

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

Die Bedeutung von SUMOyliertem HSP90 bei hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von:

Martin Weigert

geb. am: 03.11.1990 in Augsburg

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatte:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Zusammenfassungen | 3 |
| 1.1 Übersicht in Deutsch..... | 3 |
| 1.2 Abstract | 4 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1 Übersicht über die Plasmazeldyskrasien | 5 |
| 2.1.1 Definition, Klinik und Epidemiologie der MGUS | 5 |
| 2.1.2 Definition, Klinik und Epidemiologie des Multiplen Myeloms | 6 |
| 2.1.3 Definition, Klinik und Epidemiologie des M. Waldenstroem | 8 |
| 2.2 Das Konzept der chronischen Antigenstimulation und die Rolle von hyperphosphoryliertem Paratarg-7..... | 9 |
| 2.3 Die Identifikation und Charakterisierung von SUMOyliertem HSP90..... | 11 |
| 2.4 Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Verwendete Materialien und Geräte | 18 |
| 3.2 Durchführung des ELISA | 20 |
| 4. Ergebnisse | 22 |
| 5. Diskussion | 34 |
| 6. Literaturverzeichnis | 39 |
| 7. Tabellen und Abbildungsverzeichnis | 44 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 47 |
| 9. Danksagung | 48 |
| 10. Lebenslauf | 49 |

1. Zusammenfassungen

1.1 Übersicht in Deutsch

Nach hyperphosphoryliertem Paratarg-7 konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh mit SUMOyliertem HSP90 (HSP90-SUMO) ein zweites dominantes antigenes Target von Paraproteinen identifizieren, welches einen molekularen Risikofaktor für die Entwicklung einer Monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), eines Multiplen Myeloms (MM) und eines Morbus Waldenstroem (WM) darstellt.

Basierend auf der Annahme, dass posttranslationale Modifikationen eine entscheidende Rolle im autoimmunen Charakter von Epitopen spielen können, wurden Protein-Macroarrays in vitro SUMOyliert und anschließend auf Reaktivität mit Seren von Patienten mit einer Plasmazell Dyskrasie (PCD) getestet. So kam es zur Entdeckung des SUMOylierten Hitzeschockprotein 90 als paraproteinärer Zielstruktur. Bei einer Verdünnung der Patientenserum von 1:10⁷ reagierten 11,9% der europäischen Patienten, 11,2% der afroamerikanischen Patienten und 5,1% der japanischen Patienten mit HSP90-SUMO. In keinen von über 900 Seren gesunder Kontrollen konnten Antikörper gegen HSP90-SUMO gefunden werden. Die Prävalenz von HSP90-SUMO-Trägern in der gesunden Population lag bei maximal 2%, woraus sich folgern lässt, dass die Trägerschaft von HSP90-SUMO mit einer deutlichen Risikoerhöhung für die Entwicklung einer Plasmazell Dyskrasie einhergeht. Die Odds Ratio variierte je nach ethnischer Zugehörigkeit und lag bei maximal 14,8 in der Gruppe der Europäer. HSP90-SUMO wird autosomal dominant vererbt und ist zurückzuführen auf eine substratspezifische Inaktivierung der Sentrin-spezifische Protease 2 (SEN2P2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit ausgewählten hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren mittels ELISA auf das Vorhandensein von SUMOyliertem HSP90 untersucht. Es konnte keine gehäufte Prävalenz bei diesen Erkrankungen nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass HSP90-SUMO ein spezifisches Phänomen bei Plasmazell Dyskrasien ist, pathogenetisch im Rahmen einer chronischen Antigenstimulation von Bedeutung sein könnte und nicht generell mit neoplastischen Veränderungen vergesellschaftet ist.

1.2 Abstract

After Paratarg-7 SUMOylated HSP90 (HSP90-SUMO) is another dominant antigenic target of paraproteins in multiple myeloma (MM), monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and Waldenstroem's macroglobulinemia (WM), identified and characterized by the research team among Prof. M. Pfreundschuh.

Based on the perception that posttranslational modification of proteins might increase the autoimmune character of epitopes, protein-microarrays were SUMOylated in vitro and tested for reactivity with sera of patients suffering from a plasma cell dyscrasia (PCD). This led to the identification of HSP90-SUMO as a target of paraproteins. At a dilution of 1:10⁷ sera from 11.9% of European patients, 11.2% of Afro-American patients and 5.1% of Japanese patients reacted with HSP90-SUMO whereas no anti-HSP90-SUMO antibodies were detected in the sera of over 900 healthy controls. The prevalence of HSP90-SUMO carriers in healthy controls was 2% demonstrating that the carrier state is a risk factor for developing a plasma cell dyscrasia with a maximum odds ratio of 14,8 in the European population. HSP90-SUMO is inherited in an autosomal dominant fashion and due to a substrate-specific inactivation of sentrin-specific protease 2 (SEN2P2).

The aim of this study was to examine the prevalence of HSP90-SUMO in patients with selected haematological neoplasm and solid tumours by ELISA. The frequency of HSP90-SUMO in these patients was shown to be similar to the one in healthy controls. This led to the conclusion that HSP90-SUMO is specific for MM, MGUS and WM, and that it might play a role in the pathogenesis of these diseases, for example by chronic antigenic stimulation. HSP90-SUMO carrierstate is not associated to neoplastic disorders in general.

2. Einleitung

2.1 Übersicht über die Plasmazell Dyskrasien

Die Plasmazell Dyskrasien (PCD) stellen eine Gruppe an Erkrankungen dar, welche sich durch die monoklonale Proliferation von Plasmazellen auszeichnen. Hauptmerkmal ist die Bildung und Sekretion eines elektrophoretisch und immunologisch einheitlichen monoklonalen Proteins, welches auch als Paraprotein oder M-Protein bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um Antikörper, welche aus je zwei identischen leichten Ketten und je zwei identischen schweren Ketten bestehen. Bei den leichten Ketten werden der kappa und lambda Typ unterschieden. Die Zugehörigkeit zur jeweiligen Immunglobulinklasse IgG, IgM, IgA, IgD oder IgE wird durch die Entität der schweren Ketten festgelegt. Das Vorliegen eines Paraproteins im Serum lässt sich elektrophoretisch darstellen und erscheint als M-Gradient in der Gamma- oder Beta-Fraktion. Lassen sich freie Leichtketten im Urin nachweisen, bezeichnet man dies als Bence-Jones-Proteinurie. Die Immunfixation hat sich als Goldstandard bewährt, um die Quantität und Qualität des Paraproteins sowohl im Urin als auch im Serum zu bestimmen (1). Zu der Gruppe der Plasmazell Dyskrasien gehören das Multiple Myelom (MM), die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) und der M. Waldenstroem (WM).

2.1.1 Definition, Klinik und Epidemiologie der Monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz

Die MGUS bezeichnet das alleinige Vorhandensein eines Paraproteins. So beinhalten die Diagnosekriterien für die MGUS das Vorliegen eines Paraproteins im Serum mit einer Konzentration von weniger als 30 g/l, und weniger als 10% monoklonale Plasmazellen im Knochenmark. Darüber hinaus dürfen keine Myelom-definierenden Kriterien vorliegen. Hierzu zählen zum einen die Myelom-assoziierten Endorganschäden, welche im Wesentlichen in den CRAB-Kriterien zusammengefasst sind (1). Zum anderen legte die International Myeloma Working Group im Jahr 2014 zusätzliche Myelom-definierende Ereignisse (MDE) fest (2), welche bei einer MGUS ebenfalls nicht vorhanden sein dürfen (siehe Tab.1).

Die Prävalenz einer MGUS steigt mit höherem Lebensalter an und liegt in der Bevölkerung über 50 Jahren bei 3,2% und bei über 70-Jährigen bei 5,3% (3). Interessanterweise ist das Risiko für Afroamerikaner im Vergleich mit Weißen um das zwei- bis dreifache erhöht an einer MGUS zu erkranken. Das Risiko für Personen asiatischer Abstammung ist dagegen vermindert (4). Pro Jahr entwickelt etwa 1% der MGUS Patienten ein Multiples Myelom oder einen M. Waldenstroem (5), sodass die MGUS mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Bildung einer letztendlich behandlungsbedürftigen Plasmazelldyskrasie einhergeht. Darüber hinaus korreliert das individuelle Progressionsrisiko mit der Höhe der Konzentration des M-Proteins. Eine Erhöhung der Serumkonzentration von 1 g/l Paraprotein steigert das Risiko einer malignen Transformation um den Faktor 1,148. Das höchste Progressionsrisiko liegt außerdem vor, wenn das Paraprotein zur Immunglobulinklasse IgA gehört, das niedrigste bei einem M-Protein vom IgG-Typ (6).

2.1.2 Definition, Klinik und Epidemiologie des Multiplen Myeloms

Das Multiple Myelom, welches früher auch als M. Kahler bezeichnet wurde, zeichnet sich durch eine monoklonale Proliferation von Plasmazellen und die Bildung eines monoklonalen M-Proteins aus. Zu den Diagnosekriterien gehört die Schädigung eines oder mehrerer Organsysteme. Diese werden im Wesentlichen in den CRAB-Kriterien zusammengefasst und beinhalten eine Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und pathologische Frakturen. Weitere mögliche Endorganschäden sind ein Hyperviskositätsyndrom, eine Amyloidose und häufig rezidivierende bakterielle Infektionen (1). Die International Myeloma Working Group hat diese Kriterien um weitere Myelom-definierende Ereignisse ergänzt (siehe Tab.1). Die Diagnose Multiples Myelom wird nun auch gestellt, wenn mehr als 60% monoklonale Plasmazellen im Knochenmark (KM) vorliegen. Myelom definierend ist darüber hinaus das Vorliegen mehr als einer fokalen Knochenläsion mit mindestens 5 mm Durchmesser in einem Schnittbildverfahren. Auch wenn das Verhältnis von monoklonalen zu nicht-monoklonalen freien Leichtketten den Wert 100 übersteigt, unter der Voraussetzung dass die Konzentration der monoklonalen freien Leichtketten mehr als 100 mg/l beträgt, wird nun die Diagnose MM gestellt (2).

Tab.1: Übersicht über die Endorganschäden ROTI (myeloma- related organ or tissue impairment), unterteilt in CRAB Kriterien (calcium, renal insufficiency, anaemia, bone lesions) und weitere Endorganschäden (1), sowie die erweiterten Myelom-definierende Ereignisse gemäß der International Myeloma Working Group (2).

| | |
|--|---|
| <p>Erhöhung des Serumkalzium</p> <p>>0,25 mmol/l über obere Norm oder >2,75 mmol/l gesamt</p> <p>Niereninsuffizienz</p> <p>>173 mmol/l Kreatinin</p> <p>Anämie</p> <p>>2 g/dl Hb unter unterer Norm oder <10 g/dl gesamt</p> <p>Knochenläsionen</p> <p>Osteolysen oder Osteoporose mit pathologischer Fraktur</p> | <p>Weitere Endorganschäden</p> <p>Symptomatische Hyperviskosität Amyloidose Rezidivierende bakterielle Infekte (>2 Infekte in 12 Monaten)</p> <p>Myelom definierende Ereignisse</p> <p>>60% monoklonale Plasmazellen im KM >1 knöcherne Läsion mit mehr als 5 mm Größe Verhältnis monoklonalen zu nicht-monoklonalen freien Leichtketten >100 wobei die Konzentration von monoklonalen freien Leichtketten >100 mg/l</p> |
|--|---|

In etwa der Hälfte der Fälle handelt es sich um ein M-Protein der IgG-Klasse, 20% entfallen auf eine Paraproteinämie der IgA-Klasse und in ebenfalls 20% der Myelomfälle lassen sich nur freie Leichtketten nachweisen. Die Höhe der Konzentration des M-Proteins im Serum und Urin ist für die Diagnosestellung nicht von Bedeutung (1).

Weitere Sonderformen des Multiplen Myeloms sind das asymptomatische Myelom, welches auch smouldering myeloma genannt wird. Bei dieser Form liegt kein Endorganschaden vor. Es unterscheidet sich von der MGUS durch mehr als 30g/l Paraprotein im Serum und/oder mehr als 10% aber weniger als 60% monoklonale Plasmazellen im Knochenmark (2). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit eines Nicht-sekretorischen Myeloms. Dazu zählen 3% aller Myelomfälle, bei denen sich kein Paraprotein nachweisen lässt (1).

Etwa 15% der hämatologischen und 2% aller Neoplasien entfallen auf das Multiple Myelom. Die Inzidenz des MM liegt bei 4/100.000 Einwohner pro Jahr, der Altersgipfel liegt zwischen 60 und 70 Jahren (7). Afroamerikaner erkranken insgesamt doppelt so häufig wie Kaukasier (4). Eine prospektive Studie konnte zeigen, dass nahezu jeder Neuerkrankung an einem MM eine Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz vorausging. Bei 75% der Patienten konnte bereits in Blutproben acht Jahre vor Erkrankungsbeginn ein monoklonales Protein

nachgewiesen werden, welches im Zeitraum bis zur Diagnosestellung kontinuierlich anstieg. Somit scheint die MGUS ein unumgängliches Vorgängerstadium des MM darzustellen (8).

2.1.3 Definition, Klinik und Epidemiologie des Morbus Waldenstroem

Der M. Waldenstroem wird definiert als klinisch-pathologisches Krankheitsbild, das charakterisiert ist durch eine Infiltration des Knochenmarks durch ein lymphoplasmozytisches Lymphom (LPL) und das Vorhandensein einer Paraproteinämie vom IgM-Typ (9). Histologisch zeigt sich eine Infiltration des Knochenmarks durch pleomorphe B-Zellreihen verschiedener Reifungsstufen und Plasmazellen (10). M. Waldenstroem ist ein indolentes Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe (11).

Die Verdrängung des gesunden Knochenmarks durch das LPL führt zu Zytopenien. Am häufigsten zeigt sich eine fortschreitende Anämie (12). Eine symptomatische Hyperviskosität tritt nur bei 15% der Betroffenen auf, ist aber sehr charakteristisch für WM (13). Ab einer Serumviskosität von 4,5 cP (Normwert 1,4- 1,8 cP) kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen, die sich in Blutungsneigungen sowie in neurologischen und kardiovaskulären Komplikationen äußern können. Das Korrelat zu 4,5 cP Serumviskosität sind etwa 30 g/l Paraprotein vom IgM-Typ (14). Bei circa einem Viertel der Patienten liegt eine Polyneuropathie (PNP) vor (15), wobei es sich am häufigsten um eine sensible, distal-symmetrische PNP handelt (16). Im Vergleich zum Multiplen Myelom tritt ein akutes Nierenversagen weniger häufig auf (17). Eine pathologische Fraktur aufgrund osteolytischer Prozesse wird ebenfalls seltener beobachtet (12).

