylierten pP-7 Variante ist in der japanischen Population niedriger als in der deutschen Population; japanische pP-7 Träger haben eben ein höheres Risiko an MM/MGUS zu erkranken.

5.3. Paratarg-7 als Zielantigen der Paraproteine bei IgM-MGUS sowie bei Makroglobulinämie Waldenström

Mit der Frage, ob Paratarg-7 ein Zielantigen von IgM-Paraproteinen ist, wie wir das bei IgA- sowie IgG-Paraproteinen gezeigt haben, haben wir 67 Proben von unseren IgM-MGUS/MW Patienten untersucht. Dank internationaler Kooperation mit Professor Meletios Dimopoulos und Evangelos Terpos aus Griechenland und Professor Steven Treon aus den USA wurden uns insgesamt 94 weitere Blutproben zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt 51 Proben von Patienten mit IgM-MGUS sowie 110 Proben von Patienten mit MW untersucht.

5.4. Ergebnisse der ELISA Untersuchungen von Serumproben von IgM-MGUS sowie Makroglobulinämie Waldenström Patienten auf Paratarg-7 spezifisches Paraprotein

Es wurden insgesamt 161 Serumproben der IgM-MGUS/MW Patienten untersucht. Die Paraproteine von 9 von 51 (17,6%) Proben von IgM-MGUS Patienten sowie 9 von 110 (8,2%) Proben von MW Patienten haben spezifisch mit Paratarg-7 reagiert. Damit zeigten 11,2% der untersuchten IgM-Paraproteine (18 von 161) eine Paratarg-7 Spezifität.

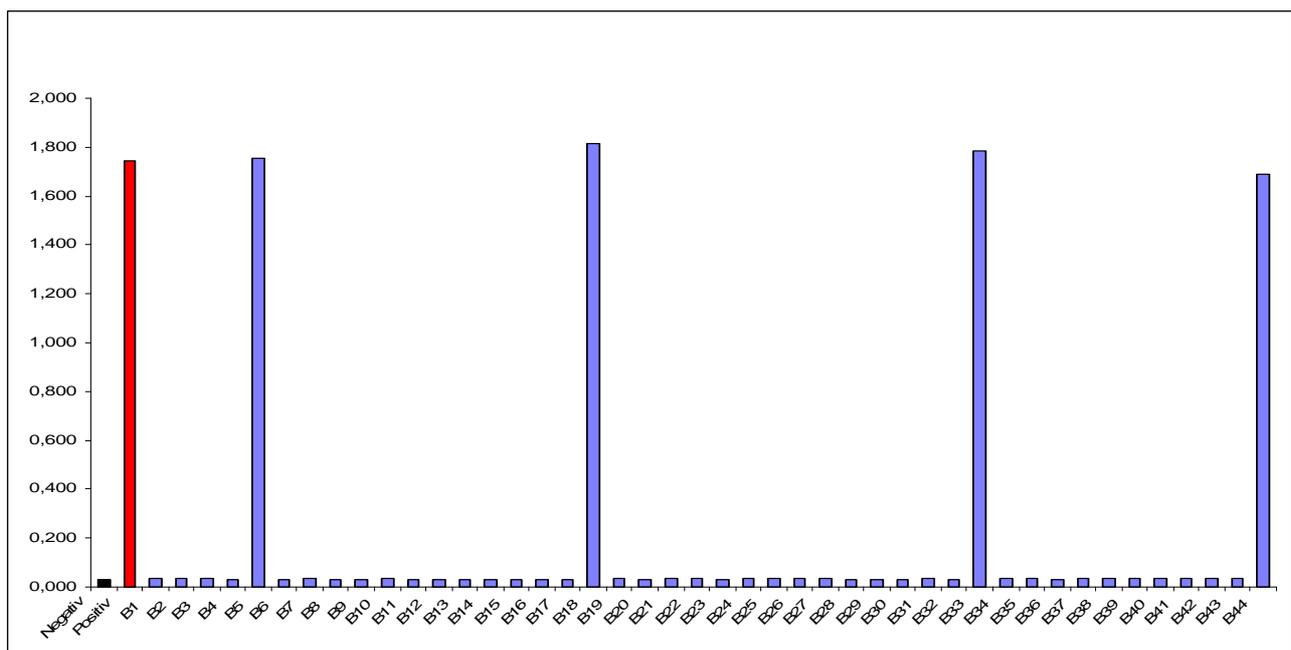
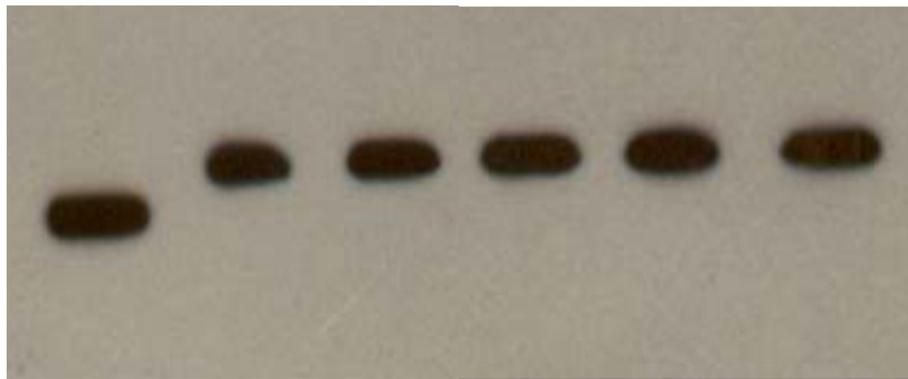


Abbildung 14: ELISA mit 44 Serumproben der MW Patienten. Vier Proben reagieren positiv mit Paratarg-7.

Um den Phosphorylierungsstatus des Paratarg-7 Proteins bei den MW Patienten, die ein Paratarg-7- spezifisches Paraprotein aufweisen, zu überprüfen, wurde eine isoelektrische Fokussierung von Erythrozytenlysaten dieser Patienten durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass alle MW Patienten, die mit P-7 positiv reagiert haben, eine zusätzliche Phosphorylierung des P-7-Zielantigens aufweisen.



neg. pos. P1 P2 P3 P4

Abbildung15: Exemplarische Darstellung des Western Blots der MW Patienten mit Paratarg-7 spezifischen Paraprotein; P1, P2, P3, P4- MW Patienten zeigen einen Shift. Neg.-Negativkontrolle, pos.-Positivkontrolle.

Alle Patienten mit Paratarg-7-spezifischem Paraprotein zeigten in der IEF einen Shift d.h. sie besitzen ein hyperphosphoryliertes Paratarg-7. Da nur 2% der gesunden Spender Träger der hyperphosphorylierten Paratarg-7 Variante sind, ist der Trägerstatus mit einem 6,5-fach erhöhten Risiko verbunden, an einem IgM-MGUS/MW zu erkranken. Die Ergebnisse der Untersuchungen der IgM-MGUS/MW Patienten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 7: Prävalenz des hyperphosphorylierten Paratarg-7 bei IgM-MGUS/MW und bei den gesunden Kontrollen

	IgM-MGUS/ MW	Kontrollen	Total
Hyperphosphoryliertes Paratarg-7	18	4	22
Nicht hyperphosphoryliertes Paratarg-7	143	196	339
Total	161	200	361

Damit konnten wir beweisen, dass Paratarg-7 ein Zielantigen nicht nur der IgA-, IgG- und IgD-MGUS/MM darstellt, sondern dass es auch bei den IgM-MGUS und MW, die biologisch gesehen andere Krankheitentitäten darstellen, als Paraprotein-Target fungiert.

Unsere Familienuntersuchungen von IgM-MGUS/MW Patienten mit Paratarg-7 Spezifität haben gezeigt, dass der Trägerstatus pP-7 auch bei IgM-Paraproteinämien autosomal dominant vererbt wird.

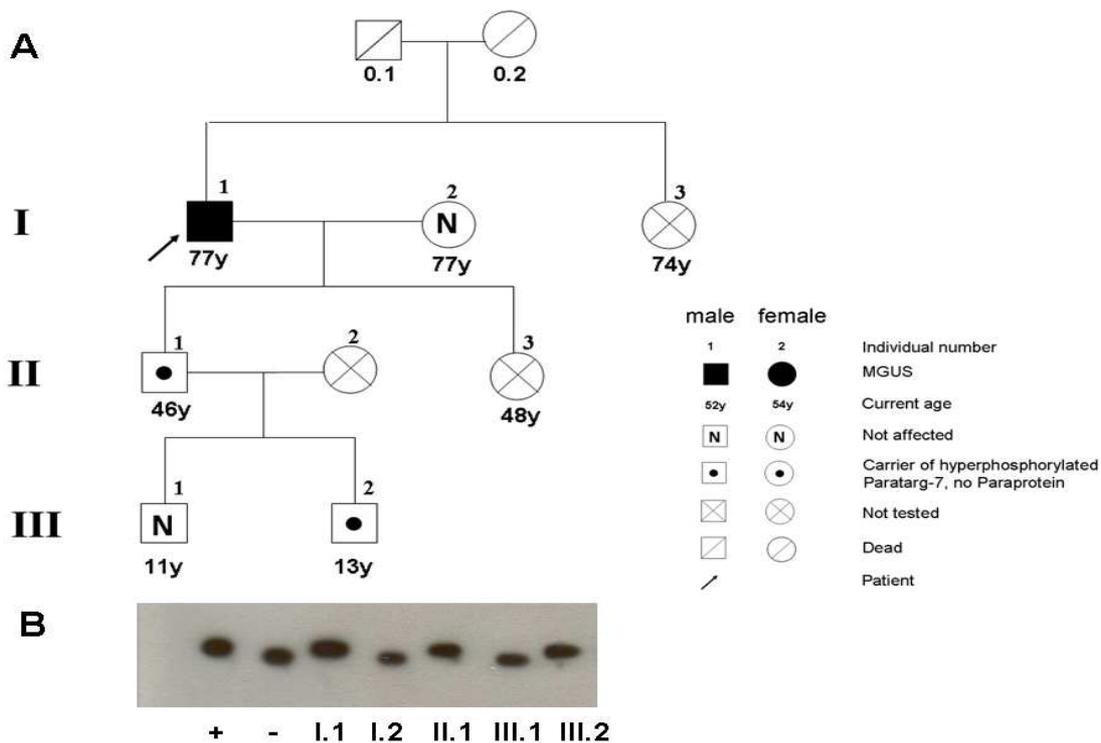


Abbildung 16: A. Familienstammbaum eines 77 Jahre alten Patienten mit IgM MGUS mit P-7 spezifischem Paraprotein. Der Patient ist Träger einer hyperphosphorylierter P-7 Form. Patient (I.1). **B. Western Blot** . Die dem jeweiligen Individuum zugeordnete IEF ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