Eine besondere Manifestation eines WM ist zum einen das Bing Neel Syndrom, bei dem es zur Stase in zerebralen Gefäßen und anschließender Infiltration des umliegenden Gewebes durch maligne Zellen kommt (18). Ein weiteres Erscheinungsbild ist das Schnitzler Syndrom: Dies zeichnet sich durch Urtikaria, Fieber und Arthralgien aus (19).

Waldenstroem's Makroglobulinämie ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 3/1.000.000 Einwohner pro Jahr. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 63 und 68 Jahren. Interessanterweise betrifft der Morbus Waldenstroem

fast ausschließlich Weiße: So ist nur einer von 20 Erkrankten afroamerikanischer Herkunft (12).

2.2 Das Konzept der chronischen Antigenstimulation und die Rolle von hyperphosphoryliertem Paratarg-7

Die Ätiologie der Plasmazell Dyskrasien ist bis heute ungeklärt. Einen möglichen Lösungsansatz bietet die chronische Antigenstimulation, deren Bedeutung bei der Pathogenese von B- Zell Neoplasien seit geraumer Zeit kontrovers diskutiert wird. So konnte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines MM und einer MGUS für Patienten gezeigt werden, die an Autoimmunerkrankungen, Infektionen oder inflammatorischen Erkrankungen litten. Dies impliziert das Prozesse, die aktivierenden Einfluss auf das Immunsystem nehmen, von Bedeutung sind (20). Mehrere Berichte über Patienten, bei denen sich ein Paraprotein gegen bestimmte identifizierte antigene Zielstrukturen nachweisen lies, unterstützen diese These. So erkrankte ein HIV positiver Patient an einem Multiplem Myelom mit einem spezifischen Paraprotein gegen das p24- Antigen des HI-Virus I. Somit könnte eine dauerhafte Stimulation durch ein bestimmtes Antigen, zumindest teilweise mitverantwortlich sein für die Entstehung einer Plasmazell Dyskrasie (21). In einem ähnlichen Fall entwickelte ein Patient ein Multiples Myelom, bei dem das Paraprotein gegen das $\alpha 2$ -Markoglobulin des Pferdes gerichtet war. 30 Jahre zuvor hatte er eine Tetanusimpfung erhalten, bei der der Impfstoff vom Pferd gewonnen wurde (22). Ein weiterer Patient mit Multiplen Myelom entwickelte eine Gerinnungsstörung, weil das M-Protein als spezifischer Thrombin-Inhibitor wirkte (23). Viele weitere, hierzu analoge Publikationen unterstützen die Theorie einer chronischen Antigenstimulation (24-34), ohne allerdings einen endgültigen Beweis für Ihre Richtigkeit zu liefern.

Bei der ersten systematischen Suche nach möglichen antigenen Zielstrukturen von Paraproteinen mit Hilfe des SEREX-Verfahrens (Serologische Identifikation von Antigenen durch Rekombinantes Expressionsklonieren) wurden 6×10^8 Antigene auf Reaktivität mit 146 Seren von Patienten mit Multiplen Myelom oder MGUS getestet. Die cDNA-Bibliotheken stammten vom menschlichem Hoden-, Lungen- und Brustkrebsgewebe, sowie von boviner Muskulatur, Schweinemuskelzellen und Weizenkeimen. Es stellten sich insgesamt nur vier positive Reaktionen als M-Protein vermittelt heraus. Aufgrund der Vielfalt der endo- und exogenen Antigene gegen die

Paraproteine gerichtet waren, lag die Vermutung nahe, dass diese rein zufällig Zielstruktur wurden aber keinen kausalen Beitrag in der Pathogenese der Plasmazell Dyskrasien hatten (35). Untermauert wurde diese Annahme durch die Tatsache, dass keine bevorzugte Nutzung von V-Genen bei Patienten mit MM oder MGUS nachweisbar war (36, 37).

Schließlich gelang mit Hilfe eines Protein-Macroarray die Identifikation von Paratarg-7 (38). Es wurden Seren von 252 Patienten, die an einer MGUS oder einem MM erkrankt waren auf Reaktivität mit Paratarg-7 untersucht, wobei das Paraprotein entweder vom IgA- oder vom IgG-Typ war. 35 positive Reaktionen wurden beobachtet, was einem Anteil von 13,9% entspricht (39). Die Paraproteine von 11% der Patienten mit Morbus Waldenstroem und IgM-MGUS reagierten mit Paratarg-7 (40). Bei all diesen Patienten stellte sich Paratarg-7 als hyperphosphoryliert heraus, was auf die substratspezifische Inaktivierung der Phosphatase PPA2 zurückzuführen ist (41). Alle anderen Patienten mit MM, WM oder MGUS, die kein Paraprotein hatten das gegen Paratarg-7 gerichtet war, waren Träger der nicht hyperphosphorylierten Variante (39, 40).

In einer Kontrollgruppe, bestehend aus 200 gesunden Blutspendern, waren 2% Träger der hyperphosphorylierten Variante von Paratarg-7. Dies bedeutet, dass gesunde Träger von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 ein 7,9 faches erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MGUS und eines MM (39), beziehungsweise ein 6,2 faches erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer IgM-MGUS und eines WM haben (40). Diese Daten wurden anhand von Personen mit europäischer Abstammung bestimmt. Eine Untersuchung an japanischen Patienten und gesunden Blutspendern lieferte eine Odds Ratio von 13,1 für gesunde Träger von hyperphosphoryliertem Paratarg-7, an einer MGUS oder einem MM zu erkranken. In der afroamerikanischen Bevölkerung lag diese Odds Ratio bei 4,8. Bemerkenswert ist, dass in dieser ethnischen Gruppe 37% der untersuchten Patienten mit MM oder MGUS ein für Paratarg-7 spezifisches Paraprotein hatten, während es in der japanischen Gruppe nur 4,5% waren (42, 43). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Trägerschaft von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 in allen drei untersuchten Ethnien einen Risikofaktor für die Entstehung einer Plasmazell Dyskrasie darstellt und darauf

hindeutet, dass sie pathogenetisch durch eine chronische Antigenstimulation von Bedeutung ist.

Des Weiteren war damit erstmals eine Erklärung für das familiär gehäufte Auftreten von Plasmazell Dyskrasien möglich, da hyperphosphoryliertes Paratarg-7 autosomal dominant vererbt wird (39). Zusammen mit zehn weiteren Paratargs, die alle eine zusätzliche Phosphatgruppe tragen, bildet Paratarg-7 die so genannte Paratarg-Familie (44).

2.3 Die Identifikation und Charakterisierung von SUMOyliertem HSP90

Die Entdeckung von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 war nur möglich, da die entsprechenden Paraproteine eine Kreuzreaktion zeigen zwischen der Normalvariante und der hyperphosphorylierten Variante. Wäre das nicht der Fall, würden weitere antigene Zielstrukturen, die posttranslational verändert wurden, im konventionellen Protein-Macroarray nicht entdeckt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem eine in vitro posttranslationale Modifikation von Protein-Macroarrays möglich ist. Seit Kurzem ist bekannt wie ein SUMOylierungs-Komplex durch pETE12 und pRHSUMO in *Escherichia coli* übertragen werden kann (45). Unter Zuhilfenahme dieser Maschinerie wurden membrangebundene Proteine auf einem fötalen hirnbasierten Macroarray in vitro SUMOyliert. Bei dem folgenden Screening auf Reaktivität mit 40 Patientenseren (6 IgA, 31 IgG, 3 IgM) wurden sechs positive Signale registriert. Hierbei wurde SUMOyliertes HSP90 (HSP90-SUMO) als Zielstruktur von M-Proteinen identifiziert (46).

Diese antigene Zielstruktur lies sich näher klassifizieren als SUMOyliertes HSP90 β Isoform- α . Die Paraprotein-vermittelte Bindung an HSP90-SUMO ist spezifisch für die Bindung zwischen dem HSP90-Protein und dem Small Ubiquitin related MOdifier (SUMO)-Anteil, da die entsprechenden Paraproteine weder mit dem Wildtyp von HSP90 (wtHSP90) noch mit dem Wildtyp von SUMO1 (wtSUMO1) alleine reagierten. Da ebenfalls keine Reaktion für HSP90-SUMO2 noch für HSP90-SUMO3 nachweisbar waren, ist die M-Protein vermittelte Reaktion spezifisch für HSP90-SUMO1 (46).

Mittels ELISA wurde die Häufigkeit von HSP90-SUMO-spezifischen Paraproteinen in 226 europäischen Patienten, die an einer Plasmazell Dyskrasie erkrankt waren, bestimmt. Die entsprechenden Paraproteine verteilten sich wie folgt auf die verschiedenen Antikörperklassen: 31 IgA, 127 IgG und 28 IgM. Insgesamt wurden 27 positive Signale registriert, was einem prozentualen Anteil von 12% entspricht. Von den positiven Signalen entfielen 19% auf die IgA-Klasse, 65% auf die IgG-Klasse und 19% auf die IgM-Klasse. Die IgG3-Subklasse war mit 83% unter allen IgG-Paraproteinen, die spezifisch waren für HSP90-SUMO, die häufigste. Diese Beobachtungen wurden bei einer Verdünnung der Patientenserum von 1×10^7 gemacht. Bei einer Kontrolluntersuchung von 550 gesunden Blutspendern konnte selbst bei einer wesentlich kleineren Verdünnung von 1×10^2 kein HSP90-SUMO spezifisches M-Protein nachgewiesen werden. In dieser Population waren 0,9%, entsprechend 5 Personen, Träger von SUMOyliertem HSP90. Daraus errechnet sich ein 14,8 fach erhöhtes Risiko für Träger des HSP90-SUMO im Vergleich zu Trägern des Wildtyps, im Laufe ihres Lebens an einer MGUS, einem WM oder einem MM zu erkranken (siehe Tab.2) (46).

Analog wurden Untersuchungen in zwei weiteren ethnischen Gruppen durchgeführt. 11,2% der afroamerikanischen Patienten waren Träger von HSP90-SUMO und hatten auch ein entsprechendes Paraprotein. Da in der gesunden Kontrolle 2% Träger von HSP90-SUMO waren, ergibt sich für eben diese Personen ein 6,2 fach erhöhtes Risiko an einer Plasmazell Dyskrasie zu erkranken. In der Gruppe der japanischen Patienten waren 5,1% Träger von HSP90-SUMO. Diese Patienten hatten ebenfalls ein für HSP90-SUMO spezifisches Paraprotein. Die Prävalenz von HSP90-SUMO in der gesunden Kontrollgruppe lag bei 2%. Somit ergibt sich eine Odds Ratio von 7,4 (46).

Tab.2: Immunreaktivität und Trägerschaft von HSP90-SUMO bei Patienten und gesunden Kontrollen und die sich daraus errechnete Odds Ratio für die gesunde Population an einer Plasmazell dyskrasie zu erkranken (46).

| | Healthy controls | | | Patients | | | OR (95% CI) | P |
|-------------------|------------------|--|---------------|----------|--|---------------|------------------------|----------|
| | n | Immunoreactivity (at 1:10 ²) | Carrier state | n | Immunoreactivity (at 1:10 ²) | Carrier state | | |
| African-Americans | 100 | 0 | 2 (2%) | 80 | 9 (11.2%) | 9 (11.2%) | 6.2 (1.3021; 29.6280) | 0.0220 |
| Europeans | 550 | 0 | 5 (0.9%) | 226 | 27 (11.9%) | 27 (11.9%) | 14.8 (5.6177; 38.9331) | < 0.0001 |
| Japanese | 278 | 0 | 2 (0.8%) | 176 | 9 (5.1%) | 9 (5.1%) | 7.4 (1.5877; 34.8373) | 0.0109 |

Bei allen Patienten die Träger eines Paraproteins waren, das gegen SUMOyliertes HSP90 gerichtet ist, ließ sich in den Blutzellen nicht nur die SUMOylierte Variante nachweisen. Parallel existierte ebenfalls die Wildtypvariante (siehe Abb.1). Im Verhältnis gesehen war in B-Lymphozyten der HSP90-SUMO Typ stärker exprimiert, in allen anderen Zellen überwiegte der wtHSP90. Darüber hinaus ließ sich in Mukosazellen, die mittels Mundabstrichen bei Patienten mit einer Paraproteinämie gegen HSP90- SUMO gewonnen wurden, nur der wtHSP90 nachweisen (46).

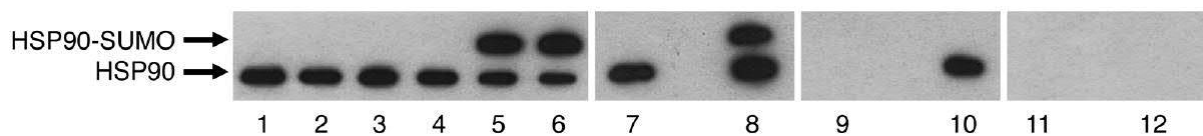


Abb.1: Vorkommen von wtHSP90 und HSP90-SUMO1 bei Patienten mit einem Paraprotein gegen HSP90-SUMO und einem Patienten mit einer Paraproteinämie anderer Spezifität sowie in gesunden Kontrollen. 1-6: Western Blot Analyse. Linie 1-3: Gesunde Kontrollen. Linie 4: Patient mit einem Paraprotein anderer Spezifität. Linie 5-6: Patienten mit einem Paraprotein gegen HSP90-SUMO. Linie 7-12: Immunpräzipitation mit anti-HSP90mAb und anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE. Linie 7, 9, 11: Patient mit einem Paraprotein anderer Spezifität. Linie 8, 10, 12: Patienten mit einem Paraprotein gegen HSP90-SUMO. Darstellung mittels anti-HSP90 in Linie 7-8, anti-SUMO1 in Linie 9-10, und anti-SUMO2/3 in Linie 11-12. (46).

Stammbaumanalysen von 3 Familien, bei denen ein Mitglied Träger von HSP90-SUMO und des dafür spezifischen Paraproteins war, zeigten dass die Trägerschaft von HSP90-SUMO autosomal dominant vererbt wird (siehe Abb.2). Da dies mit einem deutlich erhöhten Risiko verbunden ist, eine Plasmazelldyskrasie zu entwickeln, ist hiermit eine Erklärung für das familiär gehäufte Auftreten dieser Erkrankungen gefunden (46).

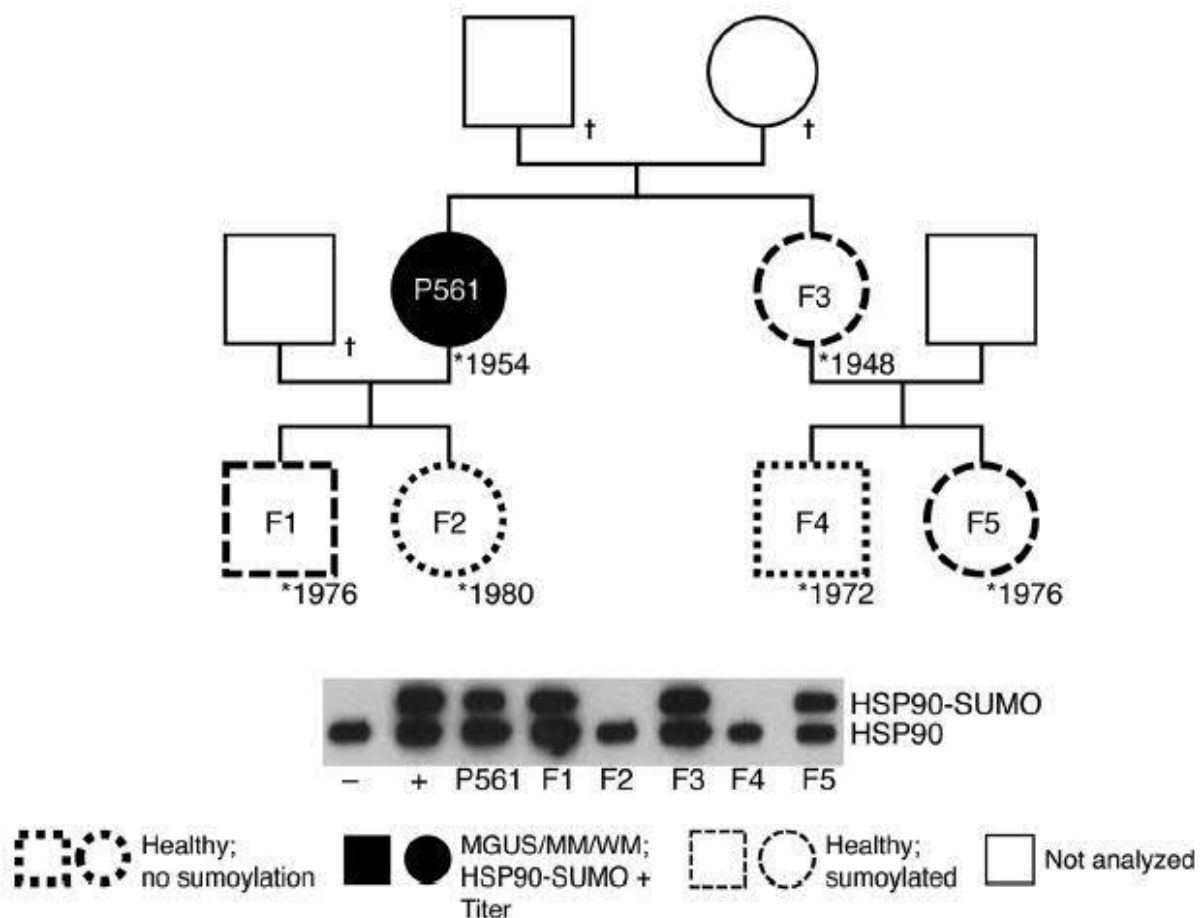


Abb.2: Stammbaum einer Familie mit einer HSP90-SUMO positiven Patientin und Western Blot Analyse der Familienmitglieder auf Trägerschaft von HSP90-SUMO. Die Geschwister P561 und F3 sind beide Träger von HSP90-SUMO, ein spezifisches Paraprotein dagegen ist nur bei P561 nachweisbar. In der nächsten Generation sind jeweils zwei Kinder Träger (F1 und F5) und zwei Kinder nicht Träger (F2 und F4) des veränderten Proteins (46).

Die Fragestellung, ob ein Sumoylierungs- oder ein Desumoylierungsdefekt vorliegt, ließ sich unter Zuhilfenahme einer Komplementationsanalyse klären. Nach der Inkubation von zellulären Enzymen eines gesunden Blutspenders mit den Zelllysaten der Blutzellen eines Trägers von HSP90-SUMO ließ sich anschließend nur noch wtHSP90 nachweisen (siehe Abb.3). Somit findet in der Regel eine Desumoylierung von HSP90 statt, welche bei Trägern von HSP90-SUMO inaktiv ist. Verantwortlich für die Desumoylierung von HSP90-SUMO ist die Sentrin-spezifische Protease 2 (SEN2). Dies zeigten Gen-Knockdown-Experimente mittels shRNA: Nur wenn SEN2 inhibiert war, wurde HSP90-SUMO nicht desumoyliert. Wurde HSP90-SUMO mit verschiedenen rekombinanten SENP Enzymen inkubiert, so war nur dann kein SUMO-Rest mehr nachweisbar, wenn der Versuch mit SENP2 durchgeführt wurde. Damit war die Schlussfolgerung untermauert, dass SENP2 verantwortlich ist für die Desumoylierung von HSP90-SUMO und dass eine Inaktivität dieses Enzyms die Trägerschaft von HSP90-SUMO bedingt. Ein Gendefekt auf DNA-Ebene wurde ausgeschlossen, ebenso wie mRNA- oder Proteinstrukturdefekte. Es lag ebenfalls keine Regulationsveränderung von anderen Sumo- und Desumoylierungs-Enzymen vor. Sowohl SENP2 von gesunden Kontrollen als auch von Patienten mit einem HSP90-SUMO spezifischen M-Protein spalteten das Indikatorsubstrat RanGAP (46).

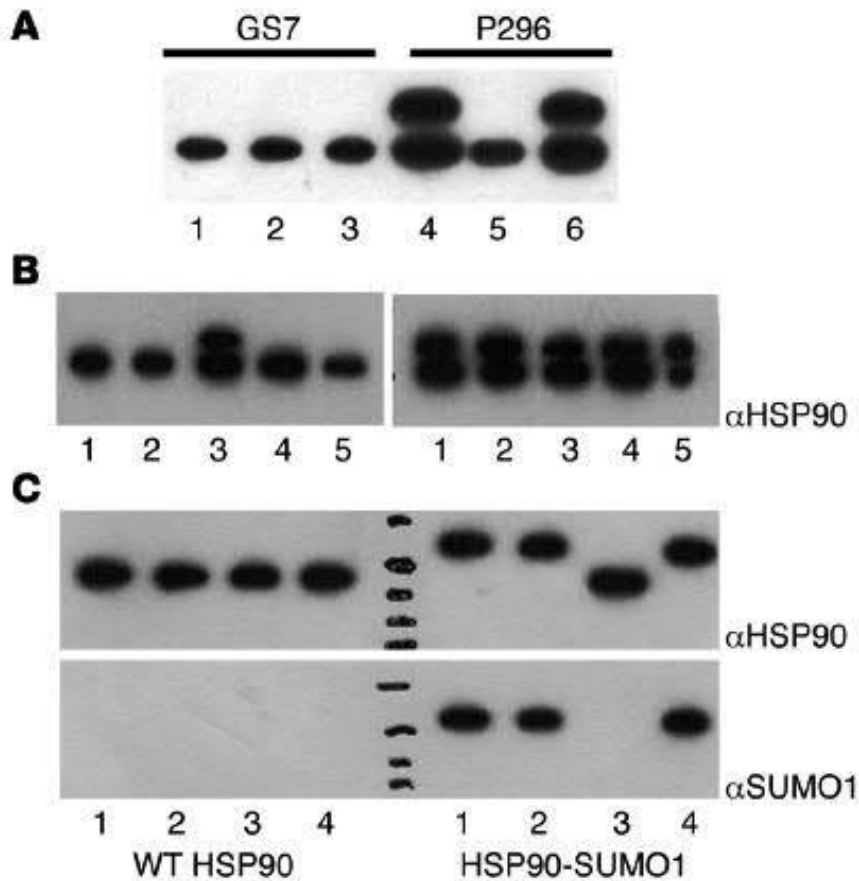


Abb.3: Nachweis des Desumoylierungsdefektes von HSP90-SUMO bei HSP90-SUMO positiven Patienten. A: Komplementationsanalyse. GS7 stellt Vollblutlysate eines gesunden Blutspenders dar, P296 die eines HSP90-SUMO positiven Patienten. Die obere Bande repräsentiert HSP90-SUMO, die untere Bande HSP90. Spur 1 und 4: Zelllysate plus Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Spur 2 und 5: Zelllysate plus gesunder Enzymextrakt. Spur 3 und 6: Zelllysate plus Patientenzym. Analyse mittels Western Blot und Darstellung durch anti-HSP90mAb. **B: Gen Knockdown.** Linker Block entspricht den Lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) eines gesunden Blutspenders, der rechte Block denen eines HSP90-SUMO positiven Patienten. Die obere Bande repräsentiert HSP90-SUMO, die untere Bande HSP90. Spur 1: Inkubation mit zerstörter shRNA. Spur 2: Inhibition von SENP1. Spur 3: Inhibition von SENP2. Spur 4: Inhibition von SENP3. Spur 5: Inhibition von SENP5. Analyse mittels Western Blot und Darstellung durch anti-HSP90mAb. **C: Western Blot.** Linker Block stellt rekombinantes wtHSP90 dar, der rechte Block HSP90-SUMO. Spur 1: Inkubation mit keinem SENP. Spur 2: Inkubation mit SENP1. Spur 3: Inkubation mit SENP 2. Spur 4: Inkubation mit SENP 3. Im oberen Abschnitt Darstellung mittels anti-HSP90 und im unteren Abschnitt durch anti-SUMO1 (46).

Eine Untersuchung der Prävalenz von HSP90-SUMO bei 190 Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen (siehe Tab.3) ergab mit 0,5% eine ähnliche Häufigkeit wie in der gesunden Population (46).

Tab.3: Prävalenz von HSP90-SUMO bei Autoimmunerkrankungen (46).

| Autoimmunerkrankungen | HSP90-SUMO Trägerschaft |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Rheumatoide Arthritis | 0/100 |
| Systemischer Lupus erythematodes | 0/30 |
| Polymyalgia rheumatica | 1/15 |
| Granulomatose mit Polyangiitis | 0/10 |
| Multiple Sklerose | 0/10 |
| Morbus Crohn | 0/10 |
| Churg-Strauss-Syndrom | 0/5 |
| SAPHO-Syndrom | 0/5 |
| Sjögren-Syndrom | 0/5 |
| gesamt | 1/190 [0,5%] |

2.4 Zielsetzung der Arbeit

HSP90-SUMO kommt bei 11,9% der kaukasischen Patienten, bei 11,2% afroamerikanischer Patienten und bei 5,1% der japanischen Patienten mit MGUS, MM oder WM vor. Bei gesunden Kontrollen war die Häufigkeit deutlich niedriger: 0,8% in der japanischen Gruppe, 0,9% bei Europäern und 2% bei Personen afroamerikanischer Herkunft (46). Das Vorkommen von HSP90-SUMO bei anderen onkologischen Erkrankungen war noch zu klären.

Ziel dieser Arbeit war es die Prävalenz von SUMOyliertem HSP90 bei hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren zu bestimmen. Hierbei wurden Patienten mit Colon-CA, Mamma-CA, Bronchial-CA, Prostata-CA und Malignem Melanom untersucht. Folgende hämatologische Krebsarten wurden getestet: Chronische myeloische Leukämie (CML), chronische lymphatische Leukämie (CLL), akute Leukämien und das folliculäre Lymphom sowie eine Gruppe anderer hämatologischer Erkrankungen.

3. Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vollblutlysate von insgesamt 499 Patienten mit verschiedenen hämatologischen und soliden Neoplasien auf das Vorhandensein von SUMOyliertem HSP90 mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes wurde vorher eingeholt. Die Proben wurden im Rahmen von diagnostischen oder routinemäßigen Blutentnahmen mit ausdrücklichem Einverständnis der Patienten gewonnen und bei -80° Celsius gelagert.

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tab.4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien.

| Reagenzien | Hersteller |
|---|------------------------------|
| Natriumcarbonat (Na_2CO_3) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt |
| TRIZMA Hydrochlorid | Merck, Darmstadt |
| TRIS | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| O-Phenylendiamin (OPD) | SigmaAldrich, St. Louis, USA |
| 30% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) | Merck, Darmstadt |
| 1,5% Gelantine | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |

Tab.5: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

| Antikörper | Hersteller |
|-------------------|-----------------------------------|
| anti-HSP90 | Biozol, Eching |
| P382 ger. | <i>aufgereinigtes Paraprotein</i> |
| anti-IgG3 | Binding Site, Birmingham, UK |
| anti-Schaf-POX | Roche, Mannheim |

Tab.6: Coating-Puffer

| | |
|---|---|
| <u>Lösung A</u> 1,06 g Na ₂ CO ₃ ad 50 ml a.dest. | <u>Lösung B</u> 0,84 g NaHCO ₃ ad 50 ml a.dest. |
| <u>Coating-Puffer</u> 1,7 ml Lösung A + 0,8 ml Lösung B + 7,5 ml a.dest. | |

Tab.7: Übersicht über die verwendeten Geräte.

| Gerät | Hersteller |
|----------------------------------|-----------------------|
| ELISA Platte, 96 Well, MaxisorpF | Nunc, Langensebold |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge | Eppendorf, Hamburg |
| Wallac ELISA Reader Victor2 1420 | PerkinElmer, Freiburg |

Tab.8: Blocklösung

| |
|---|
| <u>Blocklösung</u> 0,75 g Gelatine ad 50 ml a.dest. im Wasserbad bei 100°C. |
|---|

Tab.9: TBS/Tx100-Waschpuffer

| |
|--|
| <u>10x Stocklösung</u> 87,5 g NaCl 60,5 g TRISZMA Hydrochlorid 14 g TRIS ad 10 l a.dest. |
| <u>TBS-Waschpuffer</u> 1 l 10x Stocklösung + 10 ml Tx100 + 9 l a.dest. |

Tab.10: POX-OPD-Entwicklerlösung

| | |
|--|--|
| <u>Lösung A</u> 1,78 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O ad 50 ml a.dest. | <u>Lösung B</u> 1,05 g Citronensäure ad 50 ml a.dest. |
| <u>POX-OPD-Entwicklerlösung</u> 5 ml Lösung A + 5 ml Lösung B + 10 ml a.dest. + 2 Tabletten OPD + 10 µl 30% H ₂ O ₂ | |

3.2 Durchführung des ELISA

Zunächst wurde der Antikörper anti-HSP90 (siehe Tab.5) im Coating-Puffer (siehe Tab.6) mit einer Konzentration von 1:5000 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 µl dieser Antikörperlösung pro Well auf die ELISA-Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dadurch banden die Fc-Teile der Antikörper an den Boden der ELISA-Platte (siehe Abb.4).