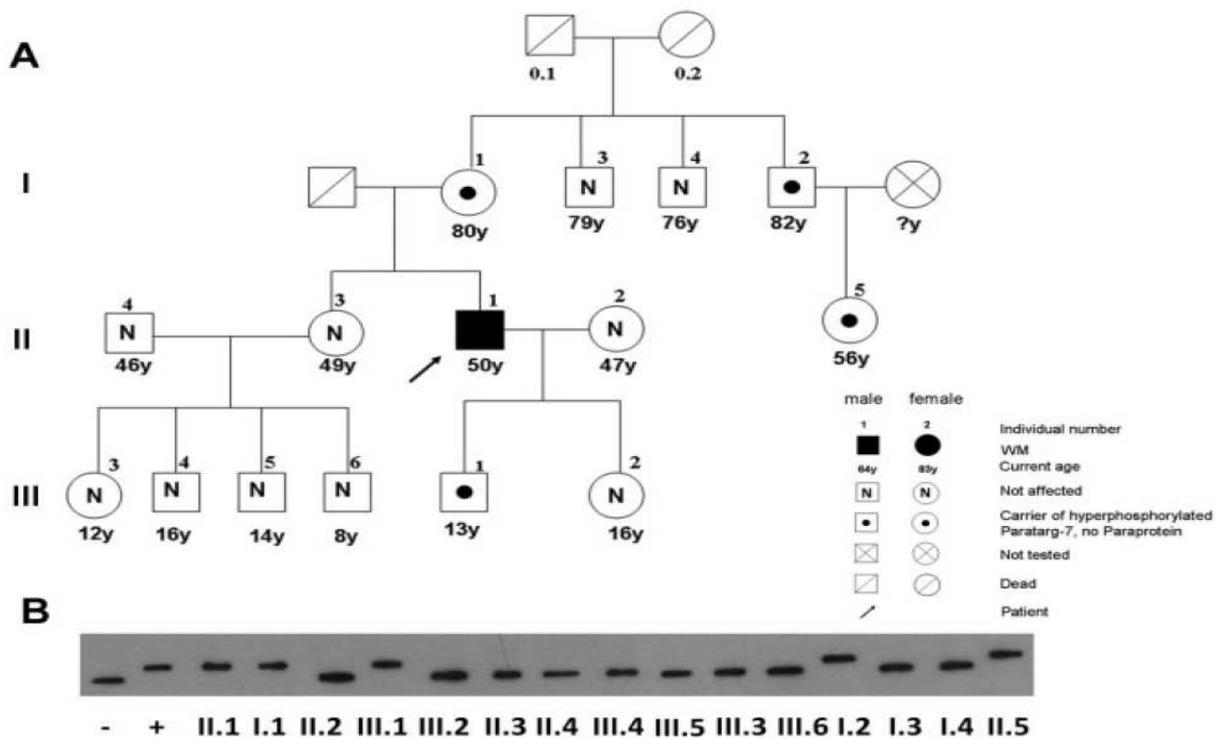


Abbildung 17: A: Autosomal dominanter Erbgang des hyperphosphorylierten Paratarg-7 in einer MW Familie. Der 50 Jahre alter Patient (II.1.) hat ein Paratarg-7 spezifisches IgM Paraprotein und ist Träger einer hyperphosphorylierten P-7 Variante. Patient (II.1). **B: Western Blot.** Die dem jeweiligen Individuum zugeordnete IEF ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen.⁴³

5.5. Klonierung des B-Zell-Rezeptors

Um nachweisen zu können, dass der B-Zell-Rezeptor der malignen Zellen die gleiche Spezifität hat wie das Paraprotein, haben wir den B-Zell-Rezeptor (BCR) eines Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström kloniert und exprimiert.

5.6. Analytische PCR auf VH bzw.VL

Die analytische PCR zur Bestimmung der VH bzw. VK/VL-Familien wurde wie beschrieben durchgeführt und die Produkte im Agarosegel analysiert (Abb. und Abb.).

Auf die Amplifikation der VL wurde verzichtet, da die diagnostische Immunfixation des Patientenserums nur das Vorhandensein von VK zeigte Abb 23.

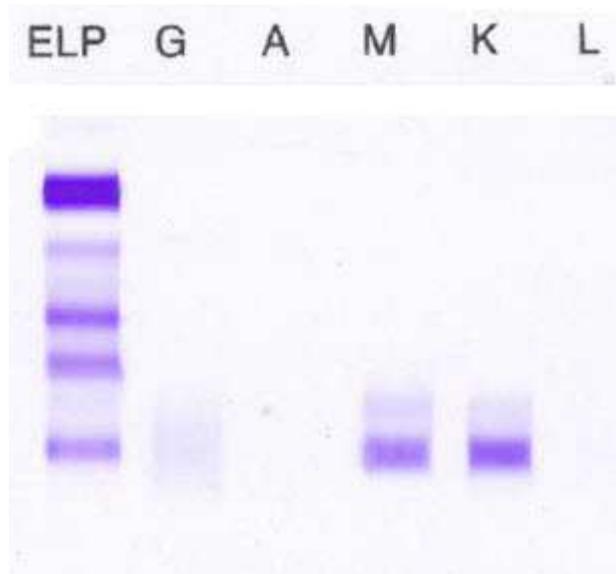


Abbildung 23: Immunfixation des Patientenserums. Die Immunfixation zeigt das Vorhandensein von monoklonalen IgM Kappa.

Die analytische PCR ergab, dass die VH der Familie VH4 und die VK der Familie VK1 angehörten.

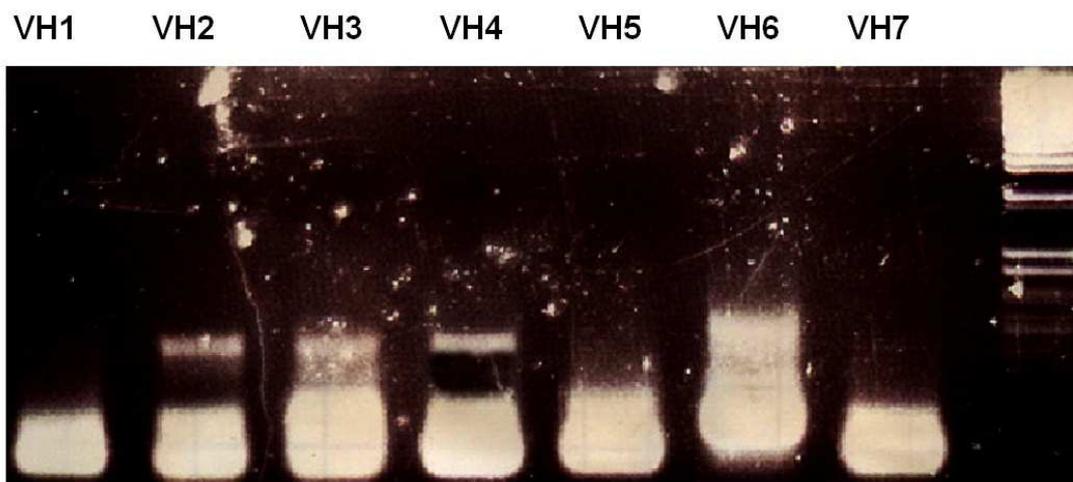


Abbildung 24: Agarosegelelektrophorese. VH PCR zur Analyse. Die VH gehört der Familie VH4. Durch die geringe DNA Menge kommt es zur Kreuzbildung der Primer, durch Sequenzierung wurde aber gezeigt, dass alle Produkte VH4-59 enthielten.

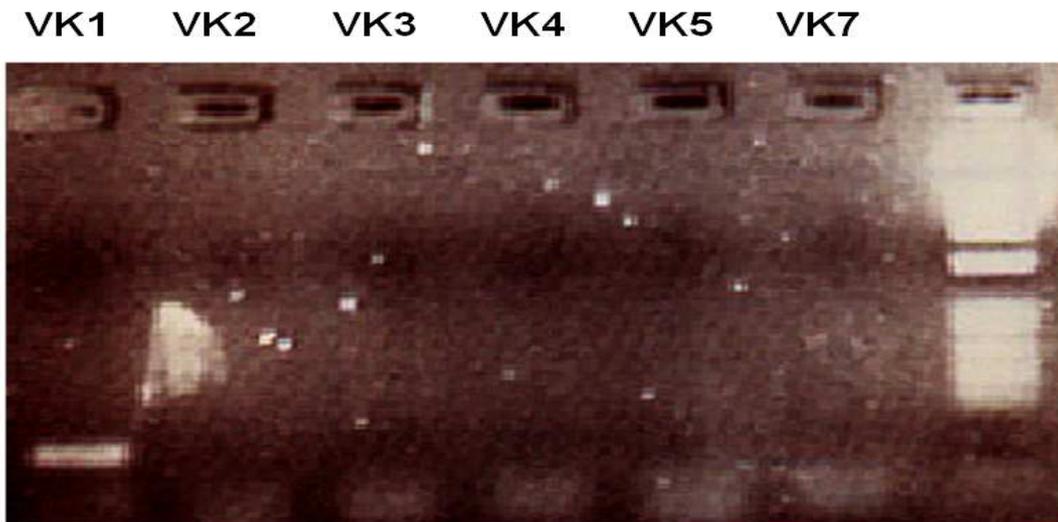


Abbildung 25: Agarosegelelektrophorese. VK PCR zur Analyse. Die VK gehört der Familie VK1.

Die beobachtete Kreuzreaktion (sichtbare Banden bei VH2, VH3, VH4) konnte durch Sequenzierung aufgeklärt werden; die Banden ergaben sich durch „Mispriming“; in allen Fällen handelte es sich um das Produkt VH4.

Zur Bestimmung der genauen Subtypen der VH und VK/VL wurden die Produkte dieser analytischen PCR zum Labor Dr. Thiele in Kaiserslautern weggeschickt.

5.7. Sequenzanalyse der VH und der VK Ketten

Die genaue Sequenzanalyse der VH und der VK Ketten ergab folgende Sequenzen:

- für die variable Region der Schwerkette VH:

```

<----- FR1 - IMGT
1           5           10           15
Patient_H._VH      Q   V   Q   L   Q   E   S   G   P           G   L   V   K   P
cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca ... gga ctg gtg aag cct

AB019438 IGHV4-59*01      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

----->
                20           25           30
Patient_H._VH      S   E   T   L   A   L   T   C   T   V   S   G   A   S   I
tcg gag acc ctg gcc ctc acc tgc act gtc tct ggt gcc tcc atc
AB019438 IGHV4-59*01      --- --- --- t- --- --- --- --- --- -g- --- ---
                               S                               G

--- CDR1 - IMGT -----<-----
                35           40           45
Patient_H._VH      ... .. . . . agt aat tac ggt tgg agc tgg atc cgg cag tcc
AB019438 IGHV4-59*01      ... .. . . . --- -g- --- tac --- --- --- --- c--
                               S   Y                               P

FR2 - IMGT -----> ----- CDR2
                50           55           60
Patient_H._VH      P   G   K   G   L   E   W   I   G   N   I   Y   D   S
cca ggg aag gga ctg gag tgg att ggg aac atc tat gac agt ...
AB019438 IGHV4-59*01      --- --- --- --- --- --- --- t-t --- --- t-- --- ...
                               Y                               Y

- IMGT -----<-----
                65           70           75
Patient_H._VH      ... .. . ggg agt agc agt tac aac cct tcc ctt agg ... agt cga
AB019438 IGHV4-59*01      ... .. . --- -c -c- -ac --- --- -c --- -c -a- ... ---
                               T   N                               K

----- FR3 - IMGT -----
                80           85           90
Patient_H._VH      V   T   I   S   I   D   T   S   K   S   Q   F   S   L   K
gtc acc ata tcg ata gac acg tcc aag agc cag ttc tcc ctg aag
AB019438 IGHV4-59*01      --- --- --- -a g- --- --- -a- --- --- --- ---
                               V                               N

-----> -----
                95           100           104
Patient_H._VH      L   K   S   V   T   A   A   D   T   A   V   Y   Y   C   A
ctg aag tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtt tat tac tgt gcg
AB019438 IGHV4-59*01      --- -gc --- --- --- -t --- --- --- -g --- --- ---
                               S

----- CDR3 - IMGT -----
Patient_H._VH      R   V   E   R   Y   S   G   G   Y   Y   G   I   V   E   Y
aga gtt gag cgc tat agt ggt gcc tac tat ggg ata gtt gag tac
AB019438 IGHV4-59*01      --- -a

W   G   R   G   T   L   V   T   V   S   S   L
Patient_H._VH      tgg gcc cgg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ctc ga
AB019438 IGHV4-59*01

```

- Für die variable Region der Leichtkette VK:

```

<----- FR1 - IMGT -----
1           5           10           15
D I Q M T Q S P S S L S A P V
gac atc cag atg acc cag tct cca tcg tcc ctg tct gct cct gtg
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--- --c --- --a t-- --a

-----> -----
           20           25           30
G D R V T I T C R A S Q N I
gga gac aga gtc acc att act tgc cgg gca agt cag aac att ...
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--- --c --- --g- --- ...

--- CDR1 - IMGT -----<-----
           35           40           45
           S N Y L N W F Q Q K
... .. agt aac tat tta aat tgg ttt caa caa aaa
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
... .. --c -g- --- --a- --g --g ---

FR2 - IMGT -----> ----- CDR2
           50           55           60
P G E A P K L L I S T A
cct ggg gaa gcc cct aaa ctc ctg atc tcc act gca ... ..
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--a --- a-- --- --g --- --at g-- --- ... ..

- IMGT -----<-----
           65           70           75
           S N L Q S G V P S R
... .. tcc aat ttg caa agt gga gtc ccg ... tca agg
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
... .. --g- --- --g --- --a ... ---

----- FR3 - IMGT -----
           80           85           90
F S G R G           S G T D F T L T
ttc agt ggc aga gga ... .. tct ggg aca gat ttc act ctc acc
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--- --t --- ... ..

-----> -----
           95           100           104
I T S L Q P G D F A T Y H C Q
atc acc agt ctg caa cct ggc gat ttt gca act tac cac tgt caa
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--- -g- --- --aa --- --- t-- ---

----- CDR3 - IMGT -----
           Q T Y S S T W T F G Q G T K L
cag act tac agt tcc acc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag ctc
Patient_H._Vk
X59315 IGKV1-39*01
--- -g- --- --a-- c-t cc

```

5.8. Spezifische PCR zur Klonierung in den Expressionsvektor pCES

Die Sequenzierung der ersten PCR ergibt die Zugehörigkeit zur jeweiligen VH-Untergruppe. Die Sequenz der spezifischen Primer zur Klonierung ergibt sich erstens aus dem Anfang der Sequenz der VH-Untergruppe, zweitens aus dem benutzten Restriktionsenzym des Vektors und drittens des Leserahmens des Vektors.

Ziel war es, nach Klonierung einen durchgehenden Leserahmen des Expressionskonstruktes zu erhalten, da nur dann das jeweilige Protein (hier schwere bzw. leichte Kette) gebildet wird. Aus diesen Überlegungen ergaben sich folgende Primer:

Beispiel:

Ableitung einer spezifischen Primersequenz am Beispiel der schweren Kette VH:

VH4-59-NcoI 5'-gcc atg gCC cag gtg cag ctg cag gag tcg-3'

Am 5'-Ende der Sequenz ist der Leserahmen des pCES-Vektors in grün dargestellt; die Restriktionsschnittstelle NcoI ist unterstrichen. Am 3'-Ende ist der Leserahmen des spezifischen VH4-59 Fragmentes in gelb dargestellt. Zur Erhaltung eines durchgehenden Leserahmens unter Beibehaltung des NcoI-Schnittstelle müssen 2 zusätzliche Nukleotide (rot, hier CC) eingefügt werden.

In der spezifischen PCR haben wir für die Schwereketten folgende Primer benutzt:

VH:

- VH4-59-NcoI ccatggcccaggtgcagctgcaggagtcg
- JH4-02-BstEII-as ctcgagtgaggagacggtgaccaggg



Abbildung 26: Agarosegelelektrophorese. Amplifikation der Schwereketten zur Klonierung. 1-Probe, 2-irrelevante Probe, 3-Leerkontrolle.

Zur Amplifikation der Leichtkette wurden folgende Primer benutzt:

VK:

- VK1-39-ApaLI-s agtgcacaggacatccagatgaccagtct
- JK1-01-XhoI-as ggatcctttgatctcgagcttggtcccttgcc

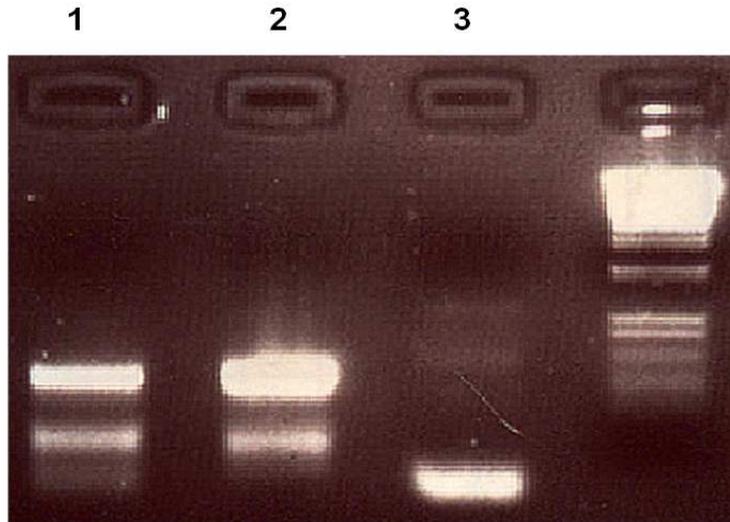


Abbildung 27: Agarosegelelektrophorese. Amplifikation der Leichtkette zur Klonierung. 1,2-Probe, 3-Leerkontrolle.

5.9. Klonierung der Produkte in den TOPO Vektor

Die Produkte der spezifischen PCR wurden zur besseren Handhabung in den TOPO-Vektor kloniert.