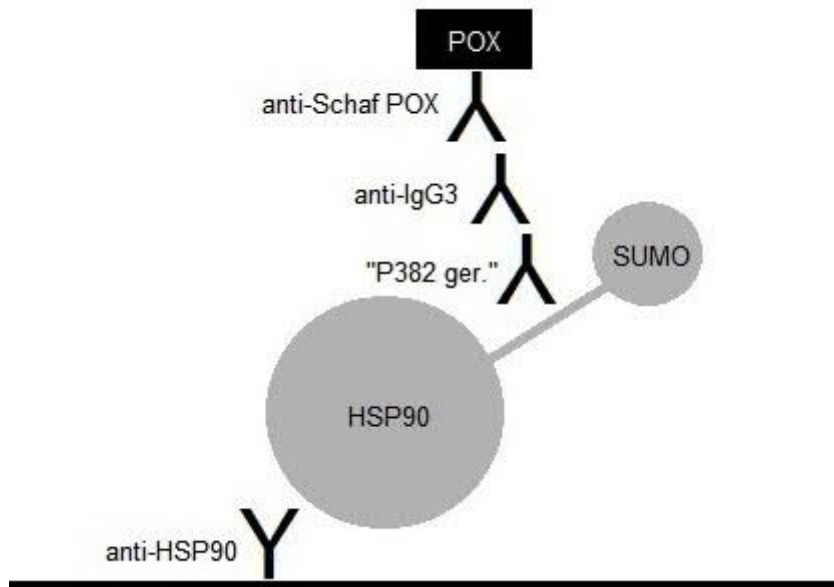


Abb.4: Schematische Darstellung des ELISA.

Am nächsten Tag wurde die 96-Well-Platte ausgeklopft, anschließend 100 µl/Well Blocklösung (siehe Tab.8) pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies hatte den Zweck, unspezifische Proteinbindungen zu verhindern.

In der Zwischenzeit wurden die Vollblutlysate im TBS/Tx100-Puffer (siehe Tab.9) mit einer Konzentration von 1:2 verdünnt. Hierzu wurden auf einer weiteren 96-Well-Platte jeweils 50 µl Vollblutlysate und 50 µl TBS/Tx100 pro Well gemischt. Das Endvolumen auf der Verdünnungsplatte entsprach somit 100 µl/Well.

Nach erneutem Ausklopfen der ELISA-Platten wurde das Gemisch aus Vollblutlysaten und TBS/Tx100 von der Verdünnungsplatte in die ELISA-Platten pipettiert. Das neue Endvolumen entsprach 45 µl/Well, sodass der Inhalt von einem Well aus der Verdünnungsplatte auf zwei Well in der ELISA-Platte aufgeteilt wurde. Zur Überprüfung wurden pro ELISA-Platte auch je zwei Positiv- und zwei Negativkontrollen verwendet. Während der Inkubationszeit von einer Stunde banden die Fab-Teile des Coating-Antikörpers das Protein HSP90, unabhängig davon, ob es SUMOyliert war oder nicht.

Im nächsten Schritt wurde die ELISA-Platte gründlich mit TBS/Tx100 gespült. Zur Detektion der SUMOylierten HSP90-Proteine wurde nun ein aufgereinigtes Paraprotein „P382 ger.“ verwendet, dessen Fab-Teil spezifisch ist für die Bindungsstelle des Proteins und dem SUMOyliertem Teil. So wurde gewährleistet dass nur SUMOyliertes HSP90 immunologisch markiert wurde. Die Verdünnung des Antikörpers lag bei 1:1000 in TBS/Tx100 mit einem Endvolumen von 50 µl/Well.

Nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten wurde die ELISA-Platte erneut mit TBS/Tx100 gewaschen. Im Anschluss wurde 50 µl anti-IgG3 Antikörperlösung, welche 1:5000 in TBS/Tx100 verdünnt war, pro Well hinzupipettiert. Der Fab-Teil dieses Antikörpers hat als spezifisches Epitop das Paraprotein „P382 ger.“. Auch dieser Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem Waschschrift mit TBS/Tx100, wurde der Antikörper anti-Schaf-POX 1:5000 verdünnt und anschließend 50 µl/Well pipettiert. Während der einstündigen Inkubation des Antikörpers wurde die POX-OPD-Entwicklerlösung angefertigt (siehe Tab. 10). Anschließend wurde die ELISA-Platte mit TBS/Tx100 gewaschen. Um die SUMOylierten HSP90 Proteine darzustellen, wurden 100 µl Entwicklerlösung pro Well hinzugefügt. Die POX, welche an den Antikörper gekoppelt ist, setzt die Entwicklerlösung in photometrisch messbare Bestandteile um. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 25 µl/Well Salzsäure abgestoppt. Zur Vermeidung von Messfehlern durch Lufteinschlüsse wurden die ELISA-Platten anschließend zentrifugiert. Die photometrische Auswertung fand mit Hilfe eines WallacReader bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Messzeit von 0,1 s/Well statt.

Als positiv wurde ein Wert größer als der dreifache Mittelwert der beiden Negativkontrollen definiert.

4. Ergebnisse

Es wurden je 50 Patienten mit Colon-CA, Mama-CA, Malignem Melanom, Bronchial-CA, Prostata-CA, follikulärem Lymphom, CML, CLL, akuter Leukämie und anderen hämatologischen Erkrankungen auf die Trägerschaft von HSP90-SUMO untersucht. (siehe Tab.11)

Tab.11: Übersicht über das Patientenkollektiv.

| | Geschlechterverteilung | Altersdurchschnitt |
|---|------------------------|--------------------|
| Colon-CA n=50 | 32 Männer 18 Frauen | 63,7 Jahre |
| Mamma-CA n=50 | 0 Männer 50 Frauen | 56 Jahre |
| Malignes Melanom n=50 | 28 Männer 22 Frauen | 60,7 Jahre |
| Bronchial-CA n=50 | 33 Männer 17 Frauen | 63,6 Jahre |
| Prostata-CA n=50 | 50 Männer 0 Frauen | 62,5 Jahre |
| follikuläres Lymphom n=50 | 24 Männer 26 Frauen | 62,2 Jahre |
| CML n=50 | 27 Männer 23 Frauen | 60,8 Jahre |
| CLL n=50 | 27 Männer 23 Frauen | 68,9 Jahre |
| akute Leukämie n=49 | 26 Männer 23 Frauen | 45,8 Jahre |
| andere hämatologische Erkrankungen n=50 | k.A. | k.A. |

Bei den akuten Leukämien musste eine Probe aufgrund eines zu geringen Volumens verworfen werden, wodurch sich eine Gesamtzahl von 49 statt 50 ergibt. Es entfallen 39 Proben auf die AML und 10 auf die ALL.

Bei den anderen hämatologischen Erkrankungen handelte es sich um Non-Hodgkin-Lymphome (n=12), M. Hodgkin (n=4), myeloproliferative Erkrankungen (n=6), myelodysplastische Syndrome (n=4), Osteosarkom (n=1), paroxysmale nächtliche

Hämoglobinurie (n=1), Haarzelleukämie (n=1), sowie um sonstige, nicht näher klassifizierte Blutbildveränderungen (n=21).

Die Untersuchung von insgesamt 499 Patienten mit unterschiedlichen hämato-onkologischen und onkologischen Erkrankungen auf das Vorhandensein von SUMOylierten HSP90 lieferte folgendes Ergebnis.

Im Kollektiv der soliden Neoplasien war jeweils ein Patient mit Colon-CA, ein Patient mit Mamma-CA und ein Patient mit Malignem Melanom Träger von HSP90-SUMO. In den Gruppen Bronchial-CA und Prostata-CA konnte kein SUMOyliertes HSP90 nachgewiesen werden (siehe Abb.5-9).

Im Kollektiv der hämatologischen Neoplasien war ein Patient von 50 Patienten mit CML Träger des SUMOylierten HSP90; dies entspricht 2%. Durchweg negativ getestet wurde die Gruppe CLL, akute Leukämien, follikuläres Lymphom und die Gruppe der anderen hämatologischen Erkrankungen (siehe Abb.10-14).

Die Häufigkeit von HSP90-SUMO bei allen untersuchten Patienten mit soliden Tumoren war 3/250, bzw. 1,2%. Die Untersuchung aller hämatologischen Neoplasien (n=249) lieferte ein positives Signal, entsprechend einer Prävalenz von 0,4%. Insgesamt betrachtet waren 4 Patienten von allen 499 untersuchten Patienten Träger von HSP90-SUMO. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz von 0,8% (siehe Tab.12).

Tab.12: Trägerschaft von HSP90-SUMO bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien.

| | HSP90-SUMO-Träger | wtHSP90-Träger | Σ |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|------------|
| Colon-CA | 1 [2%] | 49 [98%] | 50 |
| Mamma-CA | 1 [2%] | 49 [98%] | 50 |
| Malignes Melanom | 1 [2%] | 49 [98%] | 50 |
| Bronchial-CA | 0 [0%] | 50 [100%] | 50 |
| Prostata-CA | 0 [0%] | 50 [100%] | 50 |
| solide Tumoren | 3 [1,2%] | 247 [98,8%] | 250 |
| Follikuläres Lymphom | 0 [0%] | 50 [100%] | 50 |
| CML | 1 [2%] | 49 [98%] | 50 |
| CLL | 0 [0%] | 50 [100%] | 50 |
| akute Leukämie | 0 [0%] | 49 [100%] | 49 |
| andere hämatologische Erkrankungen | 0 [0%] | 50 [100%] | 50 |
| hämatologische Neoplasien | 1 [0,4 %] | 248 [99,6%] | 249 |
| gesamt | 4 [0,8%] | 495 [99,2%] | 499 |

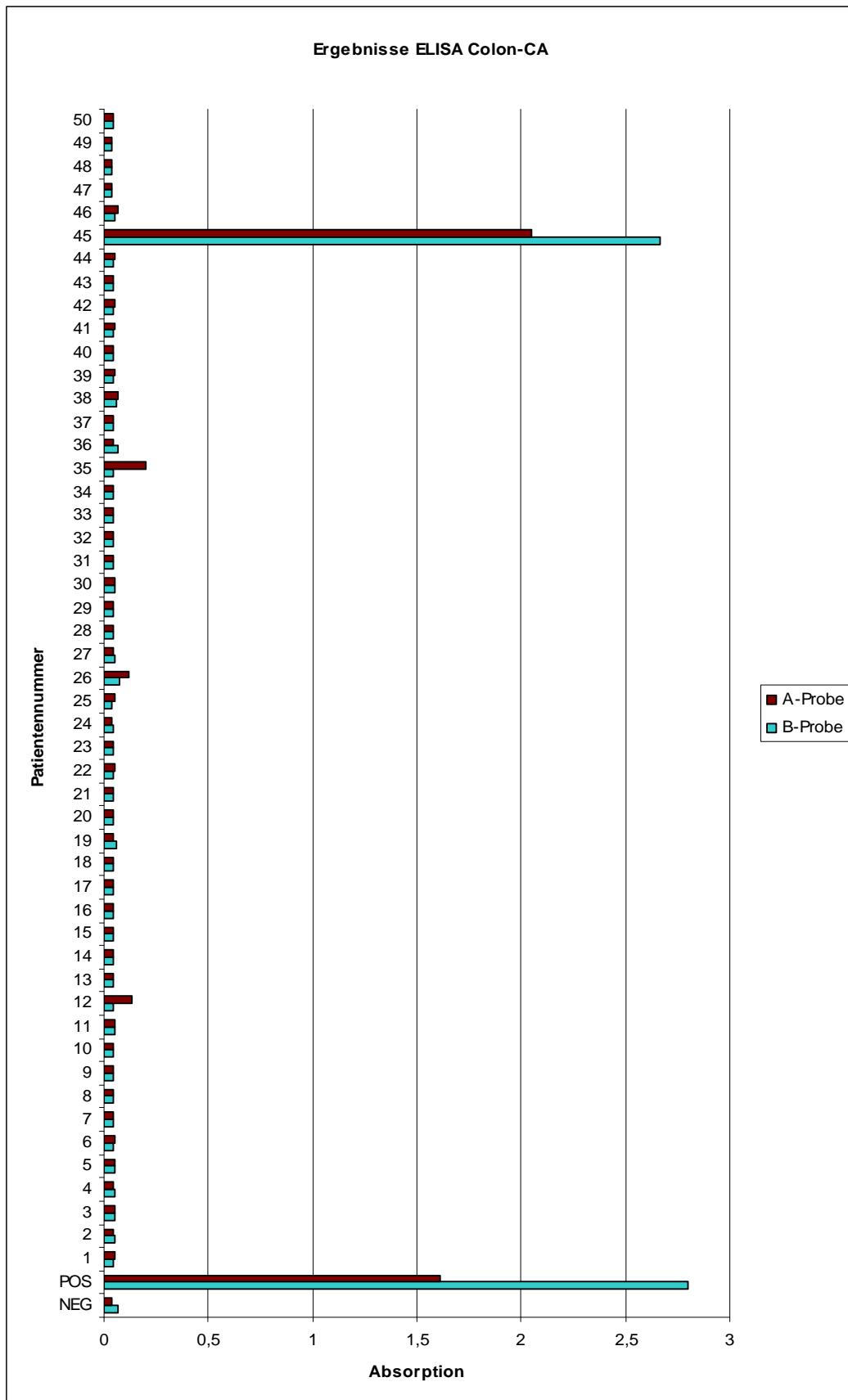


Abb.5: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Colon-CA. Von 50 Patienten mit Colon-CA war einer Träger dieses veränderten Proteins.