Um die VH und VK enthaltenden TOPO-Plasmide der Sequenzierung zuzuführen, wurden sie nach Vermehrung wieder aus den DH-5 α E.coli Bakterien mithilfe der Plasmid Mini Präparation(= TENS-Minis) Methode isoliert. Die Identifizierung der rekombinanten Klone erfolgte durch ein Restriktionsenzymverdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI. In der Agarosegelelektrophorese wurde das Vorhandensein und die Größe der Inserts kontrolliert.

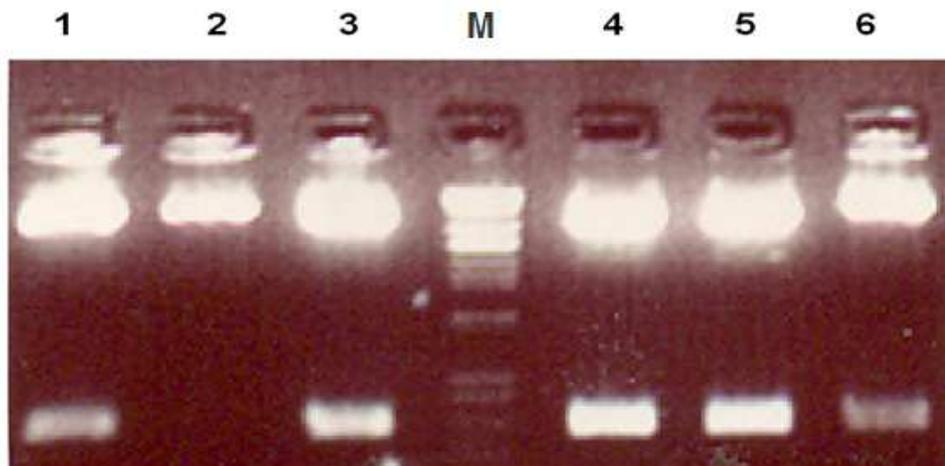


Abbildung 28: Agarosegelelektrophorese von mit EcoRI geschnittener mini-Präp DNA aus der VH TA - Klonierung. Bei der in jeder Bahn sichtbaren oberen Bande handelt es sich um den TOPO Vektor, bei der unteren um das Insert. Bahn 2- Vektor ohne Insert. M-Marker.

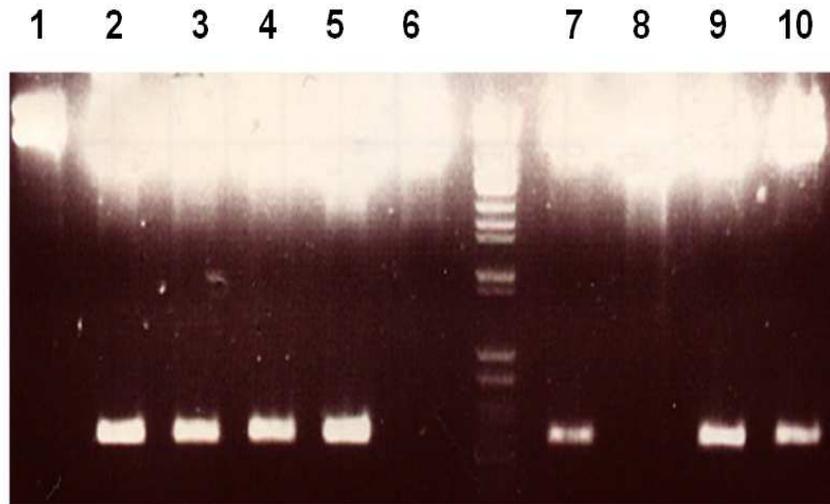


Abbildung 29: Agarosegelelektrophorese von mit EcoRI geschnittener mini-Präp DNA aus der VK TA - Klonierung. Bei der in jeder Bahn sichtbaren oberen Bande handelt es sich um den TOPO Vektor, bei der unteren um das Insert. Bahn 6 und 8-Vektor ohne Insert.

Als Nächstes wurde eine Sequenzierung der rekombinanten VH und VK Klone durchgeführt. Nachdem diese bestätigte, dass die richtigen VH- und VK-Sequenzen amplifiziert wurden, konnten die klonierten VH- und VK- Fragmente weiter untersucht werden. Im nächsten Schritt erfolgte eine Insertpräparation. Dazu wurden einige der positiven Klone ausgewählt und einem Veradu durch spezifische Restriktionsenzyme ApaLI und XhoI bzw. NcoI und BstEII unterworfen. Die VH- und VL- Fragmente wurden wieder herausgetrennt, nun aber mit spezifischen Schnittstellen versehen. Daraufhin erfolgte eine Auftrennung des Ansatzes per Gelelektrophorese, die VH- und VK- Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Danach erfolgte eine Kontrolle der Gelreinigung mittels Gelelektrophorese. Zur Aufreinigung der verdauten Vektoren wurde ein 1% Agarosegel verwendet.

5.10. Ligation in den Expressionsvektor pCES Vektor

Im nächsten Schritt wurde die Ligation der spezifischen PCR-Fragmente in den pCES Vektor durchgeführt. Einkloniert wurde in ApaLI/XhoI bzw. NcoI/ BstEI.

In der Abb. 21. ist ein Schema der Fab-Expression im pCES-1 Vektor nach Klonierung der VH und VL Kette dargestellt.

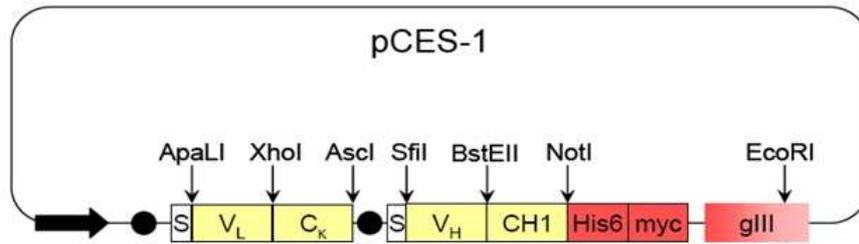


Abbildung 30: Schema der Fab-Expression im pCES-1 Vektor nach Klonierung der VH und VL Kette. VL: variable Region der Leichtkette; C_k: konstante Region der Leichtkette; VH: variable Region der Schwereketten; CH1: konstante Region der Schwereketten; ApaLI, XhoI, AscI, SfiI, BstEII, NotI und EcoRI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme, S: Signalsequenz; His6: Hexa-Histidin-tag; myc: c-myc-tag.

Als Nächstes erfolgte eine erneute Transformation der TG1 E.coli Bakterien mit nachfolgender Plasmidpräparation mittels Mini-Präparation von Plasmid-DNA, um höchste Reinheitsstufen für eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli zu erhalten, Entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers. Durch den anschließend durchgeführten Restriktionsenzymverdau mit BamHI und BgII wurde gezeigt, dass das richtige Insert im Vektor vorhanden war.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

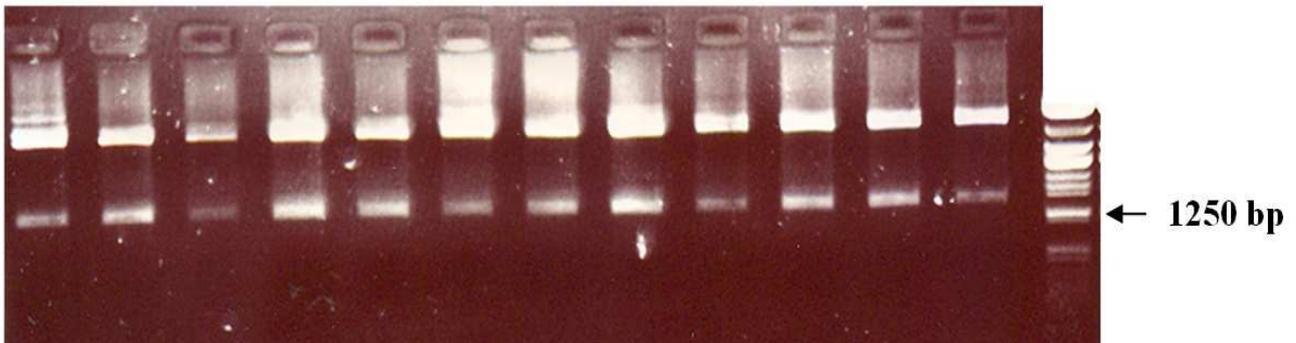


Abbildung 31: VH pCES- Klonierung. Verdau mit Bam HI. Wenn das richtige Insert vorhanden ist, wird eine Bande von 1250 bp ausgeschnitten.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

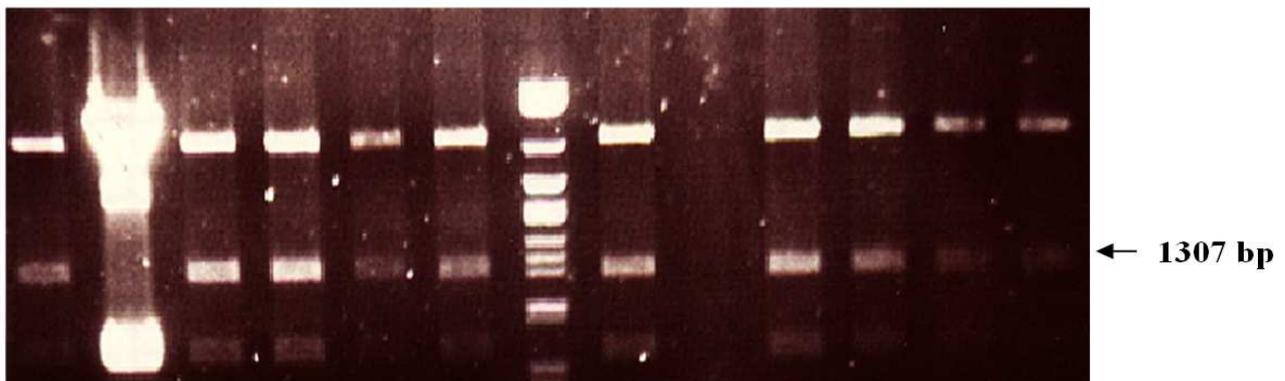


Abbildung 32: VH+ VK pCES Klonierung. Verdau mit DraI. Wenn das richtige Insert vorhanden ist, wird eine Bande von 1307 bp ausgeschnitten.

5.11. Expression und Verifizierung der rekombinanten Fab-Fragmente

Um komplette und funktionsfähige Fab-Fragmente zu erhalten, wurden die pCES- Klone in den E.coli TG-1 Bakterien exprimiert, anschließend wurde Ihre Integrität in SDS Page und Westren Blot überprüft.

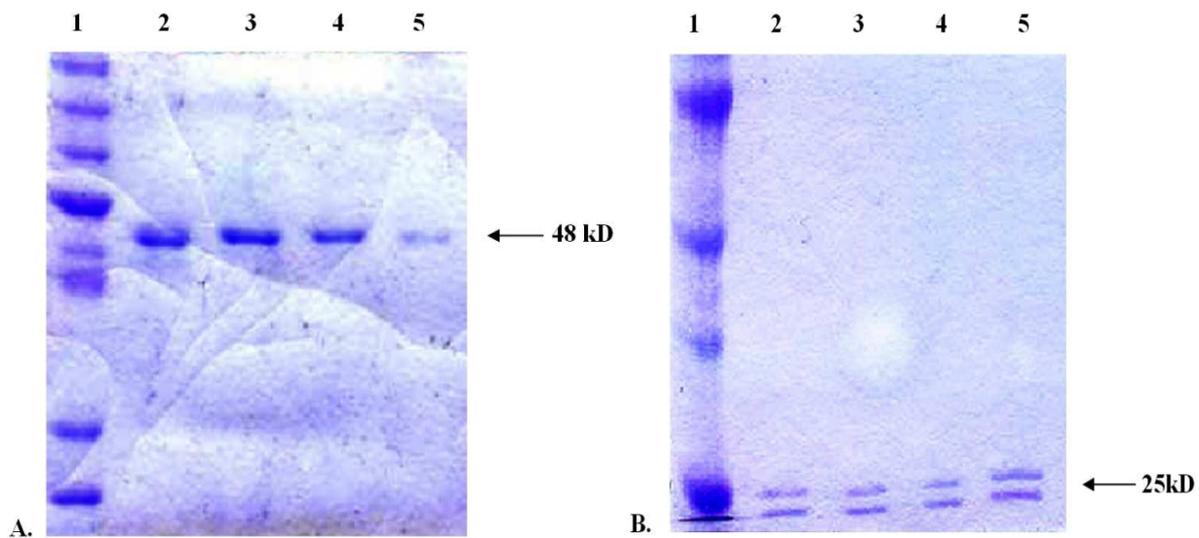


Abbildung 33: Visualisierung der Fab-Antikörper im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie. **A:** nicht reduzierendes Fab-Antikörper mit intakter Disulfidbrücke bei ca. 48 kDa, **Gel B:** reduzierendes Gel: die Leicht- und Schwereketten werden bei ca. 22-25 kDa detektiert. 1-Marker, 2,3,4,5- Klonnummer.

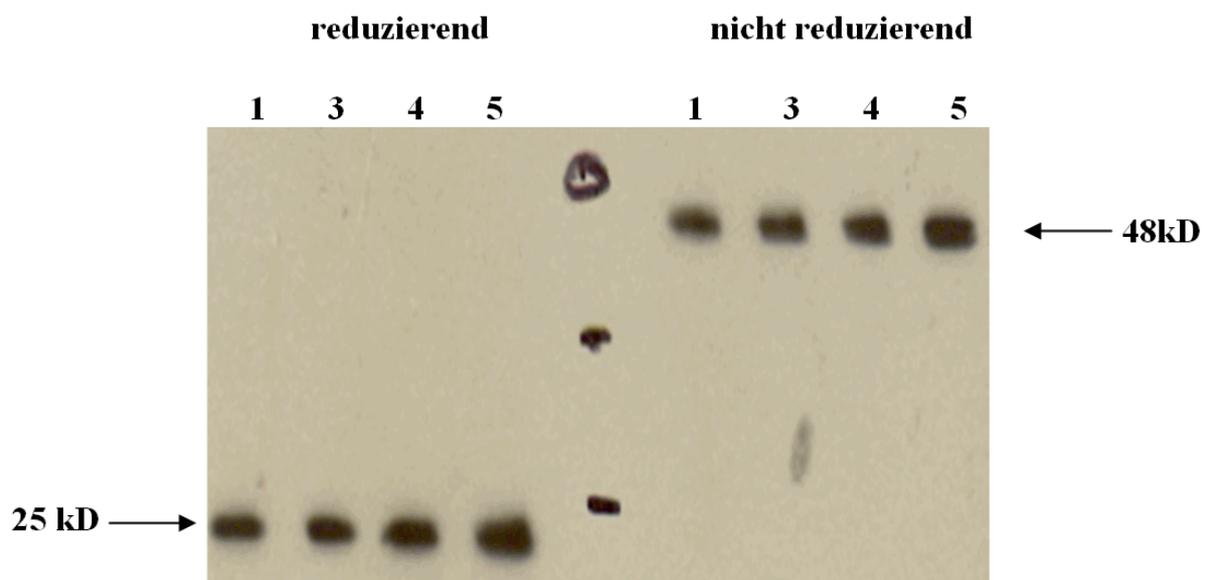


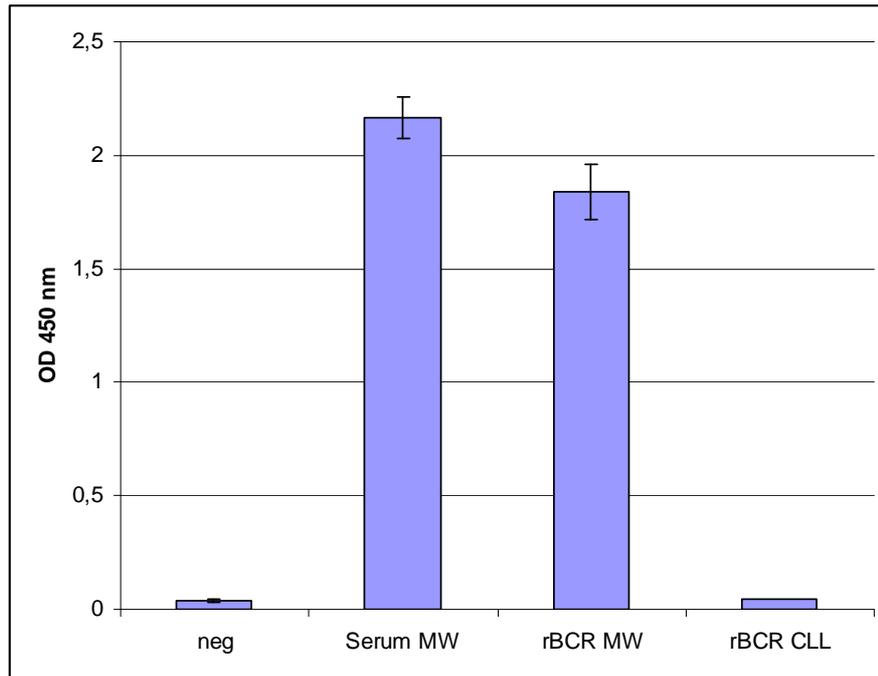
Abbildung 34: Western Blot. Der nicht reduzierende- Fab-Antikörper mit intakter Disulfidbrücke wird bei ca. 48 kDa detektiert; reduzierendes Gel: die Leicht- und Schwereketten werden bei ca. 22-25 kDa detektiert .

Die Proteingele zusammen mit dem Westernblot zeigen die richtige Expression des rekombinanten Fab-Fragmentes.

5.12. Serumantikörper und recombinante Fabs- Fragmente zeigen gleiche Spezifität

Die P-7-Spezifität des B-Zell-Rezeptors wurde im ELISA überprüft. Der rekombinant exprimierte Klon des B-Zell-Rezeptors, der aus einem Paraffinschnitt des stark durch die Makroglobulinämie Waldenström infiltrierten Lymphknoten kloniert worden war, zeigte dieselbe Reaktivität wie das paraproteinhaltige Serum des MW Patienten mit Paratarg-7 spezifischem Paraprotein. Der BCR eines Patienten mit chronisch lymphathischer Leukämie mit FAM32A Protein Spezifität zeigte keine Reaktivität. Ebenfalls zeigte sich keine Reaktivität im Serum vom Patienten mit IgM-MGUS mit einem nicht P-7 spezifischem Paraprotein. Damit haben wir nachweisen können, dass der B-Zell-Rezeptor die gleiche Spezifität hat wie das Paraprotein bei einem Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström.