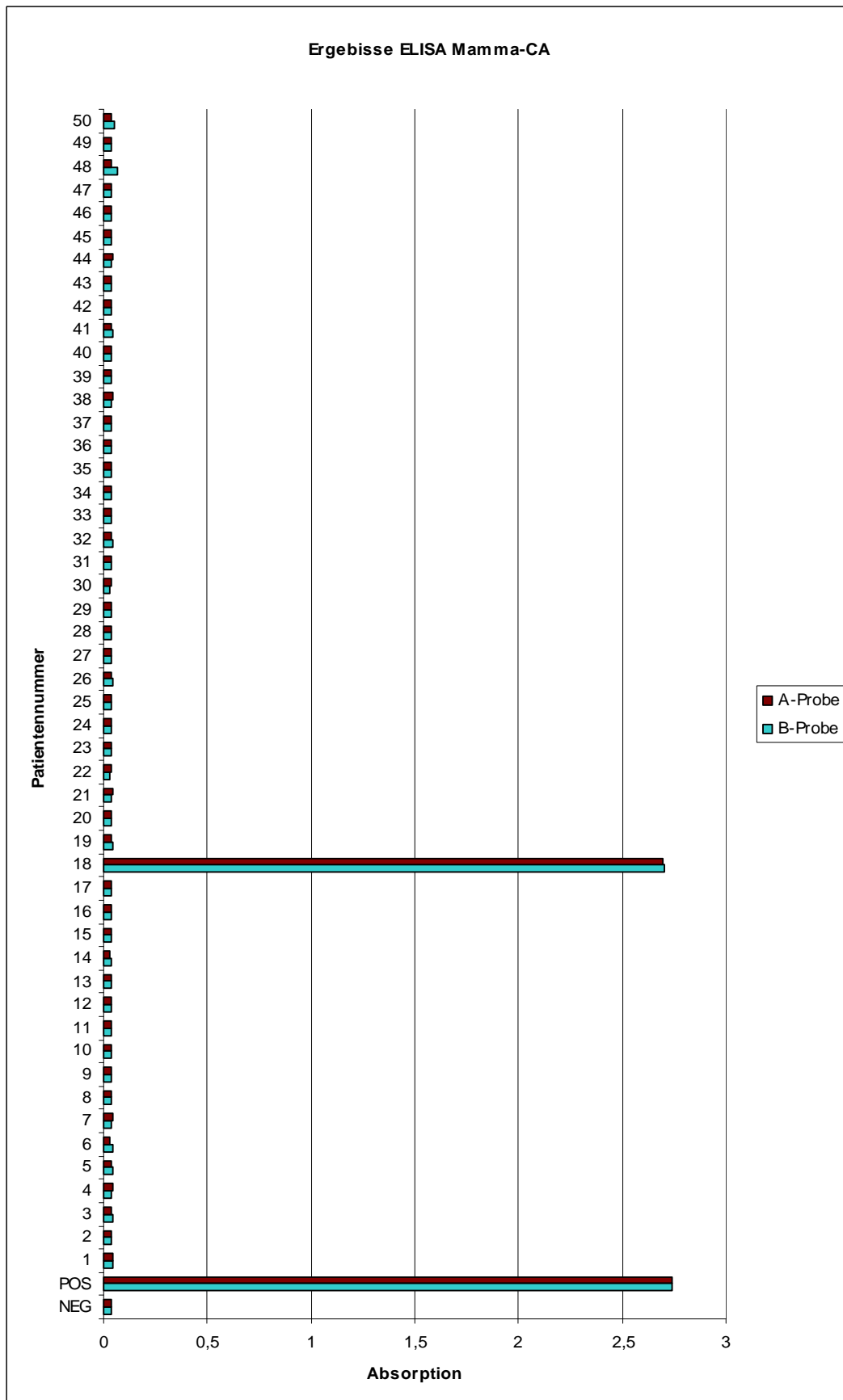


Abb.6: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Mamma-CA. Von 50 Patientinnen mit Mamma-CA war eine Trägerin dieses veränderten Proteins.

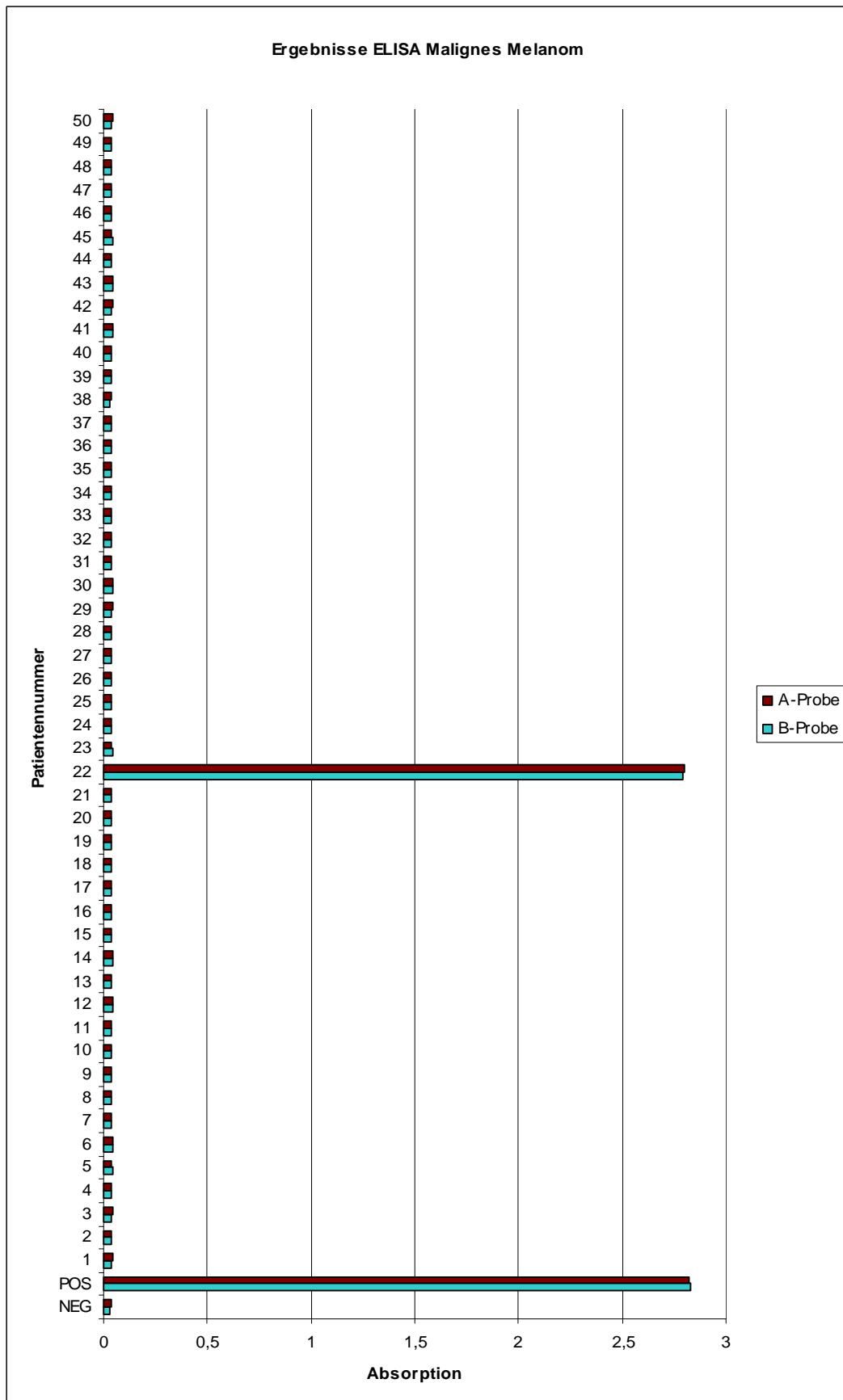


Abb.7: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Malignem Melanom. Von 50 Patienten mit Malignem Melanom war einer Träger dieses veränderten Proteins.

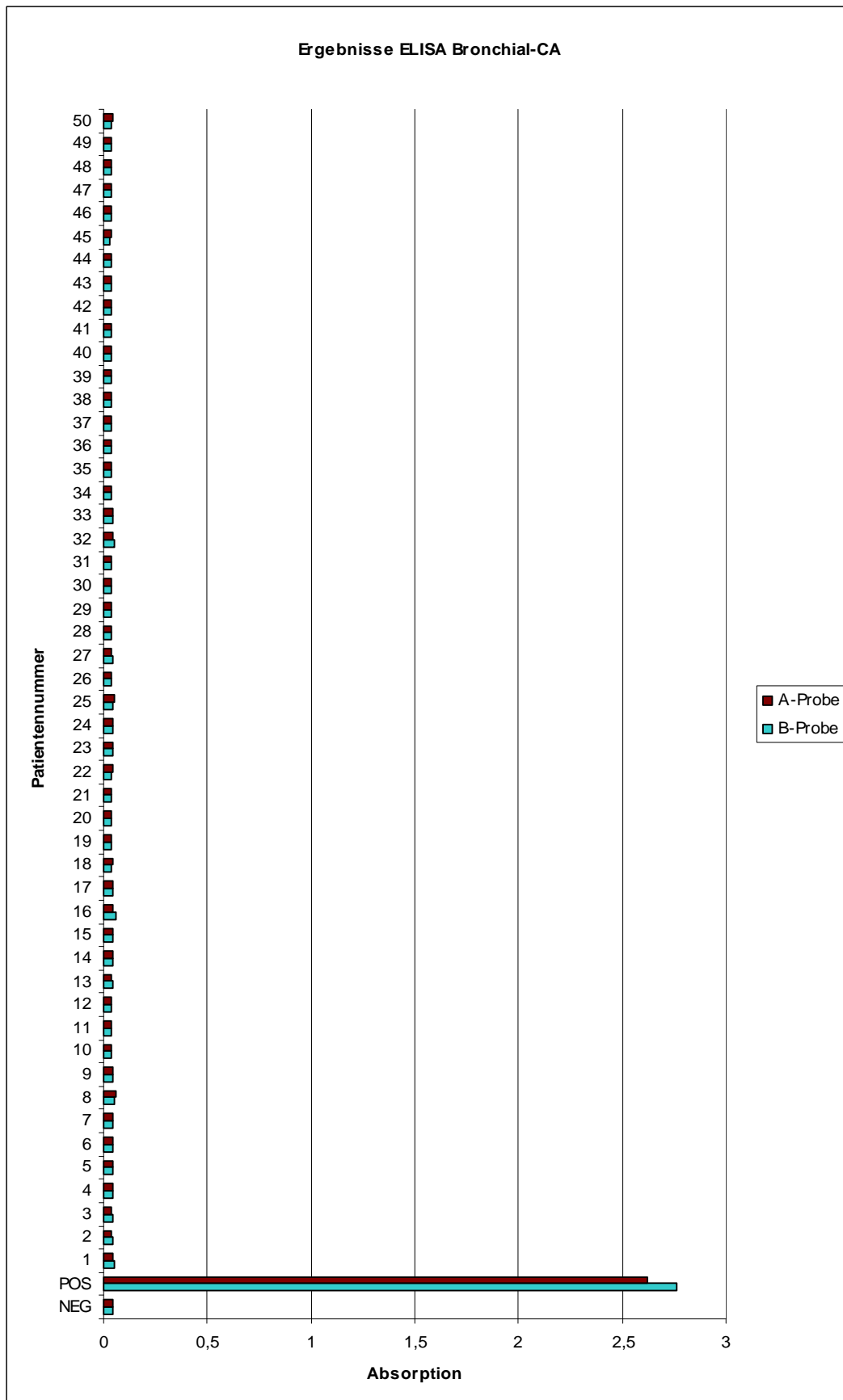


Abb.8: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Bronchial-CA. Von 50 Patienten mit Bronchial-CA war keiner Träger dieses veränderten Proteins.

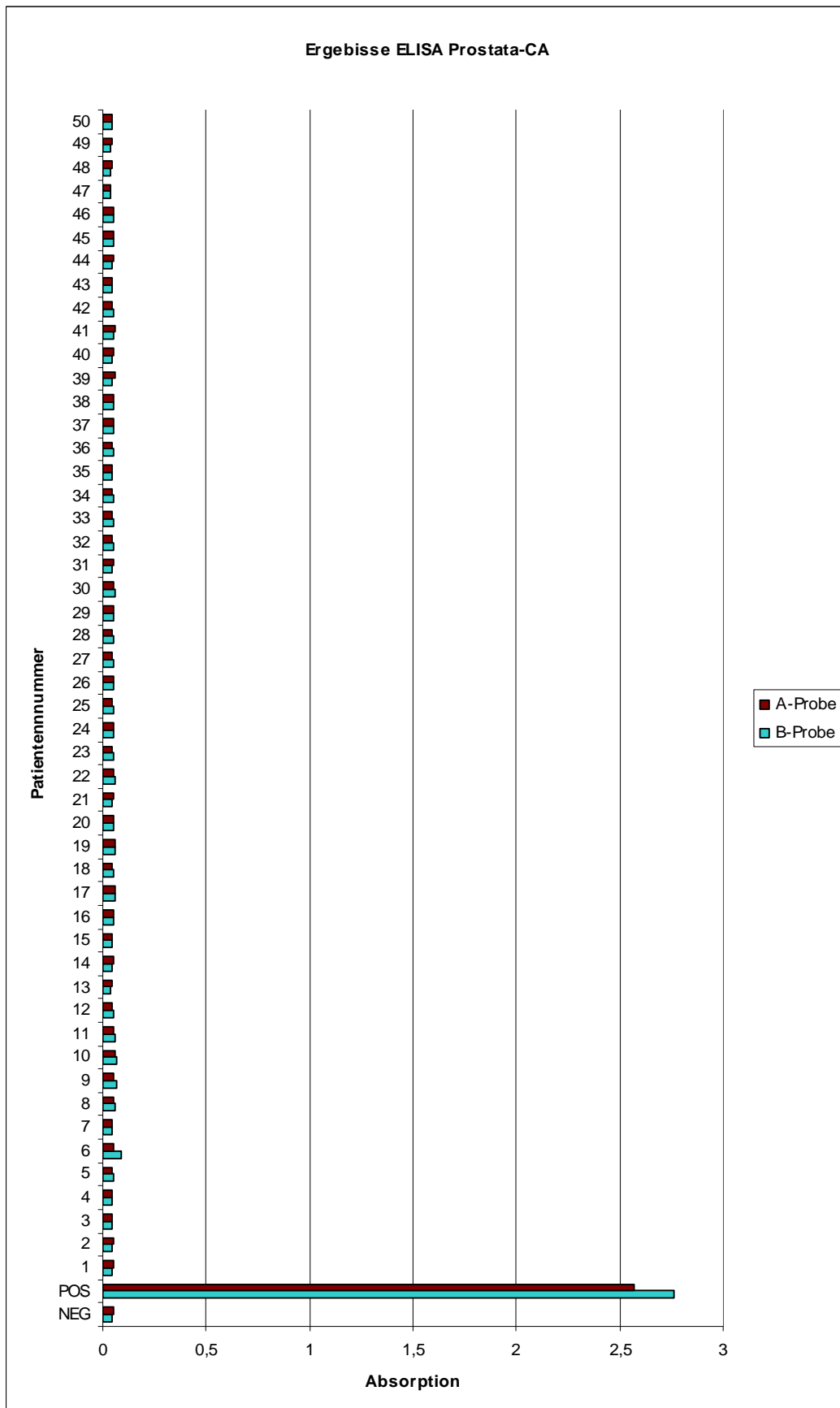


Abb.9: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Prostata-CA. Von 50 Patienten mit Prostata-CA war keiner Träger dieses veränderten Proteins.

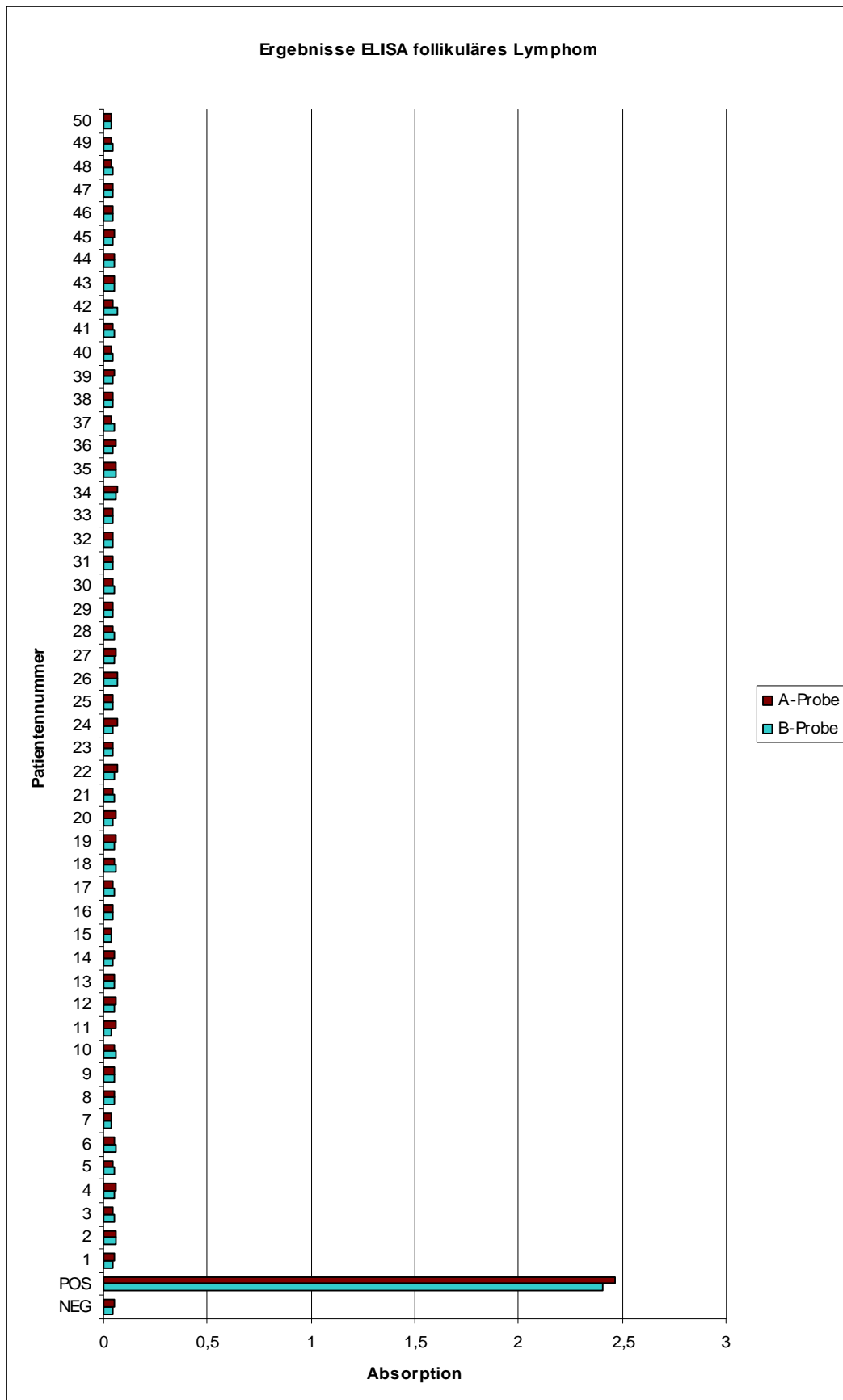


Abb.10: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei follikulärem Lymphom. Von 50 Patienten mit follikulärem Lymphom war keiner Träger dieses veränderten Proteins.

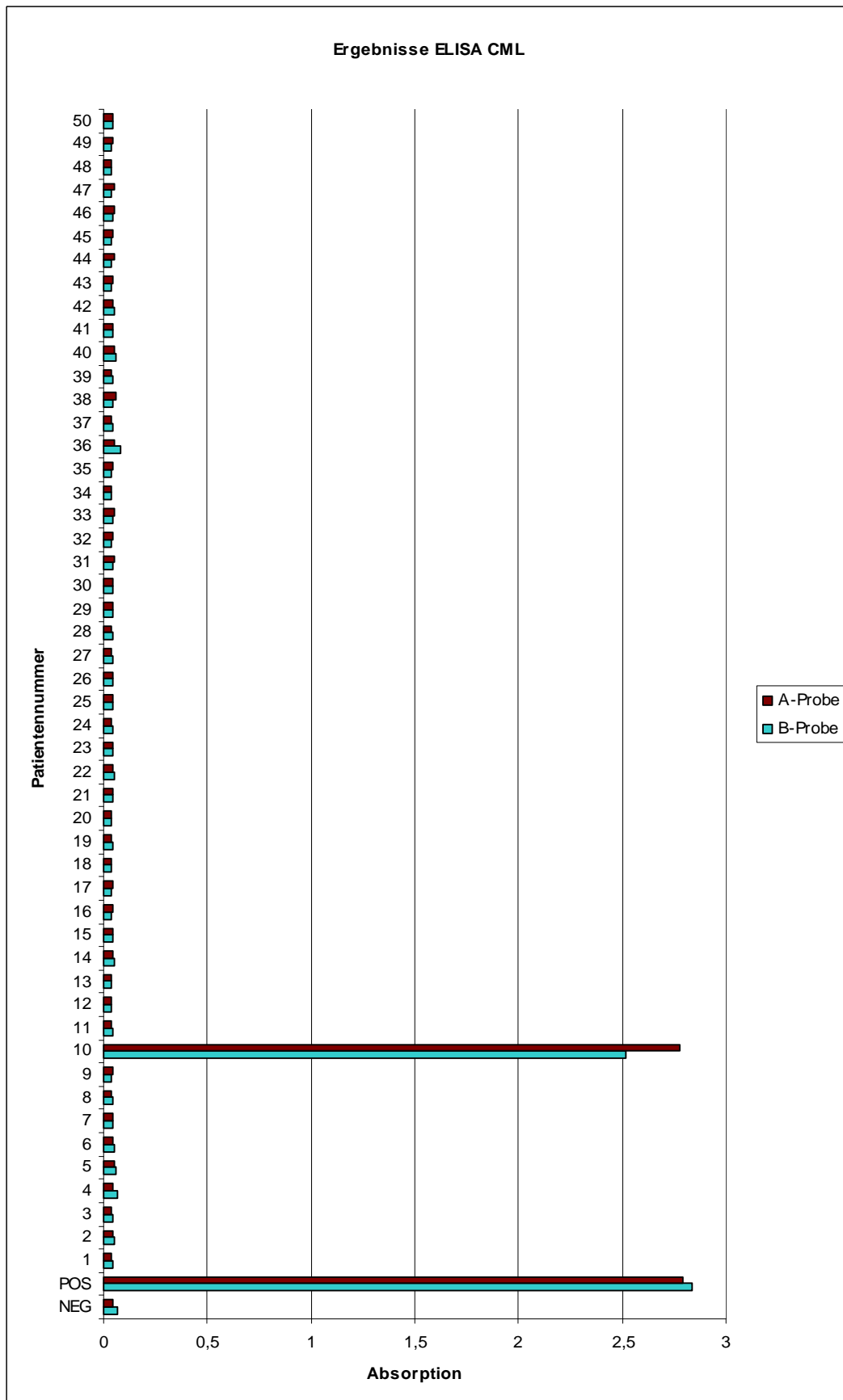


Abb.11: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei CML. Von 50 Patienten mit CML war einer Träger dieses veränderten Proteins.

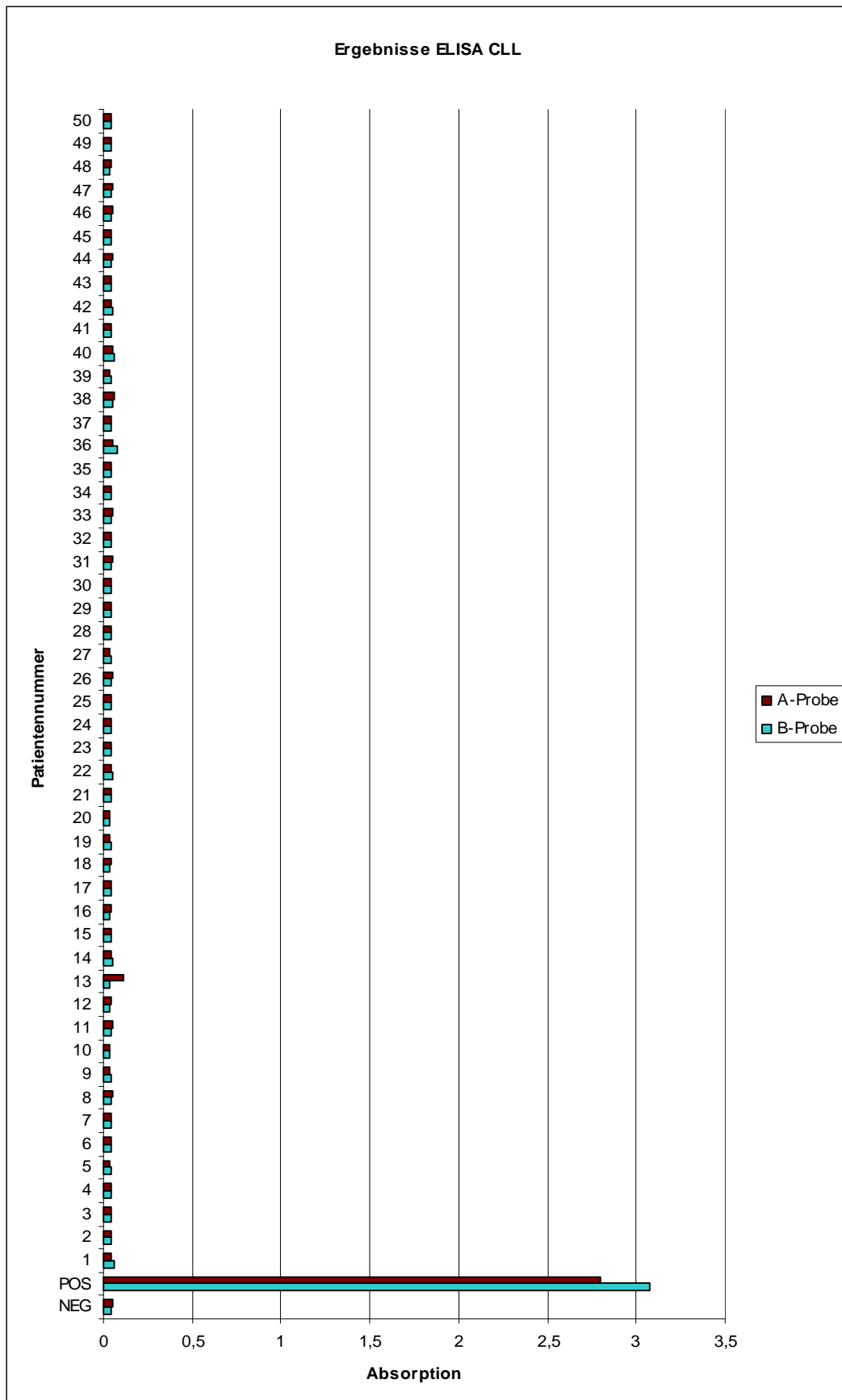


Abb.12: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei CLL. Von 50 Patienten mit CLL war keiner Träger dieses veränderten Proteins.

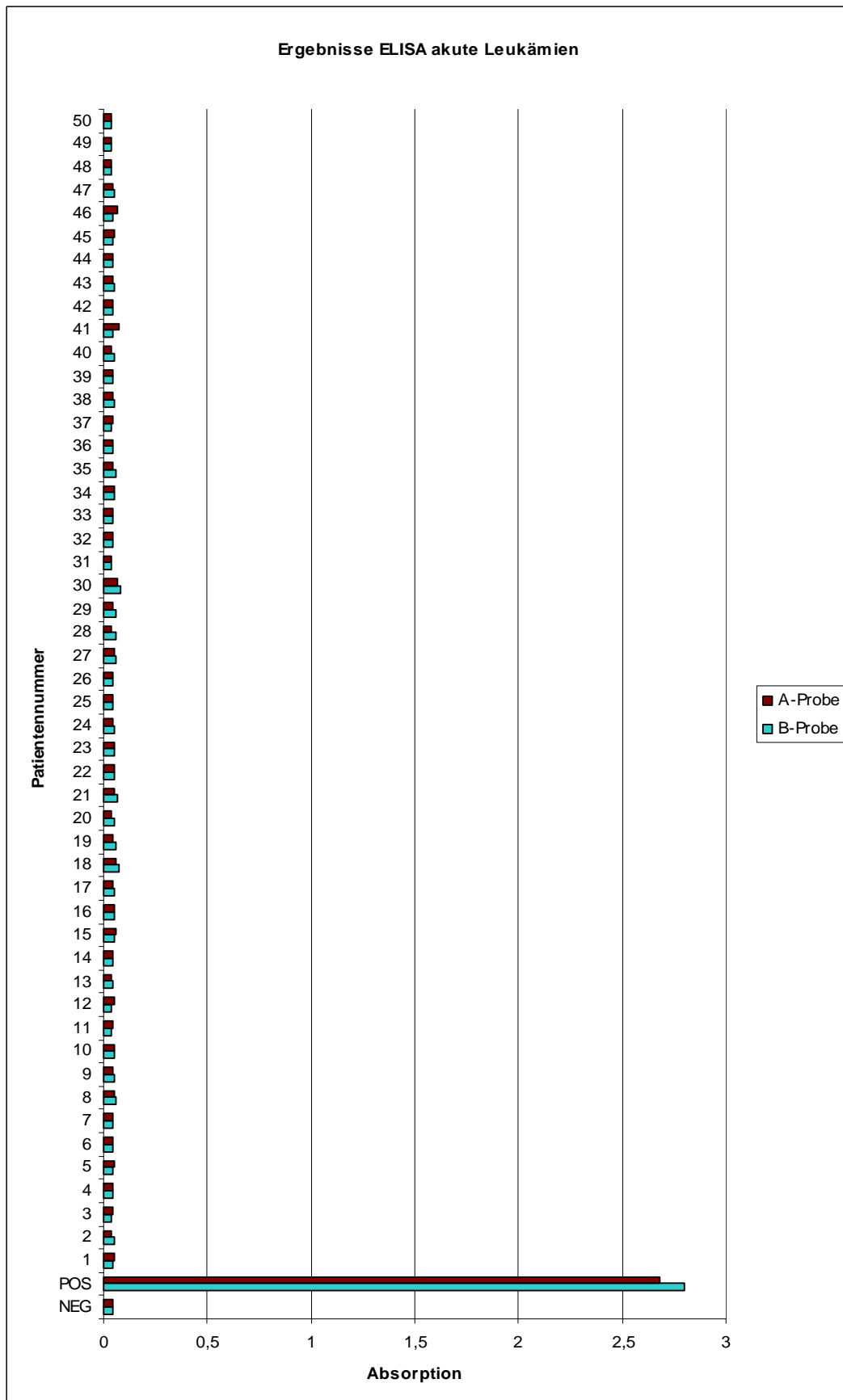


Abb.13: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei akuten Leukämien. Von 49 Patienten mit akuten Leukämien war keiner Träger des veränderten Proteins. Probe Nr. 4 war eine Negativkontrolle.