A)



B)

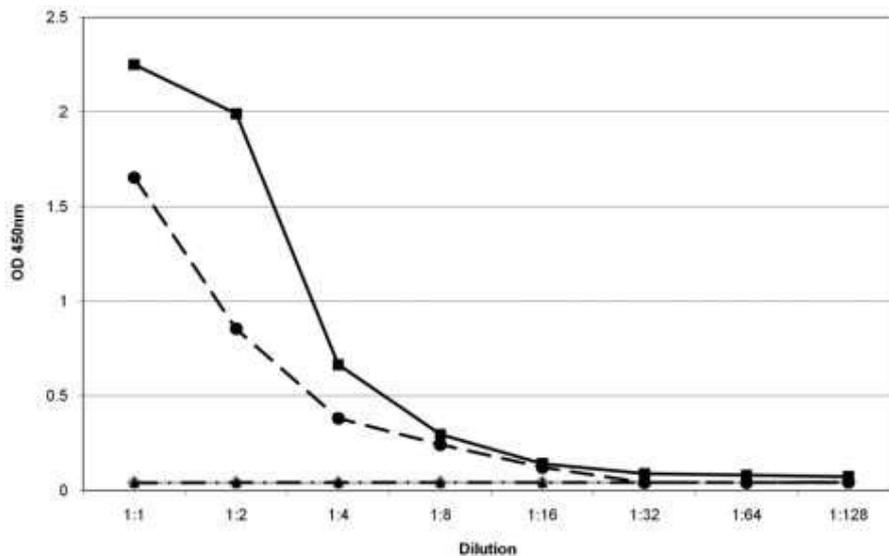


Abbildung 35: Reaktivität und Spezifität des rekombinant exprimierten B-Zell-Rezeptors eines Patienten mit MW mit Paratarg-7 spezifischem Paraprotein. A) Reaktivität gegen Paratarg-7. B) Titerverlauf. Neg.- Negativkontrolle, Serum MW-Serum eines MW Patienten, rBCR MW- rekombinanter B-Zell Rezeptor eines MW Patienten, rBCR CLL- rekombinanter BCR eines Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie. Der rekombinant exprimierte Klon des B-Zell-Rezeptors, der aus einem Paraffinschnitt des stark durch die Makroglobulinämie Waldenström infiltrierten Lymphknoten kloniert worden war, zeigte dieselbe Reaktivität wie das paraproteinhaltige Serum des MW Patienten (schwarze Quadrate). Als coat diente rekombinant hergestelltes Paratarg-7. Es zeigte sich keine Reaktivität im Serum eines Patienten mit IgM-MGUS mit einem nicht P-7 spezifischem Paraprotein (graue Rhomben). Der BCR von einem Patienten mit chronisch lymphathischer Leukämie mit FAM32A Protein Spezifität zeigte keine Reaktivität. (Kontrolle, schwarzes Dreieck).

6. Diskussion

Auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Entstehung von MGUS/MM (monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz / multiples Myelom) und einer chronischen Antigenstimulation haben verschiedene Studien hingewiesen, allerdings waren ihre Ergebnisse nicht eindeutig^{27, 44-46}. Einige Studien konnten antigene Zielstrukturen von Paraproteinen identifizieren, die gegen unterschiedliche infektiöse Erreger wie z.B. Cytomegalovirus⁴⁷ oder gegen das p24 Antigen des HIV²⁹ gerichtet waren. Auch Versuche, das Paraprotein Target durch Epitoprekonstruktion zu identifizieren, waren nicht überzeugend, weil die Reaktionen lediglich bei Konzentrationen bis zu 1:1250 beobachtet wurden, was an der Paraprotein-vermittelten Reaktion zweifeln lässt⁴⁸.

In unseren Untersuchungen haben wir mit sehr hoher Verdünnung der paraproteinhaltigen Seren (1:10⁸) gearbeitet und konnten zeigen, dass 14% der analysierten paraproteinhaltigen IgA-, IgG-MGUS- sowie MM-Seren spezifisch mit P-7 reagierten. Untersuchungen von 161 IgM-MGUS/MW Patienten zeigten ähnliche Ergebnisse. Achtzehn von 161 (11,2%) IgM-Paraproteinen (9 Patienten mit IgM-MGUS und 9 Patienten mit MW) hatten mit Paratarg-7 spezifisch reagiert. Dabei zeigten sich zwischen MGUS/MM/MW Patienten, die ein P7-spezifisches Paratarg Protein aufwiesen und MGUS/MM/MW Patienten, die ein nicht-P7- spezifisches Paraprotein besitzen bezüglich des Alters, des Geschlechtes oder des Krankheitsverlaufes keine signifikanten Unterschiede. Damit ist Paratarg-7 das erste Zielantigen von IgM-Paraproteinen bei MGUS/MW Patienten, das bei einer signifikanten Patientenzahl identifiziert werden konnte. Durch Klonierung des B-Zell Rezeptors aus einem Lymphknotenpräparat eines MW Patienten konnten wir nachweisen, dass der B-Zell-Rezeptor die gleiche Spezifität hat wie das Paraprotein im Serum des Patienten. Mutationen und Polymorphismen von P-7 als Ursache der Autoimmunogenität konnten durch DNA-Sequenzierungen von P-7 bei Patienten mit IgM-MGUS/MW, die ein P-7 spezifisches Paraprotein hatten, ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Daten). Des Weiteren konnte in der isoelektrischen Fokussierung gezeigt werden, dass alle IgM-MGUS/MW Patienten mit P-7 spezifischen Paraprotein Träger der hyperphosphorylierten Variante sind (pP-7). Nur 2% der gesunden Spender sind dagegen Träger von pP-7. Damit ist der Trägerstatus der pP-7 Variante bei Kaukasiern assoziiert mit einem 6,5 fach erhöhten Risiko an IgM-MGUS/MW zu erkranken.

Kleine Kohortenstudien sowie Einzelfallberichte von Familien mit mehreren Erkrankten haben schon seit langem darauf hingewiesen, dass genetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der MW spielen⁴⁹⁻⁵¹, allerdings konnten bisher keine Keimbahnmutationen nachgewiesen werden, die

das familiäre Auftreten von diesen Neoplasien erklären würden. Es wurden in der letzten Zeit sehr umfassende Kohortenstudien durchgeführt, die das erhöhte Risiko für MW Patientenangehörige für Entwicklung einer IgM-MGUS/MW, eines NHL oder einer CLL belegten^{52;53}. Diese Studien zeigten, dass das gleiche Risiko für Eltern, Geschwister und Nachkommen besteht, was dafür sprach, dass es sich eher um einen dominanten Gendefekt handeln könnte und weniger um rezessiv vererbte Gene^{54 52;53}. Unsere Familienuntersuchungen von IgM-MGUS/MW Patienten mit Paratarg-7 Spezifität haben gezeigt, dass der Trägerstatus pP-7 auch bei IgM-Paraproteinämien autosomal dominant vererbt wird.

Der autosomal-dominante Erbgang des hyperphosphorylierten Paratarg-7-Trägerstatus kann familiäre Fälle von IgM-MGUS/MW erklären. Es ist jetzt auch möglich, die Familienmitglieder zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, ebenfalls im Laufe ihres Lebens diese Neoplasien zu entwickeln. Im Hinblick auf die Hypothese der chronischen Antigenstimulation würde bei den pP-7 Trägern ein fortschreitendes Alter mit einem erhöhten Auftreten von IgM-MGUS/MW einhergehen. Sollte sich die Hypothese bestätigen, würde bei den pP-7 Trägern das Risiko an IgM-MGUS/MW zu erkranken, weiter steigen. Des Weiteren ist es jetzt möglich zu untersuchen, ob sich früher berichtete familiäre Fälle von IgM-MGUS/MW durch den pP-7 Trägerstatus erklären lassen.

Die Ergebnisse der Paratarg-Untersuchungen von IgM-MGUS/MW Patienten entsprechen den von uns publizierten Daten über 252 IgG- und IgA-MGUS/MM Patienten, wo gezeigt wurde, dass pP-7 mit einem erhöhten Risiko an IgA- sowie IgG-MGUS/MM zu erkranken, verbunden ist. Bei 35 von den 252 untersuchten MGUS/MM Patienten (13,9%) ließ sich eine Paratarg-7 Spezifität nachweisen. Bei allen diesen Patienten konnte ein hyperphosphoryliertes Paratrag-7 Protein nachgewiesen werden. Nur 2% der gesunden Spender waren ebenfalls Träger von pP-7, so dass der pP-7 Trägerstatus mit einem 8-fach erhöhtem Risiko an IgA-, IgG-MGUS/MM zu erkranken, assoziiert ist⁴². Es wird auch bei diesen Patienten autosomal dominant vererbt⁵⁵. Damit ist das hyperphosphorylierte Paratarg-7 Protein die erste molekular definierte Struktur, die eine plausible Erklärung des familiären Auftretens des IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM liefert und einen hoch signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung dieser Neoplasien darstellt.

Es ist hoch interessant, dass pP-7 ein Zielantigen von Paraproteinen bei zwei biologisch und klinisch unterschiedlichen B-Zell Erkrankungen ist. Die IgM-MGUS/MW stammt von den somatisch mutierten Postkeimzentrum-B-Zellen, die keinen Isotypswitch durchgemacht haben,

und die IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM stammen von den autonomen und immortalisierten Plasmazellen.

Es ist bekannt, dass relevante Unterschiede in der Prävalenz der IgA-, IgG-, IgD-MGUS/MM in verschiedenen ethnischen Gruppen bestehen^{8,9}. MGUS/MM tritt am häufigsten bei Afrikanern und afrikanischen Amerikanern auf (5,84%),¹⁰ es tritt seltener bei den Kaukasiern in Europa und in Amerika auf (3,2%) und am seltensten tritt es bei den Asiaten auf (2,4%)¹¹.

Diese Diskrepanz zeigt, dass genetische Faktoren eine Bedeutung in der Pathogenese dieser Neoplasien haben. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass 4,5% der japanischen IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM Patienten Paraproteine mit einer Paratarg-7 Spezifität aufweisen. Die Prävalenz von P-7 ist in der japanischen Bevölkerung deutlich niedriger als in der europäischen Bevölkerung, bei allerdings deutlich erhöhtem Risiko, an MGUS/MM zu erkranken. Wir haben gezeigt, dass 4,5% der japanischen IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM Patienten Paratarg-7 Spezifität nachweisen. Dies ist deutlich höher als bei der gesunden Population und weist darauf hin, dass pP-7 eine direkte oder indirekte Rolle in der Pathogenese der IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM auch in der japanischen Population spielt.