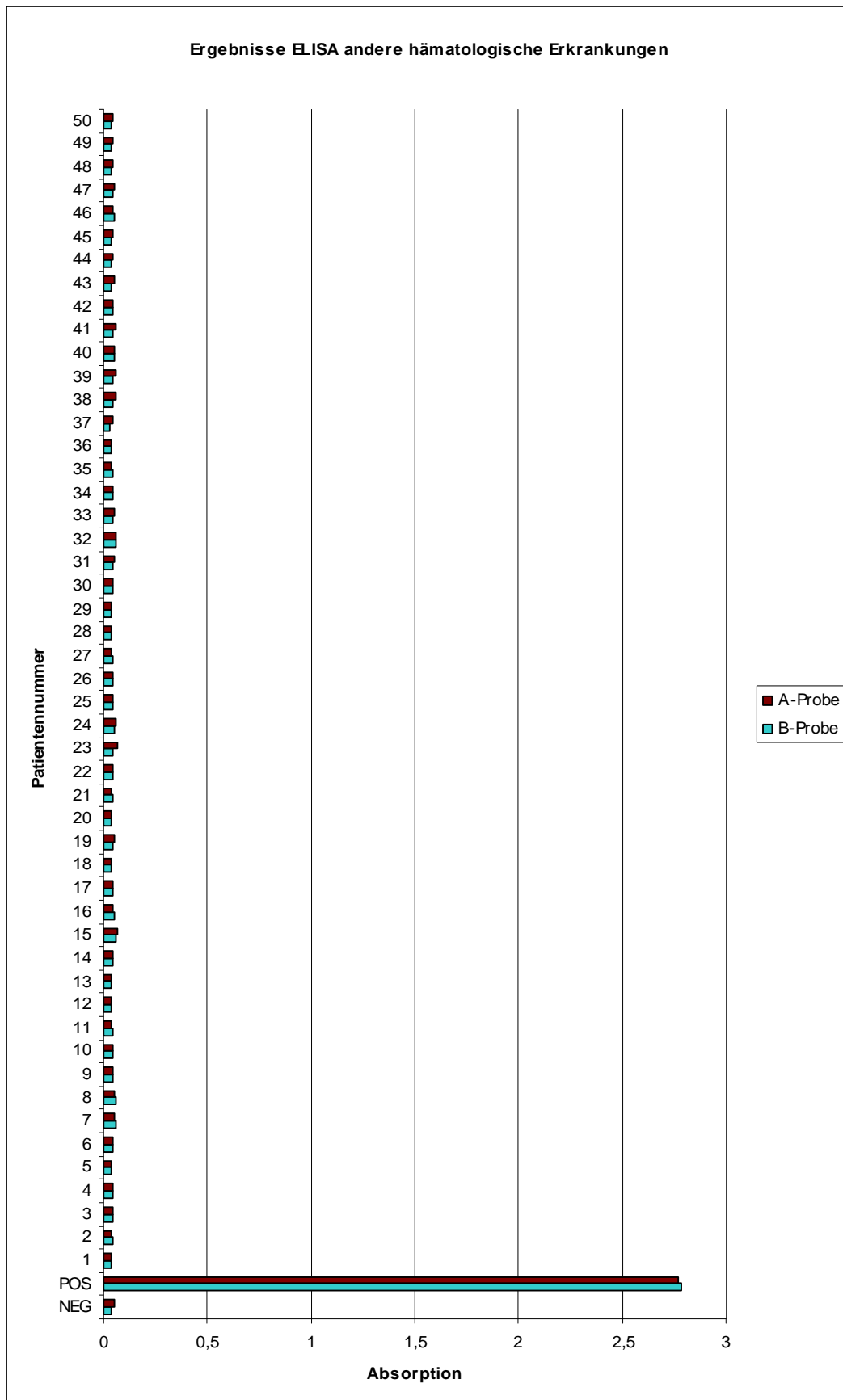


Abb.14: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei anderen hämatologischen Erkrankungen. Von 50 Patienten mit anderen hämatologischen Erkrankungen war keiner Träger dieses veränderten Proteins.

5. Diskussion

SUMOyliertes HSP90 ist nach hyperphosphoryliertem Paratarg-7 der zweite molekulare Risikofaktor für die Entwicklung einer Plasmazell Dyskrasie. Bei der genaueren Untersuchung zeigte sich, dass die paraproteinäre Reaktion spezifisch ist für die HSP90 β Isoform- α , welche an Position K559 SUMO1 gebunden hat. Die Prävalenz von HSP90-SUMO war bei europäischen Patienten mit 11,9% am größten, gefolgt von 11,2% bei Patienten afroamerikanischer Abstammung und 5,1% bei japanischen Patienten. Alle Erkrankten, die Träger von HSP90-SUMO waren, hatten auch ein dagegen gerichtetes M-Protein. Umgekehrt war ein solches M-Protein auch nur dann vorhanden, wenn der entsprechende Patient Träger von HSP90-SUMO war. Somit ergibt sich ein deutlich erhöhtes Risiko für gesunde Träger von HSP90-SUMO an einer MGUS, einem MM oder einem WM zu erkranken. Die Odds Ratio für gesunde europäische Träger des modifizierten Proteins lag bei 14,8 für Afroamerikaner bei 6,2 und für Japaner bei 7,4. Es besteht die Möglichkeit, dass dieses Risiko sogar noch höher ausfällt, da das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe 26 Jahre unter dem der Patientengruppe liegt. Wenn ein Teil der gesunden Träger von HSP90-SUMO im weiteren Verlauf eine Plasmazell Dyskrasie entwickelt, würde die Odds Ratio weiter ansteigen (46).

Eine positive Familienanamnese ist ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung einer MGUS und eines MM, wie Landgren et al. zeigten (4). Als erster erblicher Risikofaktor konnte hyperphosphoryliertes Paratarg-7 identifiziert werden (39). Da die Trägerschaft von HSP90-SUMO autosomal dominant vererbt wird, stellt sie eine weitere mögliche Erklärung für das familiär gehäufte Auftreten von Plasmazell Dyskrasien dar. Es ist zu beachten, dass auch wenn HSP90-SUMO ein starker Risikofaktor ist, nicht alle Träger erkranken werden. Unter der Annahme dass eine Weitergabe von HSP90-SUMO an die nächste Generation aber trotzdem stattfindet besteht die Möglichkeit, dass die Zahl der familiären Erkrankungen, die auf HSP90-SUMO zurückzuführen sind, noch höher anzusehen ist. Um dies zu klären müssen auch Verwandte zweiten und dritten Grades von Patienten mit einem HSP90-SUMO spezifischen Paraprotein in zukünftigen Studien auf die Trägerschaft von HSP90-SUMO untersucht werden (46).

Ursache für die zusätzliche SUMO Gruppe ist ein Desumoylierungsdefekt, der auf eine spezifische Inhibition von SENP2 zurückzuführen ist. Den genauen Mechanismus der dahinter steht gilt es noch zu klären. Da Veränderungen auf DNA- und mRNA-Ebene sowie Abweichungen der Enzymstruktur ausgeschlossen wurden, müssen andere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Dazu gehören eine Verschiebung von HSP90-SUMO in ein anderes Zellkompartiment oder eine sterische Inhibition von SENP2 durch HSP90-SUMO (46).

Das Hitzeschockprotein 90 ist ein dimeres Chaperon, bei dem je Untereinheit drei Domänen zu differenzieren sind. Die N-terminale Domäne enthält ein Nucleotid bindendes Epitop, die Middle Domain ist zuständig für die ATP Hydrolyse und die C-Terminale Domäne, deren Aufgabe in der Vermittlung der Dimerisation liegt (47). HSP90 ist ein essentieller Bestandteil der eukaryotischen Zelle. Es ist verantwortlich für die korrekte Faltung, die strukturelle Überwachung und Regulation von zytosolischen Proteinen. Bemerkenswert ist, dass eine Reihe seiner Substrate in zellulären Signalwegen und der Zellzykluskontrolle aktiv sind (48). Insbesondere auch für Tumorzellen scheint HSP90 von existentieller Bedeutung zu sein (49). Vorklinische Studien konnten zeigen, dass eine Inhibition von HSP90 bei malignen Melanomen, der AML, bei Prostata-CA, Mamma-CA und nichtkleinzelligem Lungen-CA, sowie auch beim Multiplen Myelom eine anti-neoplastische Wirkung hat (50). Bei CML sprechen Patienten mit einem niedrigeren HSP90 besser auf die Therapie an, wohingegen Patienten mit hohem HSP90 in der Leukozyten-Population eine schlechtere Prognose hatten (51). Auch bei primären Mamma-CA ist ein hohes HSP90 mit kürzerem Überleben assoziiert (52).

Die SUMOylierung ist eine Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen, welche verschiedenste Funktionen erfüllt. Es ist bekannt, dass genetische Instabilität, insbesondere das Auftreten von Doppelstrangbrüchen, das Entartungsrisiko einer Zelle erhöht. Dem entgegen wirkt die DNA Repair Response (DRR), und Sumoylierungsprozesse scheinen eine wichtige Rolle in der Koordination der DRR zu spielen (53). Ein weiteres Beispiel ist der Transportmechanismus vom Zellkern in das Zytosol bzw. aus dem Zytosol in den Kern, der durch den Nuclear Pore Complex (NPC) vermittelt wird, zu dem die GTPase RAN gehört. RAN selbst wird reguliert durch RANGAP1, dieses ist am NPC im Gegensatz zum Zytosol nur in

SUMOylierter Form nachweisbar. Gleiches gilt auch für die Beteiligung von RANGAP1 am Spindelapparat während der Mitose (54, 55).

Auch HSP90, dessen Cochaperone und auch dessen Substrate unterliegen diversen posttranslationalen Modifikationen. Dies hat teilweise und insbesondere bei Phosphorylierungen einen hohen Einfluss auf die HSP90 Aktivität und Funktion (56). Erst kürzlich wurde bekannt, dass eine asymmetrische SUMOylierung von HSP90 an K191 zu einer erhöhten Affinität des Cochaperons Aha1 zu HSP90 führt. Gleichzeitig kommt es zur Rekrutierung kompetitiver Inhibitoren der ATP-Bindungsstelle (57). Inwiefern die SUMOylierung von HSP90 an K559 Einfluss auf die Aktivität, Funktion oder Regulation hat gilt es noch zu klären. Eine eventuelle pathogenetische Beteiligung an der Entstehung von Plasmazell Dyskrasien durch zum Beispiel Veränderungen von zellulären Signalwege ist möglich. In diese Überlegungen muss aber auch die Tatsache mit einbezogen werden, dass Träger von HSP90-SUMO nicht nur das modifizierte Protein haben, sondern auch große Mengen an wtHSP90 (46).

HSP90-SUMO könnte aber auch in anderer Art und Weise an der Entstehung von MGUS, MM und WM beteiligt sein, zum Beispiel in der Rolle einer chronischen Antigenstimulation. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass posttranslationale Modifikationen die Autoimmunogenität von Proteinen steigern können. Dies ist unter anderem bei Phosphoepitopen bekannt, die eine stärkere CD4+ und CD8+ T-Zellreaktion induzieren können als die äquivalenten nicht phosphorylierten Epitope (58, 59). Beispiele für die Autoimmunogenität von posttranslational modifizierten Proteinen sind Autoantikörper gegen citrullinierte Peptide (Anti-citrullinated-peptide/protein-antibodies, ACPA) bei Rheumatoider Arthritis (60) oder Immunglobuline gegen MAG (Myelin-associated glykoprotein) bei chronischer inflammatorischer Polyneuropathie (61). Aber nicht nur bei Autoimmunerkrankungen, sondern auch bei B-Zellneoplasien ist dies ein bekanntes Phänomen. So wurden beispielsweise bei CLL Patienten Antikörper gegen oxidiertes LDL beschrieben (62). Die Proteine der Paratarg Familie, welche paraproteinäre Zielstruktur bei MM und WM wurden, sind gekennzeichnet durch eine Hyperphosphorylierung (44). Auch zusätzliche SUMO-Gruppen können die Autoimmunogenität steigern. Janka et al. berichteten, dass zur Generierung von Autoantikörper gegen PML und Sp100 bei der

primär biliären Zirrhose die SUMOylierung jener Strukturen unabdingbar ist (63). Daraus kann die Folgerung gezogen werden, dass die SUMOylierung von HSP90 ein wesentlicher Grund für die Induzierung der entsprechenden dagegen gerichteten Paraproteinämie ist.

Ein weiterer Punkt von herausragender Bedeutung ist die Tatsache, dass M-Proteine gegen HSP90-SUMO und auch gegen Paratarg-7 keine Einzelfälle sind. Zusammen decken sie etwa ein Viertel aller europäischen Patienten ab, in der Gruppe der Afroamerikanischen Erkrankten beinahe die Hälfte (39, 46). Die Höhe der Prävalenz unterstützt die Theorie der chronischen Antigenstimulation bei der Pathogenese der Plasmazelldyskrasien und schließt eine rein zufällige Zielerfassung durch Paraproteine mit hoher Wahrscheinlichkeit aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prävalenz von HSP90-SUMO bei ausgewählten hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren untersucht. In der Gruppe der hämatologischen Neoplasien war ein Patient von 50 Patienten mit CML Träger des SUMOylierten HSP90; dies entspricht 2%. Durchweg negativ getestet wurde die Gruppe CLL, akute Leukämien, follikuläres Lymphom und die Gruppe der anderen hämatologischen Erkrankungen. Im Kollektiv der soliden Tumore waren jeweils 2%, entsprechend 1 Patient von 50 Patienten pro Gruppe, positiv getestet in der Gruppe Colon-CA, Mamma-CA und der Gruppe Malignes Melanom. Alle Patienten in der Gruppe Prostata-CA und Bronchial-CA waren negativ für HSP90-SUMO. Somit gibt es keinen Hinweis darauf, dass SUMOyliertes HSP90 bei all diesen onkologischen Erkrankungen gehäuft vorkommt, da die Frequenz mit 0,8% der in der Normalbevölkerung entspricht. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Trägerschaft von HSP90-SUMO eine spezifische Veränderung bei Plasmazelldyskrasien ist. Es unterstreicht den pathogenetischen Ursprung der Monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz, des Multiplen Myeloms und des Morbus Waldenstroem in Form der chronischen Antigenstimulation. Und darüber hinaus lässt sich folgern, dass SUMOyliertes HSP90 kein Phänomen ist das im Allgemeinen mit der Entstehung von Neoplasien vergesellschaftet ist.

Eine genauere Untersuchung der chronischen Antigenstimulation ist notwendig, um den Pathomechanismus der Autoimmunogenität von HSP90-SUMO bei Plasmazell Dyskrasien besser zu verstehen. Vor Kurzem wurde über die Rolle von CD4+ T-Helferzellen in Patienten mit einem Paratarg-7 spezifischen Paraprotein berichtet. Bei 9 von 14 Patienten konnte eine HLA-DR spezifische T-Zellreaktion auf hyperphosphoryliertes Paratarg-7 gezeigt werden. Diese Reaktion könnte zu einer unmittelbaren monoklonalen Proliferation von B-Zellen führen. Die Grundvoraussetzung hierfür sind die Trägerschaft von hyperphosphoryliertem Paratarg-7 und eine HLA-DR Subtyp, der in der Lage ist, das veränderte Protein zu erkennen und zu präsentieren (64). Eine hierzu analoge Rolle von CD4+ T-Zellen bei Patienten mit einem HSP90-SUMO spezifischen Paraprotein ist denkbar. Auch die parallele Existenz von HSP90-SUMO und wtHSP90 in Patienten mit einer PCD ist hiermit vereinbar. Eine chronische Antigenstimulation durch HSP90-SUMO ist somit wesentlich wahrscheinlicher als ein pathogenetischer Beitrag durch Veränderungen von zellulären Signalwegen. Neben der Klärung des Pathomechanismus der Autoimmunogenität muss die genetische Grundlage für den substratspezifischen Desumoylierungsdefekt bei Trägern von HSP90-SUMO identifiziert werden, um die Ätiologie der PCD bei Patienten mit einem HSP90-SUMO spezifischen Paraprotein zu klären.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.
- (2) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis criteria of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 2014; 15:538-548
- (3) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.
- (4) 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;23:1691-7.
- (5) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-9.
- (6) Schaar CG, le CS, Snijder S, Franck PF, Wijermans PW, Ong C, et al. Long-term follow-up of a population based cohort with monoclonal proteinaemia. *Br J Haematol* 2009;144:176-84.
- (7) Blade J, Cibeira MT, Fernandez de LC, Rosinol L. Multiple myeloma. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii313-vii319.
- (8) Blade J, Rosinol L, Cibeira MT. Are all myelomas preceded by MGUS? *Blood* 2009;113:5370.
- (9) Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:110-5.
- (10) Treon SP, Morel P, Leblond V, Femand JP. Report of the Third International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma* 2005;5:215-6.
- (11) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2008.
- (12) Vijay A, Gertz MA. Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2007;109:5096-103.
- (13) Gertz MA, Kyle RA. Hyperviscosity syndrome. *J Intensive Care Med* 1995;10:128-41.

- (14) Kwaan HC, Bongu A. The hyperviscosity syndromes. *Semin Thromb Hemost* 1999;25:199-208.
- (15) Nobile-Orazio E. IgM paraproteinaemic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2004;17:599-605.
- (16) Levine T, Pestronk A, Florence J, Al-Lozi MT, Lopate G, Miller T, et al. Peripheral neuropathies in Waldenstrom's macroglobulinaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:224-8.
- (17) Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Moulopoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldenstrom's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol* 2000;18:214-26.
- (18) Civit T, Coulbois S, Baylac F, Taillandier L, Auque J. [Waldenstrom's macroglobulinemia and cerebral lymphoplasmocytic proliferation: Bing and Neel syndrome. Apropos of a new case]. *Neurochirurgie* 1997;43:245-9.
- (19) Verret JL, Leclech C, Rousselet MC, Hurez D, Schnitzler L. [Schnitzler syndrome and Waldenstrom disease. Fatal outcome of the original case]. *Ann Dermatol Venereol* 1993;120:459-60.
- (20) 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;111:3388-94.
- (21) 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;328:1817-9.
- (22) Seligmann M, Sassy C, Chevalier A. A human IgG myeloma protein with anti- 2 macroglobulin antibody activity. *J Immunol* 1973;110:85-90.
- (23) Colwell NS, Tollefsen DM, Blinder MA. Identification of a monoclonal thrombin inhibitor associated with multiple myeloma and a severe bleeding disorder. *Br J Haematol* 1997;97:219-26.
- (24) Jack HM, Beck-Engeser G, Lee G, Wofsy D, Wabl M. Tumorigenesis mediated by an antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8482-6.
- (25) Friedman DF, Cho EA, Goldman J, Carmack CE, Besa EC, Hardy RR, et al. The role of clonal selection in the pathogenesis of an autoreactive human B cell lymphoma. *J Exp Med* 1991;174:525-37.
- (26) Seligmann M, Brouet JC. Antibody activity of human myeloma globulins. *Semin Hematol* 1973;10:163-77.
- (27) Mills LE, Brettman LR, Jentoft JE, Viner ED, Bernier GM. Crystalloxyoglobulinemia resulting from human monoclonal antibodies to albumin. *Ann Intern Med* 1983;99:601-4.

- (28) Dellagi K, Brouet JC, Perreau J, Paulin D. Human monoclonal IgM with autoantibody activity against intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:446-50.
- (29) Braun PE, Frail DE, Latov N. Myelin-associated glycoprotein is the antigen for a monoclonal IgM in polyneuropathy. *J Neurochem* 1982;39:1261-5.
- (30) Kritzman J, Kunkel HG, MCCarthy J, Mellors RC. Studies of a Waldenstrom-type macroglobulin with rheumatoid factor properties. *J Lab Clin Med* 1961;57:905-17.
- (31) Kilgore LL, Patterson BW, Parenti DM, Fisher WR. Immune complex hyperlipidemia induced by an apolipoprotein-reactive immunoglobulin A paraprotein from a patient with multiple myeloma. Characterization of this immunoglobulin. *J Clin Invest* 1985;76:225-32.
- (32) Redmon B, Pyzdrowski KL, Elson MK, Kay NE, Dalmaso AP, Nuttall FQ. Hypoglycemia due to an insulin-binding monoclonal antibody in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1992;326:994-8.
- (33) Trimarchi F, Benvenga S, Fenzi G, Mariotti S, Consolo F. Immunoglobulin binding of thyroid hormones in a case of Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:1045-50.
- (34) Dighiero G, Guilbert B, Femand JP, Lymberi P, Danon F, Avrameas S. Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin, and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. *Blood* 1983;62:264-70.
- (35) Preuss KD, Held G, Kubuschok B, Hung CZ, Malatsidze N, Wagner M, 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;121:459-61.
- (36) Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood* 1997;89:219-26.
- (37) Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Zoi K, Belessi C, Viniou N, et al. Origin and diversification of the clonogenic cell in multiple myeloma: lessons from the immunoglobulin repertoire. *Leukemia* 2000;14:1718-26.
- (38) Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Murawski N, et al. A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int J Cancer* 2009;125:656-61.
- (39) Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Pfoehler C, 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;10:950-6.

- (40) Grass S, Preuss KD, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Nikolaus D, 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;117:2918-23.
- (41) Preuss KD, Pfreundschuh M, Fadle N, Regitz E, Raudies S, Murwaski N, et al. Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 2011;118:3340-6.
- (42) Grass S, Iida S, Wikowicz A, Preuss KD, Inagaki A, Shimizu K, et al. Risk of Japanese carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasms, to develop monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Cancer Sci* 2011;102:565-8.
- (43) Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S, et al. Over one-third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. *Int J Cancer* 2014;135:934-8.
- (44) Grass S, Preuss KD, Thome S, Weisenburger DD, Witt V, Lynch J, et al. Paraproteins of familial MGUS/multiple myeloma target family-typical antigens: hyperphosphorylation of autoantigens is a consistent finding in familial and sporadic MGUS/MM. *Blood* 2011;118:635-7.
- (45) Mencia M, de L, V. Functional transplantation of the sumoylation machinery into *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2004;37:409-18.
- (46) Preuss KD, Pfreundschuh M, Weigert M, Fadle N, Regitz E, Kubuschok B. Sumoylated HSP90 is a dominantly inherited plasma cell dyscrasias risk factor. *J Clin Invest* 2015;125:316-23.
- (47) Harris SF, Shiau AK, Agard DA. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure* 2004;12:1087-97.
- (48) Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1640-8.
- (49) Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:537-49.
- (50) Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:742-55.
- (51) Zackova M, Mouckova D, Lopotova T, Ondrackova Z, Klamova H, Moravcova J. Hsp90 - a potential prognostic marker in CML. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50:184-9.
- (52) Pick E, Kluger Y, Giltnane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:2932-7.

- (53) Pinder JB, Attwood KM, Dellaire G. Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair. *Front Genet* 2013;4:45.
- (54) Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1996;135:1457-70.
- (55) Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 1997;88:97-107.
- (56) Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:648-55.
- (57) Mollapour M, Bourboulia D, Beebe K, Woodford MR, Polier S, Hoang A, et al. Asymmetric Hsp90 N domain SUMOylation recruits Aha1 and ATP-competitive inhibitors. *Mol Cell* 2014;53:317-29.
- (58) Mohammed F, Cobbold M, Zarling AL, Salim M, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, et al. Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for the presentation of transformed self. *Nat Immunol* 2008;9:1236-43.
- (59) Meyer VS, Drews O, Gunder M, Hennenlotter J, Rammensee HG, Stevanovic S. Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands. *J Proteome Res* 2009;8:3666-74.
- (60) Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:203.
- (61) Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem* 2007;100:1431-48.
- (62) Lanemo MA, Hellqvist E, Sidorova E, Soderberg A, Baxendale H, Dahle C, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 2008;111:3838-48.
- (63) Janka C, Selmi C, Gershwin ME, Will H, Sternsdorf T. Small ubiquitin-related modifiers: A novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:609-16.
- (64) Neumann F, Pfreundschuh M, Preuss KD, Schormann C, Zwick C, Murawski N, Kuboschok B. CD4+ T cells in chronic autoantigenic stimulation in MGUS, multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Invest* 2015; 137:1076-1084

7. Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Tab.1: Übersicht über die Endorganschäden ROTI (myeloma- related organ or tissue impairment), unterteilt in CRAB Kriterien (calcium, renal insufficiency, anaemia, bone lesions) und weitere Endorganschäden, sowie die erweiterten Myelom-definierende Ereignisse gemäß der International Myeloma Working Group.

Tab.2: Immunreaktivität und Trägerschaft von HSP90-SUMO bei Patienten und gesunden Kontrollen und die sich daraus errechnete Odds Ratio für die gesunde Population an einer Plasmazeldyskrasie zu erkranken.

Tab.3: Prävalenz von HSP90-SUMO bei Autoimmunerkrankungen.

Tab.4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien.

Tab.5: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Tab.6: Coating-Puffer

Tab.7: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Tab.8: Blocklösung

Tab.9: TBS/Tx100-Waschpuffer

Tab.10: POX-OPD-Entwicklerlösung

Tab.11: Übersicht über das Patientenkollektiv.

Tab.12: Trägerschaft von HSP90-SUMO bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien.

Abb.1: Vorkommen von wtHSP90 und HSP90-SUMO1 bei Patienten mit einem Paraprotein gegen HSP90-SUMO und einem Patienten mit einer Paraproteinämie anderer Spezifität sowie in gesunden Kontrollen.

Abb.2: Stammbaum einer Familie mit einer HSP90-SUMO positiven Patientin und Western Blot Analyse der Familienmitglieder auf Trägerschaft von HSP90-SUMO.

Abb.3: Nachweis des Desumoylierungsdefektes von HSP90-SUMO bei HSP90-SUMO positiven Patienten.

Abb.4: Schematische Darstellung des ELISA.

Abb.5: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Colon-CA.

Abb.6: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Mamma-CA.

Abb.7: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Malignem Melanom.

Abb.8: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Bronchial-CA.

Abb.9: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei Prostata-CA.

Abb.10: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei follikulärem Lymphom.

Abb.11: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei CML.

Abb.12: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei CLL.

Abb.13: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei akuten Leukämien.

Abb.14: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des ELISA zum Nachweis von SUMOyliertem HSP90 bei anderen hämatologischen Erkrankungen.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| BCR | B-Zellrezeptor |
| CA | Karzinom |
| CLL | Chronisch Lymphatische Leukämie |
| CML | Chronisch Myeloische Leukämie |
| DRR | DNA Repair Response |
| ELISA | Enzyme- linked Immunosorbent Assay |
| HSP90 | Hitzeschockprotein 90 |
| KM | Knochenmark |
| LCL | Lymphoblastoide Zelllinien |
| LPL | Lymphoplasmozytisches Lymphom |
| MAG | Myelin-associated glykoprotein |
| MDE | Myelom-definierenden Ereignisse |
| MGUS | Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz |
| MM | Multiplres Myelom |
| NPC | Nuclear Pore Complex |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCD | plasma cell dyscracia |
| PNP | Polyneuropathie |
| POX | Peroxidase |
| SEN2 | Sentrin-spezifische Protease 2 |
| SEREX | Serologische Identifikation von Antigenen durch Rekombinantes Expressionsklonieren |
| SUMO | Small Ubiquitin Related Modifier |
| WM | Morbus Waldenstroem |
| wtHSP90 | Wildtyp HSP90 |
| wtSUMO | Wildtyp SUMO |

9. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit auf dem Gebiet der klinischen Hämatologie und Onkologie zu promovieren.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Klaus-Dieter Preuss für die hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht der Arbeit sowie Frau Natalie Fadle, die mich in die praktischen Labortätigkeiten eingeführt hat und mir bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich besonders bei allen Patienten bedanken, die an dieser Studie teilgenommen haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, für ihre Unterstützung und die Ermöglichung einer guten Ausbildung.