Die Trägerschaft der pP-7 Variante in der gesunden deutschen Population beträgt 2%, in der japanischen Population aber 0,36%, was deutlich niedriger ist. Das relative Risiko für einen deutschen pP-7 Träger eine IgA-, IgG- sowie IgD-MGUS/MM zu entwickeln ist 8 mal erhöht, für die japanischen pP-7 Träger ist das Risiko 13 mal erhöht. Damit ist in beiden ethnischen Gruppen pP-7 Trägerschaft der Risikofaktor mit der größten bisher bekannten Odds Ratio für MGUS oder MM.

Eine der wichtigsten offenen Fragen ist: welche Rolle genau spielt das hyperphosphorylierte Paratarg-7 in der Pathogenese der monoklonalen Gammopathien wie MGUS/MM/MW? Ob es durch eine chronische Antigenstimulation die Entwicklung von dieser Neoplasien stimuliert oder ob es nur ein Marker oder ein Epiphänomen von einer anderen autosomal dominant vererbaren Auffälligkeit, die MGUS/MM/MW zu entwickeln darstellt, soll weiterhin bei den Patienten und ihren Angehörigen untersucht werden.

Das relativ häufige Auftreten von pP-7 als Zielantigen der Paraproteine beim MGUS/MM/MW und die Möglichkeit der Durchführung von Familienuntersuchungen ermöglicht eine genaue Analyse der Tumor-host- Interaktionen in An- und Abwesenheit des Antigens und die antigenspezifische Analyse der Einflüsse von immunregulatorischen Defekten, wie die in der

letzten Zeit berichtete Dysfunktion von regulierenden T-Zellen bei Patienten mit MGUS und MM⁵⁶.

Im Gegensatz zum pP-7 Trägerstatus, der ausschließlich unter einer genetischen Kontrolle steht, ist die Natur der Immunantwort gegen pP-7 komplex und kann sowohl genetische als auch Umweltfaktoren einschließen. Dass die genetischen Faktoren eine wesentliche Rolle spielen, zeigt die Tatsache, dass alle IgG-Paraproteine mit pP-7 Spezifität zu der Subklasse IgG3 gehören und dass 40% aller IgG3-Paraproteine mit pP-7 reagieren⁵⁷.

Mittlerweile haben wir 11 weitere von uns identifizierte Paraproteintargets analysiert und konnten zeigen, dass alle autoantigenen Targets hyperphosphoryliert sind. Daraus schließen wir, dass die Hyperphosphorylierung der o. g. Proteine eine grundsätzliche Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt. Im Paratarg-7 befindet sich die zusätzliche Phosphorylierungsstelle bei dem Serin an Position 17. Die Phosphokinase C ζ (PKC ζ) ist für die Phosphorylierung der meisten und die Protein Phosphatase 2A für die Dephosphorylierung des Paratargs-7 und allen anderen Paraproteintargets verantwortlich. Es wurden keine Unterschiede in PKC ζ bei den pP-7 Trägern und bei den Wildtyp- Paratarg-7-Träger festgestellt. Es wurde allerdings gezeigt, dass die katalytische Untereinheit C der Protein Phosphatase 2A im Tyrosin in Position Y307 hyperphosphoryliert und damit inaktiv ist, so dass sie den Hyperphosphorylierungszustand des Paratargs-7 nicht mehr zurückbringen kann. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Inaktivierung der PP2A ein wichtiger Prozess in der Pathogenese von MGUS/MM/WM ist⁵⁸. Um zu bestimmen, welche SNP oder welche Mutation mit Inaktivierung von PP2A assoziiert ist, haben wir eine genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. Diese ergab, dass es eine Assoziation auf dem Chromosom 4q35 gibt. Unser Ziel ist die Identifizierung des Gens der für die Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit C der Protein Phosphatase 2A im Tyrosin in Position Y307 verantwortlich ist.

Zusätzlich wollten wir die T-Zell-Reaktivität gegen ein hyperphosphoryliertes und ein nicht-hyperphosphoryliertes Paratarg-7 bei Patienten sowie bei den Merkmalträgern untersuchen. Eine vor kurzem publizierte Studie hat gezeigt, dass Phosphoepitope eine stärkere Bindungsaffinität zu dem MHC Komplex haben und dass sie eine stärkere CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten Antwort hervorrufen können als nicht hyperphosphorylierte Epitope⁵⁹. Weitere Untersuchungen in unserem Labor haben gezeigt, dass pP-7 und nicht der P-7 Wildtyp eine starke und spezifische Antwort der CD4⁺ T-Lymphozyten bei den Patienten mit pP-7 erzeugen können und dass diese

Immunantwort HLA-DQ- und HLA-DR- restringiert ist. Das hyperphosphorylierte Paratarg-7 ruft offenbar eine chronische Antigenstimulation hervor, die durch die CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird. Unsere Hypothese ist, daß die pP-7 spezifische CD4⁺ T-Zellen einen Klon der B-Zellen mit der gleichen Spezifität stimulieren, was eventuell zur Entwicklung eines malignen B-Zellen Klons führt.

Zusammenfassend wurde in meiner Doktorarbeit gezeigt, dass hyperphosphoryliertes Paratarg-7 der erste molekular definierte, autosomal-dominant vererbare Risikofaktor für die Entwicklung von IgM-MGUS/WM ist und dass es die Identifikation von Familienangehörigen von Patienten ermöglicht, bei denen ein erhöhtes Risiko besteht, an IgM-MGUS/MW zu erkranken. Desweiteren haben wir gezeigt, dass die Prävalenz von pP-7 in unterschiedlichen ethnischen Gruppen unterschiedlich ist. Damit liefert die vorliegende Analyse ein wichtiges Ergebnis auf der Suche nach Faktoren, die die Entwicklung von monoklonalen Paraproteinen beeinflussen.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Abb.	Abbildung
	a.dest.	destilliertes Wasser
	AK	Antikörper
	Amp	Ampicillin
	AS	Aminosäure
B	BCR	B-Zell-Rezeptor
	bp	Basenpaare
	bzw.	Beziehungsweise
C	°C	Grad Celcius
	ca.	circa
	cDNA	complementary DNA
	CDR	eng. Complementarity determining region Deutsch: Komplementaritätsbestimmende Region
	CLL	chronisch lymphatische Leukämie
	CMV	Cytomegalie Virus
D	DNA	Deoxyribonukleinsäure
	D-Segment	Diversity segment
E	E.coli	Echerichia coli
	ECL	enhanced chemoluminescence
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
	Et al.	et alli
F	Fab	Antigen bindendes Fragment eines Antikörpers
	Fc	fragment cristallisable
	FR	Rahmenregion
H	H-Kette	schwere Kette
	HIV	Human Immunodeficiency Virus
I	Ig	Immunglobulin
J	J-Segment	Joining Segment
K	kDa	Kilo-Dalton
	kb	Kilobasenpaare

L	l	Liter
	LB	lysogeny broth
	L-Kette	Leichtkette
	LPL	Lymphoplasomzytisches Lymphom
M	M	Molar
	MM	Multiples Myelom
	MW	Makroglobulinämie Waldenström, Immunozytom, Morbus Waldenström
	MGUS	monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
	MCS	multiple cloning site
	mg	milligram
	Min.	Minute
	µl	Mikroliter
	ml	Milliliter
	N	NaCl
NaOH		Natronlauge
ng		Nanogramm
NHL		Non-Hodgkin-Lymphom
O	OD	optische Dichte
P	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
	PBS	Phosphat-buffered saline
	PCR	polymerase chain reaction -Polymerasekettenreaktion
	PKC-ζ	Proteinkinase C-Zeta
	PP2A	Proteinphosphatase 2A
	PVDF	Polyvinylidenfluorid
	FLC	Ratio (Free Light Chain)
	pP-7	hyperphosphoryliertes Paratarg-7
	P-7	nicht hyperphosphoryliertes Paratarg-7
	S	s
SDS		Sodiumdodecylsulfat
SEREX		serological identification of antigens by expression cloning
SLP-2		stomatatin –like-proetein -2
sog.		sogenannte

	STOML2	stomatin –like-proetein -2
	Std.	Stunde
T	Tab.	Tabelle
	TBS	Tris-buffered saline
	TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
	Temp.	Temperatur
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	UV	ultra violet
W	WHO	World Health Organisation
V	VK	Variabler Region der Leichtkette Kappa
	VL	Variabler Region der Leichtkette
	VH	Variabler Region der Schwerkette

8. Reference List

1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324-339.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
3. Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA et al. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 2009;113:6386-6391.
4. Lynch ME. Do we care about people with chronic pain? *Pain Res.Manag.* 2008;13:463.
5. Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR et al. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 2009;114:791-795.
6. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br.J.Haematol.* 2006;134:573-589.
7. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
8. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia* 2009;23:1691-1697.
9. Hirabayashi Y, Katanoda K. Comparison of time trends in multiple myeloma incidence (1973-1997) in East Asia, Europe and United States, from *Cancer Incidence in Five Continents, Vols IV-VIII.* *Jpn.J.Clin.Oncol.* 2008;38:720-721.
10. Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. *Mayo Clin.Proc.* 2007;82:1468-1473.
11. Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, Kamihira S, Tomonaga M. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: study of 52,802 persons in Nagasaki City, Japan. *Mayo Clin.Proc.* 2007;82:1474-1479.
12. Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. *Mayo Clin.Proc.* 2007;82:1468-1473.
13. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1362-1369.

14. Landgren O, Gridley G, Turesson I et al. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* 2006;107:904-906.
15. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:175-187.
16. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:571-596.
17. Rajkumar SV. Prevention of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:5606-5608.
18. Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mouloupoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldenstrom's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:214-226.
19. Treon SP, Dimopoulos M, Kyle RA. Defining Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin.Oncol.* 2003;30:107-109.
20. Vijay A, Gertz MA. Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2007;109:5096-5103.
21. McMaster ML, Kristinsson SY, Turesson I, Bjorkholm M, Landgren O. Novel aspects pertaining to the relationship of Waldenstrom's macroglobulinemia, IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance, polyclonal gammopathy, and hypoglobulinemia. *Clin.Lymphoma Myeloma.* 2009;9:19-22.
22. Herrinton LJ, Weiss NS. Incidence of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood* 1993;82:3148-3150.
23. Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP et al. Molecular characterization of Waldenstrom's macroglobulinemia reveals frequent occurrence of two B-cell clones having distinct IgH VDJ sequences. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:2005-2013.
24. Ackroyd S, O'Connor SJ, Owen RG. Rarity of IgH translocations in Waldenstrom macroglobulinemia. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2005;163:77-80.
25. Schop RF, Kuehl WM, Van Wier SA et al. Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood* 2002;100:2996-3001.
26. Kristinsson SY, Koshiol J, Goldin LR et al. Genetics- and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoplasmacytic lymphoma/ Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin.Lymphoma Myeloma.* 2009;9:23-26.
27. Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood* 2008;111:3388-3394.
28. Seligmann M, Brouet JC. Antibody activity of human myeloma globulins. *Semin.Hematol.* 1973;10:163-177.

29. Konrad RJ, Kricka LJ, Goodman DB, Goldman J, Silberstein LE. Brief report: myeloma-associated paraprotein directed against the HIV-1 p24 antigen in an HIV-1-seropositive patient. *N.Engl.J.Med.* 1993;328:1817-1819.
30. Preuss KD, Held G, Kubuschok B et al. 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* 2007;121:459-461.
31. Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M et al. A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int.J.Cancer* 2009;125:656-661.
32. Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J.Biol.Chem.* 2000;275:8062-8071.
33. Cao WF, Zhang LY, Liu MB et al. Prognostic significance of stomatin-like protein 2 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: clinical, histologic, and immunohistochemistry analyses with tissue microarray. *Hum.Pathol.* 2007;38:747-752.
34. Zhang B, Liu YX, Cao WF et al. [Relationship between the expression of matrix metalloproteinase-13 protein and other biomarkers, prognosis in invasive breast cancer]. *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* 2008;37:471-476.
35. Chang D, Ma K, Gong M et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2009
36. Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M et al. 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.* 2009;10:950-956.
37. Preuss KD, Pfreundschuh M, Fadle N et al. Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 2011;118:3340-3346.
38. Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M et al. A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int.J.Cancer* 2009;125:656-661.
39. Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M et al. 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.* 2009;10:950-956.
40. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
41. de Haard HJ, van NN, Reurs A et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J.Biol.Chem.* 1999;274:18218-18230.
42. Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M et al. A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int.J.Cancer* 2009;125:656-661.

43. Grass S, Preuss KD, Wikowicz A et al. Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2011;117:2918-2923.
44. Landgren O, Gridley G, Turesson I et al. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* 2006;107:904-906.
45. Kristinsson SY, Koshiol J, Bjorkholm M et al. Immune-Related and Inflammatory Conditions and Risk of Lymphoplasmacytic Lymphoma or Waldenstrom Macroglobulinemia. *J.Natl.Cancer Inst.* 2010
46. Lewis DR, Pottern LM, Brown LM et al. Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation. *Cancer Causes Control* 1994;5:529-539.
47. Sompuram SR, Bastas G, Vani K, Bogen SA. Accurate identification of paraprotein antigen targets by epitope reconstruction. *Blood* 2008;111:302-308.
48. Sompuram SR, Bastas G, Vani K, Bogen SA. Accurate identification of paraprotein antigen targets by epitope reconstruction. *Blood* 2008;111:302-308.
49. Lynch HT, Ferrara K, Barlogie B et al. Familial myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2008;359:152-157.
50. Ozet A, Guran S, Beksac M. Familial multiple myeloma associated with disorders of chronic inflammation: first report from Turkey. *Clin.Lymphoma Myeloma.* 2008;8:246-248.
51. Ogmundsdottir HM, Haraldsdottir V, Johannesson GM et al. Familiality of benign and malignant paraproteinemias. A population-based cancer-registry study of multiple myeloma families. *Haematologica* 2005;90:66-71.
52. Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR et al. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 2009;114:791-795.
53. Kristinsson SY, Bjorkholm M, Goldin LR et al. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood* 2008;112:3052-3056.
54. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A et al. Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann.Oncol.* 2006;17:488-494.
55. Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M et al. 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.* 2009;10:950-956.
56. Prabhala RH, Neri P, Bae JE et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood* 2006;107:301-304.
57. Grass S, Preuss KD, Wikowicz A et al. Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2011;117:2918-2923.

58. Preuss KD, Pfreundschuh M, Fadle N et al. Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 2011;118:3340-3346.
59. Meyer VS, Drews O, Gunder M et al. Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands. *J. Proteome. Res.* 2009;8:3666-3674.

9. Aus der Doktorarbeit hervorgehende Publikationen und Posters

1.

Grass S, Preuss KD, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Nikolaus D, Yang Y, Fadle N, Regitz E, Dimopoulos MA, Treon SP, Hunter ZR, Pfreundschuh M.

Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenstrom macroglobulinemia. Blood (2011).

2.

Grass S, Iida S, Wikowicz A, Preuss KD, Inagaki A, Shimizu K, Ziepert M, Ueda R, Pfreundschuh M.

Risk of Japanese carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasms, to develop monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma.

Cancer Science (2011).

Posters:

1.

Hyperphosphorylated paratarg-7: the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasias. Wikowicz A., KD Preuss, S.Grass, N.Fadle, E.Regitz, S.Iida, A.Inagaki, R.Ueda, M.Ziepert, M.Pfreundschuh. Poster bei der Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie in Berlin vom 1. bis 5. Oktober 2010.

2.

Hyperphosphorylated paratarg-7: the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasias. Wikowicz A., KD Preuss, S.Grass, N.Fadle, E.Regitz, S.Iida, A.Inagaki, R.Ueda, M.Ziepert, M.Pfreundschuh. Poster bei dem XIX Wilsede Meeting, Wilsede , 19-23.06.2010.

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien mit Angaben der Hersteller	22
Tabelle 2: Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Hersteller.....	27
Tabelle 3: Sammelgelansatz	44
Tabelle 4: Separationsgelansatz.....	45
Tabelle 5: Patientenpopulationen, Krankheitsentitäten und Anzahl untersuchten Proben	47
Tabelle 6: Ergebnisse der ELISA bei den japanischen und den deutschen MM/MGUS Patienten.	48
Tabelle 7: Prävalenz des hyperphosphorylierten Paratarg-7 bei IgM-MGUS/MW und bei den gesunden Kontrollen.....	52

11. Danksagung

Dem Professor Michael Pfreundschuh danke ich für die Übergabe eines faszinierenden Themas für meine Doktorarbeit und für die kostbare Zeit, die er mir gewidmet hat.

Doktor Dieter Preuss hat immer Zeit für mich gehabt und hat mit mir inspirierende Gespräche geführt. Seine Hilfe ist unschätzbar.

Natalie Fadle war immer für mich da. Dafür und für alle leckeren Kuchen, die sie gebacken hat, bedanke ich mich herzlich.

Bei Evi Regitz bedanke ich mich für Ihre Geduld, Unterstützung und Hilfe bei der Klonierung des B-Zell Rezeptors.

Dem ganzen Carreras- Zentrum- Team danke ich für Verschaffung einer netten Atmosphäre, in der ich immer gerne gearbeitet hab.

Marek Guzicki hat mir seit Anfang an mit Computerangelegenheiten geholfen und hat meine Doktorarbeit formatiert. Als er aus dem Haus gegenüber ausgezogen ist, hat Christian Schorpp ihn großzügig ersetzt. Danke schön!

Meinem Mann Piotr Ciesiolka danke ich für sein liebevolles Dasein.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner ganzen Familie in Polen bedanken. Ich habe bei Ihnen immer neue Kräfte und Freude getankt und die haben mich auf meinem Weg liebevoll begleitet.

Ein ganz besonderen Dank gilt meinen Freunden in Polen und in Deutschland, insbesondere Schwester Ancilla Wißling, Frau Margaretha Kehr, Frau Dietlinde Thyssen, Frau Brigitte Hermes, Frau Reinhild Strotmeyer und Frau Annelene Schmitz. Durch ihre bedingungslose Unterstützung habe ich erfahren, wie schön das Leben ist, wenn man Freunde hat.

12. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Aleksandra Ciesiolka geb. Wikowicz
Geboren am: 9. Februar 1978 in Wroclaw, Polen
Anschrift: Zweibrücker Str. 43, 66424 Homburg
Staatsangehörigkeit: Polnisch, Deutsch
Familienstand: verheiratet

AUSBILDUNG

1985-1993: Grundschule, Breslau, Polen
1993-1997: Jakub Jasinski Gymnasium Breslau, Abschluss mit Abitur
10/1997-09/2001: Studium der Humanmedizin, Universität Breslau, Polen
10/2001-04/2006: Studium der Humanmedizin, Ruhr Universität Bochum

BERUFLICHER WERDEGANG

08/06-05/08: Assistenzärztin an der Klinik für Onkologie, Hämatologie und Gastroenterologie, Chefarzt PD Dr. U. Graeven
St. Franziskus Krankenhaus, Mönchengladbach

Ab 06/08 : Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin I
Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes