

Aus der Abteilung Versorgungsepidemiologie und Community Health
(Leiter Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Hoffmann)
dem Institut für Community Medicine
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Hoffmann)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Untersuchung zur Prävalenz und Frequenz von zirkulierenden t(14;18) positiven Zellen in Abhängigkeit von NHL assoziierten Risikofaktoren in einer populationsbasierten Querschnittstudie

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Wissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2015

vorgelegt von: Kerstin Weitmann
geb. am: 14.12.1980
in: Demmin

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Hoffmann, MPH
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Bandt
3. Gutachter: PD Dr. Schulz
Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum P01.37/38 Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin
Tag der Disputation: 07.01.2016

Vorbemerkung

Dieser kumulativen Dissertation liegen die Artikel

Hirt C*, Weitmann K*, Schüler F, Kiefer T, Rabkin CS, Hoffmann W, Dölken G. Circulating t(14;18)-Positive Cells in Healthy Individuals - Association with Age and Sex but not with Smoking. LEUKEMIA & LYMPHOMA. 2013; 54(12):2678-2684.

Weitmann K*, Hirt C, Schwarz S, Rabkin CS, Dölken G, Hoffmann W. Influence of reproductive history and exogenous hormone use on prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in a population-based cross sectional study. CANCER, CAUSES & CONTROL. 2015 Mar;26(3):455-65.

zugrunde. Beide Artikel sind im Anhang dieser Arbeit eingebunden. Der Artikel erschienen in Leukemia & Lymphoma unterliegt den Copyright-Bestimmungen des Verlages Informa Healthcare, der Artikel erschienen in Cancer, Causes & Control unterliegt den Copyright-Bestimmungen des Springer Verlages.

(* Erstautor)

Inhalt

Vorbemerkung	I
Inhalt	II
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.1.1 Immunsystem und Antikörper.....	1
1.1.2 T(14;18) Translokation.....	2
1.1.3 Non-Hodgkin-Lymphome.....	5
1.1.4 T(14;18) Translokation bei Gesunden.....	6
1.2 Fragestellung.....	7
1.2.1 Rauchen	7
1.2.2 Einfluss der weiblichen Sexualhormone.....	7
2 Methoden	10
2.1 Study of Health in Pomerania (SHIP-0)	10
2.2 Daten zur Exposition	12
2.2.1 Rauchstatus.....	12
2.2.2 Reproduktive Faktoren und exogene Hormonanwendung.....	12
2.3 Biomaterialienanalyse.....	13
2.4 Statistische Methoden	14
3 Ergebnisse	16
3.1 Assoziation der t(14;18) Translokation mit Rauchen.....	16
3.2 Assoziation der t(14;18) Translokation mit weiblichen Sexualhormonen.....	16
4 Diskussion	17
4.1 Stärken und Schwächen der Studien	18
4.2 Schlussfolgerung	18

5 Zusammenfassung.....	20
Literatur.....	21
Anhang	26
A.1 Wissenschaftliche Artikel	26
A.2 Publikationsliste	54
A.3 Danksagung	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Chromosomen 14 und 18 sowie der t(14;18) Translokation.....	4
Abbildung 2 Studienregion der Study of Health in Pomerania	11

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

1.1.1 Immunsystem und Antikörper

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Eliminierung von körperfremden Stoffen, wie z. B. Bakterien, Viren und Pilzen sowie von fehlerhaft gewordenen körpereigenen Zellen. An der Wirkung des Immunsystems sind vorrangig die Stammzellen im Knochenmark, die lymphatischen Gewebe (z. B. Thymus, Milz, Lymphknoten), die unterschiedlichen weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und die von den B-Lymphozyten produzierten Antikörper (Immunglobuline) beteiligt. Die Lymphozyten gehören zu den Leukozyten und differenzieren sich in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen.

Unterschieden wird in das angeborene und adaptive Immunsystem. Die angeborene Immunantwort ist in der Erbinformation kodiert und entfaltet ihre Wirkung durch anatomische und physiologische Barrieren und wirkt Erreger unspezifisch.

Das adaptive Immunsystem vermittelt unter Beteiligung von T- und B-Lymphozyten eine gegenüber neuen oder veränderten Erregern angepasste Antwort. B-Lymphozyten werden im Knochenmark und später in den lymphatischen Geweben gebildet. Aus ihnen differenzieren sich nach Antigenkontakt antikörperbildende Zellen oder Gedächtniszellen, welche eine spezifische Abwehrreaktion ermöglichen. Die T-Lymphozyten werden primär im Thymus gebildet. Sie übernehmen die zellvermittelte Immunantwort und unterstützen die B-Lymphozyten.

Ein Antigen ist eine Fremdsubstanz, welche eine Immunantwort auslöst. Das Immunsystem aktiviert spezialisierte Lymphozyten und produziert Antikörper, die das Antigen binden und zerstören. Ausgangspunkt der Lymphozyten sind pluripotente Stammzellen, die sich in B- und T-Lymphozyten differenzieren.

Antikörper sind Proteine und bestehen aus vier Polypeptidketten (zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten), welche ein Y-förmiges Molekül bilden. Bei Antikörpern, die zu der gleichen Klasse gehören, weisen beide Kettenformen einen konstanten (C-terminalen) Bereich, die sogenannte Schwanzregion mit einer kaum variierenden Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Antikörpern, sowie eine variable (N-terminale) Region, mit stark variierender Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Antikörpern, auf.

Eine identische variable Region befindet sich an jedem Ende der beiden Arme des Y-Moleküls und fungiert als Antigen-Bindungsstelle. Insgesamt gibt es fünf Antikörperklassen, die Immunglobuline (Ig) IgM, IgG, IgA, IgD und IgE, welche durch die konstante Region der schweren Kette definiert werden. Die konstante Region wird durch wenige C-Gene kodiert, die variable Region durch zahlreiche V-Gene. Beide Regionen können nicht unabhängig voneinander exprimiert werden. Sie werden im Zuge der somatischen Rekombination in den B-Zellen zusammengesetzt, wodurch individuelle, hochspezifische Antikörper entstehen. Die Kombinationsmöglichkeit mit einer hohen Vielfalt an V-Genen ist Voraussetzung für die hohe Anzahl an Antikörpern, die durch Ungenauigkeiten bei der Verknüpfung der V- und C-Gen-Regionen zu einem Antikörper zusätzlich erhöht wird.

Neben der C-Region ist im C-Gen eine Joining-Region (J-Region) enthalten, welche die V- und C-Region miteinander verknüpft. Beim Kombinieren der Gene für die schweren Ketten, kommt weiterhin das Diversity-Segment (D-Segment) hinzu, welches sich zwischen den V- und J-Regionen befindet und an dessen Zusammenbau beteiligt ist.

1.1.2 T(14;18) Translokation

Bei einer Translokation handelt es sich um eine strukturelle Chromosomenaberration, bei der es zu einer Verlagerung eines Chromosomenstücks von einem auf ein anderes Chromosom oder an eine andere Stelle des gleichen Chromosoms kommt. Hierbei resultieren häufig an den Bruchstellen sowie anderen Fusionsstellen Genveränderungen.

In die Entstehung der t(14;18)-Translokation sind das BCL2-Gen auf Chromosom 18q21 und der Immunglobulin-Heavychain-Genlocus (IgH-Genlocus) auf Chromosom 14q32 involviert [1]. Sie steht mit der V(D)J-Rearrangierung (Variable, Diverse, and Joining) der auf Chromosom 14 gelegenen Immunglobulin-Gene in Zusammenhang [2].

Der Genbereich, in dem der variable Teil der schweren Ketten der Immunglobuline kodiert wird, besteht in der Keimbahnkonfiguration aus Abschnitten mit 151 V- („variable“) Segmenten, 28 D- („diversity“) Segmenten und 6 J- („joining“) Segmenten. Diese sind den Genen für die konstante Region, den 5 C-Elementen (C μ , C δ , C γ , C ϵ , C α) vorgelagert, welche die Antikörperklassen (IgM (C μ), IgD (C δ), IgG (C γ), IgE (C ϵ), IgA (C α)) bestimmen [3].

Durch die VDJ-Rekombinase werden während der frühen Phase der B-Zell-Differenzierung zuerst ein D- und ein J-Gensegment miteinander verbunden, bevor ein V-Gensegment in der späten Phase angeschlossen wird.

Auf dem Chromosom 18q21 ist das BCL-2-Gen (B-cell lymphoma 2) beheimatet, dessen gleichnamiges Protein in die Regulation der Apoptose (programmierten Zelltod) involviert ist. Das BCL2-Protein hat die Eigenschaft, die Apoptose zu unterdrücken [4]. Eine vermehrte BCL2-Bildung bewirkt eine weitere Teilung von überschüssigen Lymphozyten. Das BCL-2-Gen zählt zu den Proto-Onkogenen [5].

Als Ergebnis einer illegitimen VDJ Rekombination [2,6] entsteht die t(14;18)-Translokation (Abb. 1) und der Einfluss des IgH-Enhancers führt zu einer Überexpression des BCL2-Gens [7].

Bei der t(14;18)-Translokation konnten verschiedene Bruchregionen identifiziert werden. Innerhalb der „major breakpoint region“ (MBR) befinden sich 60-70% der Bruchpunkte [8], wobei die als „molecular breakpoint hot spot“ bezeichnete Region nur 150 Basenpaare (bp) innerhalb dieser Hauptbruchregion umfasst. Dies deutet auf eine nicht rein zufällige Entstehung der t(14;18) Translokation hin [1]. Daneben wurden noch „minor cluster region“ (MCR) und „intermediate cluster region“ (ICR) entdeckt.

Die t(14;18)-Translokation (BCL2/IgH) wird als genetisches Kennzeichen des Follikulären Lymphoms (FL) angesehen und kann in 70-90% detektiert werden [9]. In 30-50% der Fälle ist diese Translokation ebenfalls bei den diffusen großzelligen malignen Lymphomen (diffuse large B-cell Lymphoma (DLBCL)) zu finden [10].

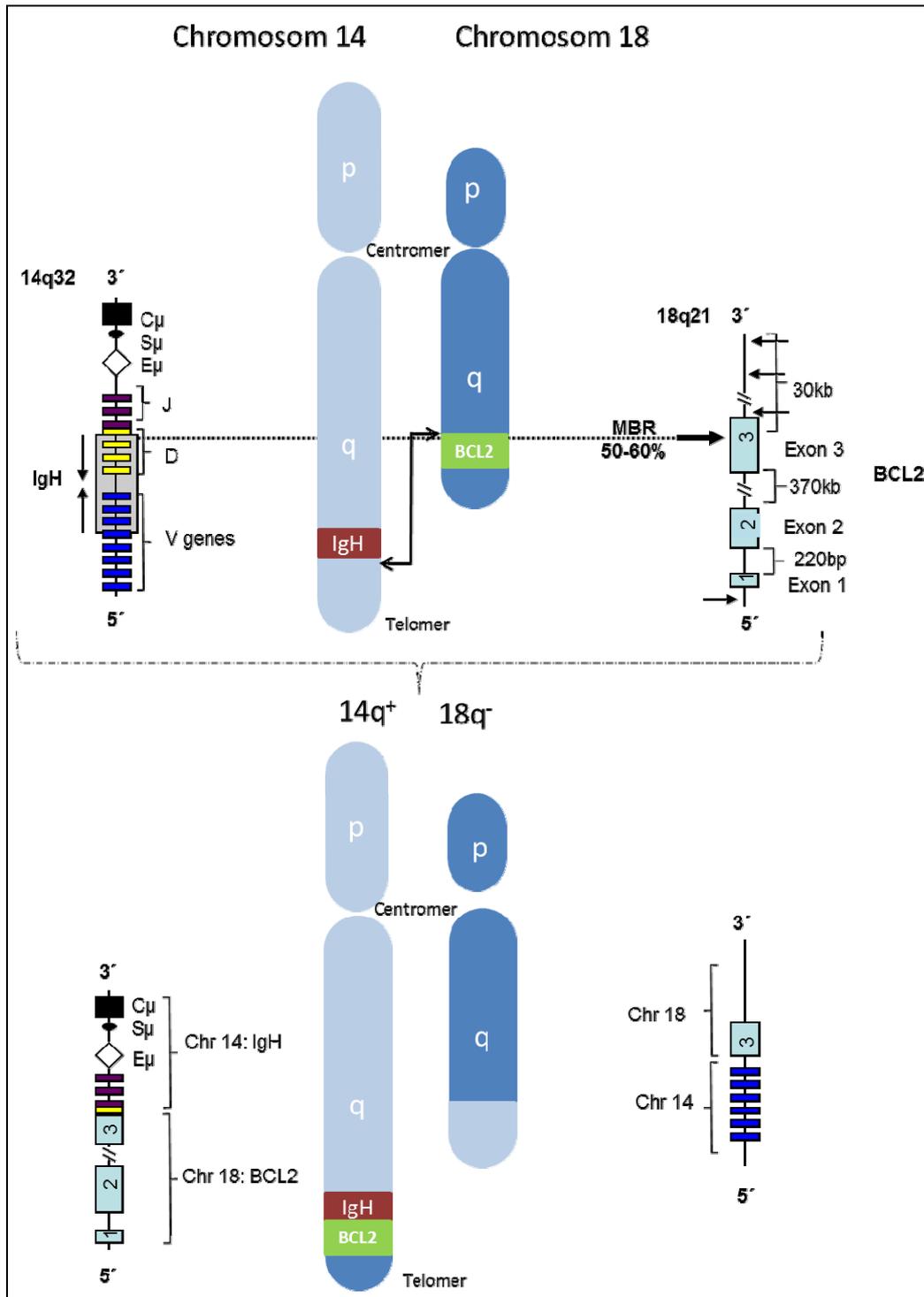


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Chromosomen 14 und 18 sowie der t(14;18) Translokation

(Legende: Chr: Chromosom, BCL-2: B-cell lymphoma 2; IgH: Immunglobulin-Heavychain; MBR: Hauptbruchpunktregion; bp: Basenpaare; kb: Kilobasen; V: „variable“ Segment; D: „diversity“ Segment; J: „joining segment“, C μ : konstante Region)

1.1.3 Non-Hodgkin-Lymphome

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bezeichnen bösartige Erkrankungen des lymphatischen Systems und entstehen aus B- oder T-Lymphozyten [11]. In Deutschland kann eine steigende Inzidenz der NHL beobachtet werden. Wurden 2006 ca. 12.800 neue Erkrankungsfälle, mit einem mittleren Erkrankungsalter bei Frauen mit 70 Jahren und bei Männern mit 67 Jahren registriert [12], erkrankten im Jahr 2008 13.700 Personen und zwei Jahre später ca. 16.000 Personen an einem Non-Hodgkin-Lymphom [13,14].

Sowohl für Männer als auch für Frauen sind die altersstandardisierten Erkrankungsraten zwischen 1985 und 1990 angestiegen, seit 2000 konnte ein leichter Abfall beobachtet werden [12]. Pro Jahr sterben ca. 6.000 Personen an dieser Erkrankung [14,15].

Die Non-Hodgkin-Lymphome umfassen vielfältige Subtypen (niedrig-maligne: Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), Follikuläre Lymphome (FL), Haarzell-Leukämie, Immunozytom, Kutane T-Zell-Lymphome, MALT-Lymphom, Plasmazytom (Multiples Myelom); hoch-maligne: Burkitt-Lymphom, Diffus Large B-Zell-Lymphome (DLBCL), Mantelzell-Lymphome), welche durch eine unterschiedliche Ätiologie charakterisiert sind. Daher ist es schwierig, allgemeingültige Aussagen zu den Risikofaktoren der NHL zu treffen. Bekannt ist, dass ein geschwächtes Immunsystem (z. B. durch eine HIV-Infektion, immunsuppressive Behandlung, seltene Autoimmunerkrankungen) sowie einige Viren (z. B. steht Epstein-Barr-Virusinfektion im Zusammenhang mit dem Burkitt-Lymphom) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen [13]. Weiterhin werden Pestizide, Schwermetalle, radioaktive Strahlung, Rauchen und Übergewicht als Risikofaktoren diskutiert [11,15].

Bei den altersstandardisierten Neuerkrankungsraten der NHL liegt Mecklenburg-Vorpommern mit ca. 14 Fällen pro 100.000 bei den Männern und ca. 11 Fällen pro 100.000 bei den Frauen im Durchschnitt von Deutschland. Deutschland zeigt ähnliche Neuerkrankungsraten wie Schweden, Belgien und Dänemark. Im internationalen Vergleich können in den USA ca. 22 Fälle pro 100.000 bei den Männern und ca. 15 Fälle pro 100.000 bei den Frauen beobachtet werden [14].

Die häufigsten Subtypen der NHL bilden die Diffuse-large B-Cell-Lymphome und die Follikulären Lymphome. Zwischen 2007-2008 entfielen in Deutschland von allen NHL-Fällen auf die diffusen Non-Hodgkin-Lymphome (ICD-10C83) 43% bei den Männern und 40 % bei den Frauen. Die FL (ICD-10C82) wurden bei 18% der Männer und 23% der Frauen diagnostiziert [13].

Das Follikuläre Lymphom (FL) gehört zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL). Mit ca. 20% der NHL-Fälle zeigt das FL in den USA und West-Europa die höchste Inzidenz [16,17].

Die chromosomale Veränderung t(14;18) ist für das Follikuläre Lymphom charakteristisch. Weitgehend unbekannt sind die Ursachen der Entstehung dieses zu den niedrig-maligen Lymphomen gehörenden Lymphoms. Die t(14;18)-Prävalenz bei Patienten mit einem Follikulärem Lymphom beträgt 70-90% [9,10,18]. Daten aus den USA belegen für Männer höhere Inzidenzraten als für Frauen (Männer:Frauen IRR=1.2 für Weiße und Asiaten; IRR=1.6 für Farbige) [19]. Neuere Daten aus Europa deuten auf ein leicht umgekehrtes Geschlechtsverhältnis hin [20]. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz des FL, das mediane Alter bei Diagnose liegt zwischen 60 und 65 Jahren [21].

Die Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) umfassen ca. 20-35% der NHL [17,22]. DLBCL-Patienten sind in 30-50% der Fälle t(14;18)-positiv [10]. Auch für diesen NHL-Subtyp konnten höhere Inzidenzraten von Männern gegenüber Frauen ermittelt werden (Männer:Frauen IRR=1.6 für Weiße; IRR=1.4 für Asiaten, IRR=1.8 für Farbige) [19].

Bei beiden NHL-Subformen kann die t(14;18) Translokation festgestellt werden. Die kausale Rolle der Translokation ist jedoch bis heute unklar. Im Zentrum des Interesses stehen Ereignisse, die für den Übergang in eine maligne Erkrankung notwendig sind [23].

1.1.4 T(14;18) Translokation bei Gesunden

Der erste Nachweis, dass die t(14;18)-Translokation bei Gesunden ohne Lymphom vorkommen kann, wurde 1991 durch die Arbeitsgruppe Limpens et al. publiziert [24].

Die Translokationen werden in geringer Kopienzahl nachgewiesen, persistieren aber über einen längeren Zeitraum [25,26]. Verschiedene Gruppen haben unter Verwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit einer Sensitivität $\leq 10^5$ gezeigt, dass t(14;18) positive Zellen in 30-60% von gesunden Personen mit Frequenzen zwischen 1-200 t(14;18) positive Zellen pro 10^6 peripheren mononuklearen Blutzellen detektierbar sind [24,27-31]. Roulland et al. konnten 2014 zeigen, dass die t(14;18) Translokation einen prädiktiven Biomarker für das Follikuläre Lymphom darstellt [32].

1.2 Fragestellung

Ziel der Untersuchung ist es, anhand von epidemiologischen Daten zu prüfen, ob die t(14;18) Translokation ein obligater Zwischenschritt in der Pathogenese des Follikulärem Lymphoms sein könnte. Wenn dies so wäre, müssten die bekannten Risikofaktoren für FL und DLBCL auch Risikofaktoren für die Prävalenz und/oder Frequenz der t(14,18)-Translokation darstellen. Dies soll im Querschnitt einer großen, bevölkerungsbezogenen Studie untersucht werden.

1.2.1 Rauchen

Tabakrauch enthält ca. 3800 chemische Komponenten, darunter zahlreiche Karzinogene [33]. In der Literatur wurde beschrieben, dass das FL mit den bekannten Risikofaktoren Alter, Geschlecht und Rauchen assoziiert ist [26-29,34]. Viele dieser Studien [27-29,31] waren durch eine kleine Fallzahl geprägt, so dass eine gleichzeitige Betrachtung verschiedener Risikofaktoren oftmals nicht durchgeführt wurde. Daher konnte eine alters- und geschlechtsspezifische unabhängige Assoziation des Zigarettenrauchens sowohl mit der Prävalenz als auch der der Frequenz der t(14;18) Translokation bisher nicht quantitativ ermittelt werden. Unter Verwendung multivariabler Methoden soll die Assoziation von Alter, Geschlecht und Rauchen auf die t(14;18) Translokation mit Daten und Bioproben einer großen, epidemiologischen Querschnittstudie analysiert werden.

1.2.2 Einfluss der weiblichen Sexualhormone

Hormone im Menstruationszyklus

Die Menstruation von Frauen geschieht zyklisch und wird durch fünf Hormone gesteuert: aus dem Hypothalamus 1. Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), aus der Adenohypophyse 2. Follikelstimulirendes Hormon (FSH) und 3. Luteinisierendes Hormon (LH), aus dem Ovar die Sexualhormone 4. Östrogen und 5. Progesteron [35].

In der Follikelphase des Ovariazykluses beginnt der Follikel zu wachsen und Östrogene (v.a. Östradiol) zu produzieren. In der Ovulationsphase findet die Ovulation statt. Der Gelbkörper bildet sich während der Lutealphase aus dem restlichen Follikelgewebe. In dieser dritten Phase werden Östrogene und Progesteron sezerniert. Am Ende dieser Phase degeneriert der Gelbkörper, was zu einem Rückgang von Östrogen und Progesteron führt. Bei einer Schwangerschaft bleiben die Östrogen- und Progesteron-Spiegel erhöht [35].

Östradiol und Progesteron spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Synchronisation von Ovarial- und Menstruationszyklus [35].

Hormone während der Schwangerschaft und Geburt

Bei einer Schwangerschaft sind im Körper hohe Östrogen- und Progesteron-Titer vorhanden. Im ersten Trimester der Schwangerschaft kommt es durch den Embryo zu der Produktion des Hormons humanes Choriogonadotropin (HCG), welches eine ähnliche Wirkung wie LH auf den Gelbkörper zeigt. Dadurch wird Östradiol und Progesteron weiter produziert. Der hohe Progesteronspiegel führt u.a. zu einer Verfestigung des Cervixschleims, dem Wachstum des mütterlichen Anteils der Placenta, der Vergrößerung des Uterus, der Hemmung der Motilität der Eileiter [35].

Im zweiten Trimester degeneriert der Gelbkörper durch die Senkung des HCG-Spiegels. Die Produktion des Hormons Progesteron zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft wird nun durch die Plazenta realisiert. In den letzten Wochen der Schwangerschaft kommt es zu einem Anstieg des Östrogenspiegels, welcher die Bildung von Oxytocinrezeptoren im Uterus bewirkt, so dass die Geburtswehen mit Oxytocin (vom Fötus und der Mutter) eingeleitet werden können [35].

Nach der Geburt sinkt der Progesteronspiegel ab, da die Plazenta nicht mehr vorhanden ist. Auch der Östradiolspiegel sinkt. Dadurch fällt dessen hemmende Wirkung auf die Milchproduktion weg und das Hormon Prolactin kann seine stimulierende Wirkung aufnehmen [35].

Orale Kontrazeptiva

Die orale Kontrazeption (OC) wurde 1960 von Gregory Pincus entwickelt. Dabei handelt es sich um Hormonpräparate, die im Allgemeinen eine Kombination aus synthetischem Östrogen (Ethinylestradiol, Mestranol) und Progestin (ähnelt Progesteron) enthalten und dem Körper eine Schwangerschaft simulieren [36].

Die Pille entfaltet ihre Wirkung auf die Hypophyse und auf den Hypothalamus. Die Östrogen-Komponente vermindert die FSH-Sekretion und somit die Follikelreifung. Durch Progestin wird die LH-Sekretion unterdrückt und durch die daraus resultierende Verfestigung der Cervixschleimhaut die Wanderung der Spermien in den Uterus verhindert [36].

Im Laufe der Zeit gab es OC verschiedener Generationen, die durch unterschiedliche Hormonkonzentrationen der Östrogen- und Progestinkomponenten gekennzeichnet sind [37].

Menopausale Hormontherapie

Die Menopause beendet durch hormonelle Umstellungen die Fruchtbarkeit der Frau. Sie ist durch das spontane Ausbleiben der Menstruation gekennzeichnet und geht mit einer Reduzierung des Östrogenspiegels einher [38,39]. Beschwerden während und nach der Menopause werden häufig mit einer (peri)-menopausalen Hormonersatztherapie (MHT) behandelt.

MHT besteht zumeist aus Medikamenten, die entweder nur Östrogen oder aber eine Östrogen- und Progestin-Komponente enthalten. Von der International Agency for Research on Cancer (IARC) wurde die MHT basierend auf tierischen und menschlichen Daten als Gruppe 1 Karzinogen eingestuft [40].

Risikofaktoren für die NHL sind mit dem Immunsystem assoziiert, wie z. B. HIV-Infektionen und immunsuppressive Therapie nach Organtransplantationen [11,41]. Es ist bekannt, dass weibliche Sexualhormone wie Östrogen, Progesteron und Prolaktin eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem haben und die Immunantwort beeinflussen. Östrogen verringert das Plasmalevel von Interleukin 6, einem Wachstumsfaktor für intermediäre- und hoch-gradige NHL [42,43]. Während einer Schwangerschaft steigen die Östrogen- und Progesteron-Spiegel [44,45]. Somit könnten reproduktive Faktoren die niedrigere Prävalenz der NHL in Frauen gegenüber Männern erklären [46,47]. Es ist bekannt, dass Sexualhormone die B-Zell-Entwicklung beeinflussen [48]. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass Östrogen-Behandlung die frühen $\text{c}\mu^+$ prä-B-Zellen und IgH-Gen-Umlagerungen reduziert [49]. Es ist deshalb möglich, dass Östrogene die Entstehung der t(14;18) Translokation verringern.

Derzeit ist es nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen dem geschlechtsspezifischen Hormonspiegel und der Prävalenz der t(14;18) Translokation bei gesunden Frauen gibt. Daher war das Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Prävalenz und der Frequenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen mit Parität und Menopausenstatus sowie der geschlechtsspezifischen Anwendung von exogenen Hormone wie OC und MHT bei gesunden Frauen in der großen repräsentativen bevölkerungs-basierten Querschnittsstudie Study of Health in Pomerania (SHIP-0) zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 Study of Health in Pomerania (SHIP-0)

Die Basis-Studie "Study of Health in Pomerania – Leben und Gesundheit in Vorpommern" (SHIP-0) gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung startete im Oktober 1997 mit dem Ziel, eine umfassende Charakterisierung des Gesundheitszustands der Bevölkerung im Nordosten von Deutschland vorzunehmen. Teile des umfangreichen, standardisierten Untersuchungsprogramms umfassen 1. Medizinische Untersuchungen (Blutdruckmessung, EKG, Echokardiographie, Sonographie von Schilddrüse, Carotis und Leber), 2. Zahnmedizinische Untersuchungen, 3. ein persönliches computergestütztes Interview (CAPI) zur Inanspruchnahme medizinischer Leistungen, Vorerkrankungen, verhaltensbezogenen Parametern und soziökonomischen Fragen sowie 4. einen Selbstausfüller-Fragebogen. Zusätzlich erfolgte die Erfassung aller Arzneimittel, die in den letzten sieben Tagen vor der Befragung eingenommen bzw. angewandt wurden. Medikamentennamen und Verabreichungswege wurden in der Studiendatenbank dokumentiert und standardisiert ATC klassifiziert. Weiterhin wurden Blut- und Urinproben entnommen und tiefgefroren archiviert [50].

Mit einer Fläche von 23.174 km² und ca. 1,8 Mio. Einwohnern ist Mecklenburg-Vorpommern das Bundesland mit der niedrigsten Einwohnerdichte (1995: 79EW/km²) [50]. Die Studienregion umfasst die im Nordosten von Mecklenburg-Vorpommern gelegenen Landkreise Nord- und Ostvorpommern (Abb. 2), inklusive der Hansestädte Greifswald und Stralsund sowie der Landkreise Anklam und Stralsund. In diesem definierten Basisstudiengebiet leben 212.157 Einwohner, dies entspricht ca. 40% der Bevölkerung Ostvorpommerns. Die Regionen wurden so gewählt, dass sich die ländliche und städtische Bevölkerung repräsentativ zusammensetzen.

Einschlusskriterien in die Stichprobe sind die deutsche Staatsangehörigkeit und ein angemeldeter Wohnsitz in einem der Einwohnermeldeämter der oben genannten Kommunen. Die Personen mussten zwischen 20-79 Jahre alt sein (Stichtag: 31.12.1996). Aufgrund der geringen Anzahl ausländischer Bewohner zum Zeitpunkt der Untersuchung, die ungefähr einen Bevölkerungsanteil von 1,6% ausmachen, und deren starke Alters- und Geschlechtsselektion, beschränkte sich die Stichprobenziehung auf die deutsche Bevölkerung.

In einem zwei-stufigen Stichprobenverfahren wurde eine repräsentative Stichprobe aus der zu diesem Zeitpunkt aktuellen Bevölkerung der Landkreise Nord- und Ostvorpommern von Mecklenburg-Vorpommern (212.157 Einwohner) gezogen, um Verluste durch Migration so gering wie möglich zu halten. In der ersten Stufe wurden zufällig 32 Orte und Gemeinden ausgewählt, gefolgt von der zweiten Stufe, in der 7.008 Probanden nach Alter und Geschlecht geschichtet randomisiert ausgewählt wurden. In 5-Jahresstrata wurden je 12 altersspezifische Strata für Männer und Frauen und somit insgesamt 24 Strata aus den entsprechenden zuvor ausgewählten Melderegistern gezogen.

Bis zum Mai 2001 erklärten sich 4.308 Personen (Response: 68%) (Alter: 20 – 81 Jahre, Geschlechtsverteilung: 51% Frauen) zu einer Teilnahme an SHIP-0 bereit, die sie nach Aufklärung schriftlich bestätigten. Die Untersuchungen fanden in den beiden Studienzentren in Greifswald und Stralsund statt [50,51].

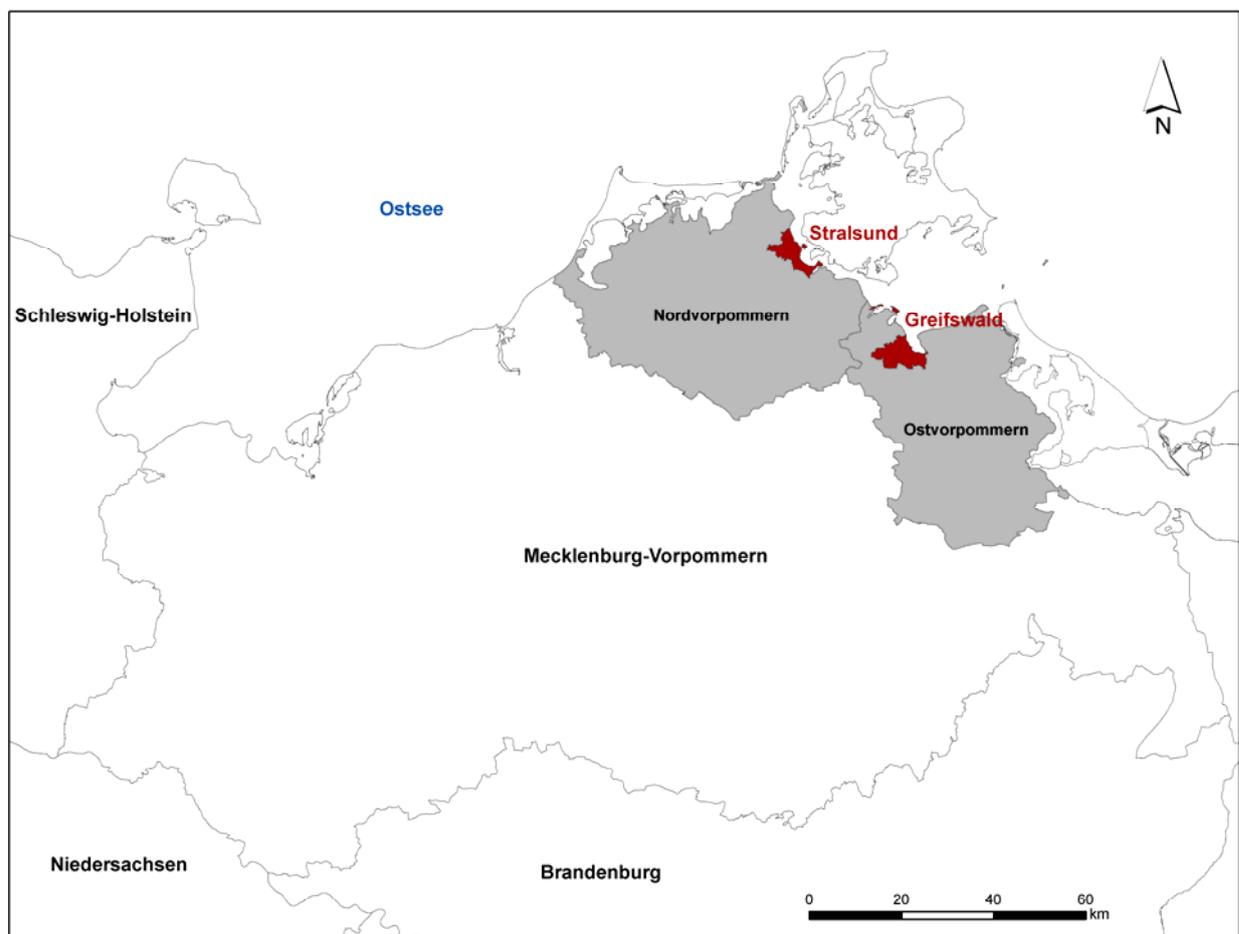


Abbildung 2 Studienregion der Study of Health in Pomerania

2.2 Daten zur Exposition

2.2.1 Rauchstatus

Der Rauchstatus und die Rauchexposition (History of Smoking) wurden aus den Angaben des computergestützten Interviews erfasst. Als Raucher wurden Personen klassifiziert, die die Frage „Rauchen Sie derzeit Zigaretten“ mit ja beantworteten, Ex-Raucher sind diejenigen Personen, die angaben, aktuell nicht zu rauchen, dies aber in der Vergangenheit taten. Als Nichtraucher wurden Personen definiert, die maximal eine Zigarette pro Tag rauchen. Der Anteil der Personen, die angaben, Zigarren oder Pfeifen zu rauchen, war sehr gering (1,9%). Daher wurden sie nicht separat gruppiert, sondern in Abhängigkeit ihres derzeitigen Tabakkonsums in Raucher oder ehemalige Raucher klassifiziert. Die kumulierte Zigarettenexposition wurde als Dosis mal Dauer ermittelt und als Pack Years quantifiziert, wobei 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr ein Pack Year definierten. Die Pack Years wurden kategorisiert in 0, <10, 10 - <20, 20 - <30, 30 - <40 und ≥ 40 . Pfeifen- und Zigarrenraucher wurden nicht in der Pack-Year Kategorisierung berücksichtigt.

2.2.2 Reproduktive Faktoren und exogene Hormonanwendung

Dieser Teil der Auswertung wurde auf die weiblichen Probanden beschränkt. In dem standardisierten Computer Assisted Personal Interview (CAPI) wurde von allen Teilnehmerinnen in SHIP-0 Angaben zu ihrer reproduktiven Historie sowie der geschlechtsspezifischen Hormonanwendung einschließlich OC und MHT erbeten. Aus dem Interview wurden die Items zur Anzahl der Schwangerschaften extrahiert. 1. „Waren Sie jemals schwanger?“ 2. „Wie oft waren Sie schwanger?“ 3. „Wie viele Geburten hatten Sie?“. Die Gruppierung der Anzahl der Schwangerschaften und Geburten wurde jeweils in keine, eine, zwei, drei, vier oder mehr vorgenommen. In SHIP-0 diente die Frage „Haben Sie jemals die Antibaby-Pille eingenommen“ aus dem Interview als Basis für die Einteilung der Frauen in jemals und niemals Anwenderinnen von oraler Konzeption.

Basierend auf der Frage nach der aktuellen Anwendung von OC, wurden die OC-Anwenderinnen in aktuelle und ehemalige Nutzer unterschieden bzw. als unbekannt im Falle von fehlenden Angaben zur aktuellen Nutzung. Basierend auf der Frage „Wie viele Jahre insgesamt haben Sie etwa die Antibaby-Pille eingenommen.“ wurde die Einnahmedauer in > 0 - <5 Jahre, $5 < 10$ Jahre und ≥ 10 Jahre kategorisiert.

Unter Verwendung der Antworten zu folgenden Fragen im CAPI „Haben Sie Regelblutungen?“, „Wie alt waren Sie etwa, als Ihre Regelblutungen aufgehört haben?“ und „Haben Ihre Regelblutungen im Verlauf der natürlichen Menopause (Wechseljahre) aufgehört oder war dies eine Folge von Operationen oder Krankheiten?“ wurde der menopausale Status der Frauen ermittelt. Als Menopause wurde definiert, wenn bei Frauen über 12 aufeinander folgende Monate die Menstruation ausblieb (Amenorrhö) oder dies nach einer medizinischen Intervention zutraf. Als jemals MHT-Nutzer sind Frauen klassifiziert, welche die Frage „Falls Sie schon in den Wechseljahren sind, haben Sie im Verlauf der Wechseljahre oder danach jemals irgendwelche Hormonpräparate eingenommen oder verwendet (z. B. Pflaster, Tabletten, Spritzen)?“ mit ja beantworteten. Auf der Grundlage der berichteten Dauer der Hormoneinnahme („Wie viele Jahre haben Sie ungefähr Hormonpräparate eingenommen?“) wurden die MHT Anwender in zwei Kategorien (> 0 - < 5 Jahre, ≥ 5 Jahre) eingestuft.

Unter Verwendung der von den Frauen zum Untersuchungstag mitgebrachten Arzneimittel wurden anhand der Medikamentenschachteln die in den letzten sieben Tagen vor der Befragung angewendeten Medikamente standardisiert erfasst. In die Analyse einbezogen wurden alle Arzneimittel mit dem ATC-Code G03, welcher die Wirkstoffe der Gruppe „Sexualhormone und andere Modulatoren des Genitalsystems“ umfasst.

2.3 Biomaterialienanalyse

Aus den Blutproben der SHIP-0-Probanden wurde DNA mittels der Phenol-Chloroform-Methode extrahiert und bei -20°C eingelagert. Die Ermittlung des Hauptbruchpunktes der $t(14;18)$ -Translokation (major breakpoint region, MBR) erfolgte mit der real-time quantitativen PCR, welche auch für das Wildtyp K-RAS Referenz-Gen (2 Kopien pro Genom) verwendet wurde [19]. Für den $t(14;18)$ Assay wurden fünf Replikate aus $1\mu\text{g}$ DNA benutzt, welches äquivalent dem Testen von insgesamt $7,5 \times 10^5$ kernhaltigen Zellen ist. Der PCR-Ansatz enthielt Vorwärts- und Rückwärts-Primer, jeweils in einer Konzentration von 400 nM , eine TaqMan-Sonde in einer Konzentration von 200 nM , den Standard TaqMan Universal-PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und $1\mu\text{g}$ DNA in einem Gesamtvolumen von $50\mu\text{l}$. Nach 2 Minuten Inkubation bei 50°C als Voraussetzung der Spaltung durch Uracil-N-Glycosylase, wurde durch Inkubation bei 95°C für 10 Minuten AmpliTaq Gold aktiviert. Jeder PCR-Zyklus bestand aus 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 1 Minute kombinierten Abkühlen und Erweitern bei 61°C . Für die $t(14;18)$ -MBR PCR und der K-RAS Referenz PCR

wurden Standardkurven durch Verdünnungen von DNA aus Karpas 422 Zellen erstellt. Alle PCR-Experimente wurden mit entsprechenden positiven und negativen Kontrollen durchgeführt. Ein Proband wurde als t(14;18) prävalent angesehen, wenn in mindestens einer seiner DNA Replikate t(14;18) detektiert wurde. Ein Proband wurde als t(14;18) negativ kategorisiert, wenn t(14;18) in keiner Probe festgestellt werden konnte. Als nicht-informativ wurden t(14;18) negative Proben angesehen, bei denen es nicht möglich war, mehr als 200.000 k-RAS Genomäquivalente zu untersuchen. Für die Analyse der t(14;18) Frequenz wurde die Summe der t(14;18) Kopien von allen fünf Wiederholungen durch die Gesamtzahl der untersuchten Zellen geteilt (d.h. K-RAS Kopien dividiert durch 2). Das Resultat wurde mit 10^6 multipliziert, um die (14;18)-positiven Zellen pro Million NC einheitlich darzustellen.

2.4 Statistische Methoden

Für die statistische Analyse wurden die Softwarepakete SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, V 9.1) und STATA (Intercooled STATA, STATA/SE 10.1, StataCorp., Texas, USA) verwendet.

Kategoriale Daten wurden als Prozentzahlen ausgedrückt, kontinuierliche Daten wurden mit Median und Interquartilsabstand (IQB) berichtet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test bei kategorialen Daten, Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test bei kontinuierlichen Daten untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt. Verwendet wurde unkonditionale logistische Regression, um Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervall für das Vorhandensein mindestens einer t(14;18)-Translokation zu berechnen. Für die Analyse der t(14;18)-Frequenz kamen negative Binomial-Regressionsmodelle als Generalisierung der Poisson Regression zum Einsatz. In diesem Modell wurden nur t(14;18) positive Probanden eingeschlossen.

Die Berücksichtigung der Bandbreite von numerischen k-RAS Genomäquivalenten (45.000 bis 1.900.000) fand Anwendung durch Integration der jeweiligen Anzahl als Gewichtungsfaktor in den multivariablen Analysen.

Alter und Geschlecht wurden als Einflussfaktoren in die Analysemodelle sowohl für t(14;18) Prävalenz als auch Frequenz integriert.

In den Analysen beschränkt nur auf Frauen wurde nur Alter als potentieller Confounder berücksichtigt. Weitere in den Modellen enthaltene Variablen operationalisieren wichtige Determinanten des hormonalen Status (Anzahl der Schwangerschaften, menopausaler Status inkl. des Typs der Menopause (medizinisch/chirurgisch, vs. natürlich) und exogene

Hormonanwendung (nur orale Kontrazeptiva, nur MHT, orale Kontrazeptiva und MHT, vs. keine exogene Hormonanwendung). Diese Operationalisierung spiegelt die Hypothese wieder, dass das Risiko aufgrund verschiedener weiblicher Sexualhormone und nicht aus einer spezifischen Quelle entsteht. In Sensitivitätsanalysen wurden orale Kontrazeptiva und MHT separat modelliert.

3 Ergebnisse

3.1 Assoziation der t(14;18) Translokation mit Rauchen

In dem multivariablen logistischen Regressionsmodell mit Alter, Geschlecht und Rauchen wurde die Assoziation von Alter und Geschlecht mit der t(14;18)-Prävalenz beobachtet. In allen Modellen war die t(14;18) Prävalenz bei Männern höher als bei Frauen und stieg mit zunehmendem Alter an. Nicht bestätigt werden konnte in der multivariablen Analyse die Erhöhung der t(14;18)-Prävalenz mit zunehmendem Rauchbelastung unter Berücksichtigung einer differenzierten Operationalisierung des Rauchens (Rauchstatus, Pack years).

Die Analyse der t(14;18) Frequenz zeigt nur mit dem Alter eine positive Assoziation, jedoch nicht mit dem Geschlecht. Für Rauchen und der t(14;18) Frequenz waren keine konsistenten Assoziationen erkennbar.

3.2 Assoziation der t(14;18) Translokation mit weiblichen Sexualhormonen

In dem multivariablen logistischen Regressionsmodell mit dem Outcome t(14;18)-Prävalenz wurden Alter, Anzahl der Schwangerschaften, Menopausenstatus und kombinierte exogene Hormonanwendung (orale Kontrazeptiva und/oder MHT) integriert. In diesem Modell zeigte nur Alter eine signifikante Assoziation mit der t(14;18)-Prävalenz. Der höchste Risikoschätzer wurde in der Altersgruppe der 50-59 Jährigen beobachtet. In einer Sensitivitätsanalyse wurden oralen Kontrazeptiva und MHT separat modelliert, wobei MHT eine signifikante Assoziation mit der t(14;18) Prävalenz zeigte. Für die t(14;18)-Frequenz wurden in den altersadjustierten Modellen Assoziationen mit der Einnahme von oralen Kontrazeptiva und MHT (beschränkt auf postmenopausale Frauen) beobachtet. Im multivariablen Modell wurden die Parameter induzierte Menopause (medizinisch/chirurgisch) und die Kategorie der exogenen Hormoneinnahme jemals Einnahme von oralen Kontrazeptiva und MHT statistisch signifikant. In einer Sensitivitätsanalyse wurden beide Parameter der exogenen Hormoneinnahme als separate Variablen in das Model integriert, wobei nur noch der Parameterschätzer für orale Kontrazeptiva signifikant wurde.

4 Diskussion

Die biologischen Mechanismen für die Entstehung eines NHL sind weitestgehend unbekannt. In den beiden häufigsten Subtypen der NHL (FL und DLBCL) ist die t(14;18) Translokation nachzuweisen, welche sich auch bei gesunden Personen detektieren lässt.

Nach unserem besten Wissen ist dies die bisher größte Untersuchung zur t(14;18)-Prävalenz und -Frequenz im Hinblick auf NHL bekannte Risikofaktoren in einer bevölkerungsbezogenen Querschnittstudie. Unsere Daten bestätigen, dass der Nachweis von t(14;18)-positiven Zellen deutlich mit den bekannten FL Risikofaktor Alter assoziiert ist. Zudem konnten wir einen Geschlechtsunterschied mit einer höheren Prävalenz der t(14;18) Translokation bei Männern beobachten.

Wir fanden einen kurvilinearen Trend beim Alter mit einem Maximum in der Altersgruppe 50-59 sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Unklar bleibt, warum die t(14;18)-Prävalenz ab 60 Jahren und die Frequenz ab 70 Jahren wieder sinkt, obwohl die FL-Inzidenz weiter steigt. Dies könnte auf eine Abnahme der absoluten B-Zellzahl im peripheren Blut zurückzuführen sein [52]. Allerdings tritt diese bereits früher auf und erklärt nicht die Trendänderung ab 60 bzw. 70 Jahren. Mit dem Alter ist die Abnahme der Immunkompetenz verbunden, belegt z.B. durch geringere Erfolgsraten bei Impfungen in höherem Alter [53]. Eine biologische Verbindung zu unserer Beobachtung ist bisher jedoch unbekannt.

Ein Zusammenhang zwischen der t(14;18) Prävalenz und t(14;18) Frequenz mit dem Risikofaktor Rauchen konnten wir nicht nachweisen. Dies ist im Einklang mit mehreren epidemiologischen Studien, in denen keine Assoziation zwischen Rauchstatus oder einer positiven Dosis-Wirkungsbeziehung von Pack Years und NHL oder t(14;18) positiver NHL beobachtet wurden [11,54,55].

Unsere Ergebnisse aus den Analysen zum Einfluss von weiblicher Sexualhormone sind hinsichtlich der Anzahl der Schwangerschaften vergleichbar mit bereits publizierten Studien [56-59]. Nicht eindeutig sind hingegen die Angaben in der Literatur zur exogenen Hormoneinnahme. Inkonsistente Risiken für NHL oder die Subtypen FL oder DLBCL wurden im Zusammenhang mit OC [57,60,61] und MHT [61-63] berichtet.

In bivariaten Analysen konnten wir einige positive Assoziationen zwischen der t(14;18) Prävalenz und MHT (jemals vs. niemals Einnahme, Jahre der Einnahme) beobachten. Im multivariablen Modell wurde nur Alter statistisch signifikant. Zwischen der t(14;18) Frequenz

und medizinisch/chirurgisch induzierter Menopause sowie der Einnahme von oralen Kontrazeptiva und Anwendung MHT konnten wir einen positiven Zusammenhang beobachten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die exogene Hormoneinnahme eher mit der $t(14;18)$ Frequenz als mit der $t(4;18)$ Prävalenz assoziiert ist, hier aber noch weiterer Forschungsbedarf besteht, um die biologischen Mechanismen besser verstehen zu können.

4.1 Stärken und Schwächen der Studien

Eine mögliche Schwäche unserer Ergebnisse ist das Fehlen von Informationen über das Differentialblutbild der Proben, daher waren wir nicht in der Lage die $t(14;18)$ Ergebnisse für den Prozentsatz der Lymphozyten zu adjustieren. In einer zusätzlichen Analyse auf der Basis weißer Blutkörperchen konnten wir allerdings in Bezug auf die Raucherdaten zeigen, dass unter Verwendung der absoluten statt relativen Anzahl der $t(14;18)$ -Frequenz die Parameterschätzer sich nicht wesentlich ändern.

Für eine noch detailliertere Untersuchung des Einflusses der weiblichen Hormone wären Informationen zu den in der Literatur beschriebenen Faktoren wie z. B. Anzahl der Jahre nach der letzten Geburt, das Alter bei der Menarche, die Anzahl der Jahre der Ovulation, das Geschlecht der geborenen Kinder, Daten über Kalenderjahr oder das Alter der ersten/letzten OC/MHT Präparate, die Dauer oder das Muster der Anwendung nötig. Da SHIP-0 nicht spezifisch auf Frauengesundheit ausgerichtet ist, wurden diese Daten nicht erhoben.

Dies ist die bisher größte Untersuchung zur $t(14;18)$ -Prävalenz und -Frequenz in einer bevölkerungsbezogenen Querschnittstudie. Alle Daten wurden standardisiert in einem persönlichen Interview erhoben.

Das Sampling-Design sowie die hohe Response begrenzt den Selektionsbias und erhöht die externe Validität dieser Ergebnisse. Die relativ große Studiengröße von gut charakterisierten Probanden begrenzt die statistische Unsicherheit.

4.2 Schlussfolgerung

In den beiden hier präsentierten Publikationen wurden Analysen im Querschnitt durchgeführt. Es erfolgte die Ermittlung von Assoziationen, kausale Rückschlüsse können aus den Ergebnissen nicht gezogen werden.

Rauchen als bei der NHL und insbesondere bei den Subtypen FL und DLBCL diskutierter Risikofaktor ist weder mit der Prävalenz noch mit der Frequenz der $t(14,18)$ -Translokation

assoziiert. Für die exogene Hormoneinnahme konnten Assoziationen mit der Frequenz der t(14,18)-Translokation beobachtet werden. Unter den t(14;18) prävalenten Frauen der Studienpopulation konnte bei 80% nur ein t(14;18) Klon nachgewiesen werden. 4 verschiedene Klone, welches die höchste Anzahl an Klonen darstellte, waren nur bei einer einzigen Frau zu finden. Dies könnte dafür sprechen, dass die exogene Hormoneinnahme eher für die Vermehrung von bereits existierenden Klonen verantwortlich ist, als bei der Entstehung neuer Klone beteiligt zu sein. 2014 wurde von Roulland et al. gezeigt, dass der Nachweis von t(14;18)-positiven Zellen in gesunden Personen ein Biomarker für ein erhöhtes Risiko ist, an einem FL zu erkranken [32]. Weitere Forschungsfragen sollten sich damit beschäftigen, Personen zu identifizieren, für welche ein hohes Risiko besteht und welche zusätzlichen molekularen oder immunologischen Ereignisse zu einer Transformation einer t(14;18)-positiven Zelle in einen malignen Lymphom-Klon führen.

Das Studiendesign der Study of Health in Pomerania ist als Kohortenstudie angelegt. Daher sind wir in der Lage, die t(14;18)-Analysen in einem systematischen Follow-up unter Einbeziehung von Daten aus SHIP-1 (5-Jahres-Follow-up) und SHIP-2 (10-Jahres-Follow-up) zu ergänzen. In weiteren Analysen ist es möglich, das Auftreten von neuen t(14;18) Translokationen zu erkennen sowie Frequenzveränderungen von gesunden Probanden mit einer t(14;18) Translokation zu untersuchen. In dem prospektiven Ansatz können eine Auswahl von NHL Risikofaktoren berücksichtigt und deren jeweiliger Beitrag bei neu entstehenden FL oder DLBCL bewertet werden.

5 Zusammenfassung

Unter Verwendung der Basiserhebung der Daten der Study of Health in Pomerania wurden mit dem Alter, dem Geschlecht, der lebenslangen Rauchexposition und der Exposition gegenüber endogenen und exogenen weiblichen Sexualhormonen wichtige Risikofaktoren der NHL mittels multivariabler Verfahren in Bezug auf die t(14;18) Translokation quantitativ untersucht.

Wir fanden einen kurvilinearen Trend der t(14;18) Prävalenz mit steigendem Alter mit einem Maximum in der Altersgruppe 50-59 sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Männer zeigten in allen Altersgruppen eine höhere t(14;18) Prävalenz.

Für Rauchen konnte in alters- und geschlechtsadjustierten Modellen keine Risikoerhöhung ermittelt werden. Die Analysen beschränkt auf Frauen zeigten ebenso keinen Zusammenhang für die Anzahl der Schwangerschaften oder Menopausentyp mit der Prävalenz der t(14;18) Translokation. Bei der t(14;18) Frequenz hingegen konnten in den altersadjustierten Modellen signifikante Assoziationen mit lebenslanger Exposition von oralen Kontrazeptiva beobachtet werden. Im multivariablen Model waren die Risikoschätzer für induzierte Menopause und jemals Einnahme von oralen Kontrazeptiva und Menopausaler Hormontherapie signifikant erhöht.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die exogene Hormoneinnahme ein Risikofaktor für die t(14;18) Frequenz ist, nicht jedoch für die t(14;18) Prävalenz.

Anfang 2014 wurde berichtet, dass der Nachweis von t(14;18)-positiven Zellen in gesunden Individuen einen repräsentativen Biomarker für ein erhöhtes FL Risiko darstellen [32].

Zukünftige Forschung sollte darauf abzielen, die besonders gefährdeten Personen und die zusätzlich notwendigen molekularen oder immunologischen Ereignisse zu identifizieren, die letztlich zur Transformation von t(14;18)-positiven Zellen in eine maligne Lymphom-Zelle führen. Ein vielversprechender Ausgangspunkt könnte eine systematische prospektive Follow-up Untersuchung von gesunden t(14;18)-positiven Individuen sein. Weitere molekulare oder Umweltereignisse sollten verfolgt und ihr jeweiliger Einfluss hinsichtlich der Entwicklung einer klinischen FL oder DLBCL quantifiziert werden. Daraus könnten sich mögliche klinische Anwendungen wie z. B. eine Risikostratifikation, ein erweitertes Monitoring und die Entwicklung einer frühzeitigen Intervention ableiten lassen.

Literatur

1. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984;226(4678):1097-1099.
2. Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B. V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med*. 2002;195(1):85-98.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302(5909):575-581.
4. Korsmeyer SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today*. 1992;13(8):285-288.
5. McDonnell TJ, et al. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol*. 1990;10(5):1901-1907.
6. Jäger U, et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*. 2000;95(11):3520-3529.
7. Heckman CA, et al. Critical elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancers for deregulated expression of bcl-2. *Cancer Res*. 2003;63(20):6666-6673.
8. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985;228(4706):1440-1443.
9. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1995;103(4):472-478.
10. Chang CM, et al. Risk factors for non-Hodgkin lymphoma subtypes defined by histology and t(14;18) in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2011;129(4):938-947.
11. Alexander DD, et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007;120 Suppl 12:1-39.
12. Husmann G, et al. Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends.; 2010.
13. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S. Krebs in Deutschland 2007/2008.; 2012.
14. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin; 2013.

15. Muller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol.* 2005;84(1):1-12.
16. Harris NL, et al. Follicular lymphoma. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: WHO; 2008:220-226.
17. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol.* 1998;9(7):717-720.
18. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia.* 2007;21(1):18-29.
19. Morton LM, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* 2006;107(1):265-276.
20. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer.* 2011;105(11):1684-1692.
21. Ma S. Risk Factors of Follicular Lymphoma. *Expert Opin Med Diagn.* 2012;6(4):323-333.
22. Stein H, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: WHO, (Hrsg.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: 2008:233-237.
23. Viardot A. [Malignant lymphomas: clinical appearance, classification, therapy and prognosis]. *Radiologie.* 2012;52(4):321-329.
24. Limpens J, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene.* 1991;6(12):2271-2276.
25. Basecke J, Griesinger F, Trumper L, Brittinger G. Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *Ann Hematol.* 2002;81(2):64-75.
26. Schuler F, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer.* 2009;124(4):958-963.
27. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8910-8914.
28. Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA. Occurrence of bcl-2 Oncogene Translocation with Increased Frequency in the Peripheral Blood of Heavy Smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(3):223-224.
29. Ji W, et al. Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res.* 1995;55(13):2876-2882.

30. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol.* 1996;14(4):1333-1344.
31. Summers KE, et al. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):420-424.
32. Roulland S, et al. t(14;18) Translocation: A Predictive Blood Biomarker for Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2014;
33. Smith CJ, Livingston SD, Doolittle DJ. An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food Chem Toxicol.* 1997;35(10-11):1107-1130.
34. Roulland S, et al. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res.* 2004;64(6):2264-2269.
35. Campbell NA. *Biologie. 1.* Spektrum Akademischer Verlag; 2015.
36. Felberbaum R, Diedrich K. Orale Kontrazeptiva – Vorteile und Risiken. *Der Gynäkologe* 1997(4), 305-313. 2015. Springer-Verlag.
37. Sitruk-Ware R, Nath A. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(1):13-24.
38. Sowers MR, et al. Estradiol rates of change in relation to the final menstrual period in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):3847-3852.
39. Burger HG, et al. Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(11):4025-4030.
40. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS: HORMONAL CONTRACEPTION AND POST-MENOPAUSAL HORMONAL THERAPY. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1999;(72):1-660.
41. Hoover RN. Lymphoma risks in populations with altered immunity--a search for mechanism. *Cancer Res.* 1992;52(19 Suppl):5477s-5478s.
42. Preti HA, et al. Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. *Ann Intern Med.* 1997;127(3):186-194.
43. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28(5):521-574.
44. Xiong YH, Yuan Z, He L. Effects of estrogen on CD4(+) CD25(+) regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(9):748-752.

45. Moor RM. Foetal homeostasis: conceptus-ovary endocrine balance. *Proc R Soc Med.* 1968;61(11 Pt 2):1217-1226.
46. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev.* 1996;17(4):369-384.
47. Morton LM, et al. Reproductive factors, exogenous hormone use and risk of lymphoid neoplasms among women in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *Int J Cancer.* 2009;124(11):2737-2743.
48. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):411-423.
49. Medina KL, Strasser A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood.* 2000;95(6):2059-2067.
50. John U, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz Praventivmed.* 2001;46(3):186-194.
51. Völzke H, et al. Cohort Profile: The Study of Health in Pomerania. *Int J Epidemiol.* 2011;40(2):294-307.
52. Veneri D, et al. Changes of human B and B-1a peripheral blood lymphocytes with age. *Hematology.* 2007;12(4):337-341.
53. Kwetkat A. *Immunologie im Alter.* 2015. Springer Medizin Verlag. 2010.
54. Chiu BC, et al. Cigarette smoking, familial hematopoietic cancer, hair dye use, and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol.* 2007;165(6):652-659.
55. Schroeder JC, et al. A case-control study of tobacco use and other non-occupational risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma (United States). *Cancer Causes Control.* 2002;13(2):159-168.
56. Zhang Y, et al. Menstrual and reproductive factors and risk of non-Hodgkin's lymphoma among Connecticut women. *Am J Epidemiol.* 2004;160(8):766-773.
57. Lee JS, Bracci PM, Holly EA. Non-Hodgkin lymphoma in women: reproductive factors and exogenous hormone use. *Am J Epidemiol.* 2008;168(3):278-288.
58. Prescott J, et al. Reproductive factors and non-Hodgkin lymphoma risk in the California Teachers Study. *PLoS ONE.* 2009;4(12):e8135.
59. Kane EV, et al. Menstrual and reproductive factors, and hormonal contraception use: associations with non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol.* 2012;23(9):2362-2374.

60. Bernstein L, Ross RK. Prior medication use and health history as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma: preliminary results from a case-control study in Los Angeles County. *Cancer Res.* 1992;52(19 Suppl):5510s-5515s.
61. Lu Y, et al. Oral contraceptives, menopausal hormone therapy use and risk of B-cell non-Hodgkin lymphoma in the California Teachers Study. *Int J Cancer.* 2011;
62. Mildon KH, Ansell P, Roman E, Kane EV. Reproductive factors, menopausal hormone therapy, and risk of non-Hodgkin, diffuse large B-cell and follicular lymphomas: a UK case-control study. *Cancer Causes Control.* 2010;21(12):2079-2083.
63. Kane EV, et al. Postmenopausal hormone therapy and non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol.* 2013;24(2):433-441.

Anhang

A.1 Wissenschaftliche Artikel

Leukemia & Lymphoma, 2013; Early Online: 1–7
 © 2013 Informa UK, Ltd.
 ISSN: 1042-8194 print / 1029-2403 online
 DOI: 10.3109/10428194.2013.788177

informa
 healthcare

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Circulating t(14;18)-positive cells in healthy individuals: association with age and sex but not with smoking

Carsten Hirt^{1*}, Kerstin Weitmann^{2*}, Frank Schüler^{1†}, Thomas Kiefer¹, Charles S. Rabkin³, Wolfgang Hoffmann^{2*} & Gottfried Dölken^{1*}

¹Department of Hematology and Oncology and ²Institute for Community Medicine, University Medicine, Greifswald, Germany and ³Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

Abstract

t(14;18)-positive cells can be detected not only in patients with follicular lymphoma (FL) but also in healthy individuals (HIs). We used epidemiological data and blood samples of the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP) to analyze associations of FL risk factors and t(14;18)-positive cells in HIs. Buffy coat samples from 4152 study participants were tested by real-time polymerase chain reaction (PCR) for t(14;18)-positive cells. Of 3966 evaluable subjects, 1526 were t(14;18)-PCR positive [38.5%, median 3.9 t(14;18)-positive per million nucleated cells, range 0.6–9299]. In multivariable analyses, age and sex but not parameters of smoking exposure were significantly associated with t(14;18) prevalence (logistic regression, $p < 0.001$). Multivariable analyses of t(14;18)-frequency showed a positive association with age but not with sex or smoking. These age and sex associations in HIs require careful control in future studies of t(14;18) as a potential biomarker of lymphoma risk.

Keywords: Follicular lymphoma, t(14;18), lymphomagenesis, healthy individuals

Introduction

The t(14;18)(q32;q21) translocation is the characteristic chromosomal aberration of the most common indolent non-Hodgkin lymphoma, follicular lymphoma (FL), and can be detected cytogenetically in about 90% of FLs and 30–50% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) [1–3]. This translocation juxtaposes the proto-oncogene *BCL2* on chromosome 18 in *cis* with regulatory sequences of the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) locus on chromosome 14, resulting in a constitutive overexpression of the anti-apoptotic BCL2 protein, which is believed to be one of the initiating events in the lymphomagenesis of FL [4,5]. Mice carrying an *IGH-BCL2*

fusion transgene show a three- to four-fold expansion of resting B cells manifesting as lymphatic hyperplasia [6,7]. About 10% of these *IGH-BCL2* transgenic mice develop DLBCL, frequently exhibiting a rearranged *MYC* [8]. This model suggests that the progression from benign follicular hyperplasia to malignant lymphoma is due to secondary changes, and that the t(14;18) translocation alone is not sufficient to transform a normal B cell into a malignant lymphoma cell.

In humans, circulating t(14;18)-positive cells can be detected not only in patients with FL but also in healthy subjects without lymphoma. Using polymerase chain reaction (PCR) techniques with a sensitivity of $\leq 10^{-5}$, several groups have shown that t(14;18)-positive cells are detectable in 30–60% of healthy individuals (HIs) at frequencies of 1–200 t(14;18)-positive cells per 10^6 peripheral blood mononuclear cells [9–14]. Previous epidemiological and molecular studies in subjects without lymphoma have suggested that these t(14;18)-positive cells might represent potential lymphoma precursor cells. This hypothesis is supported by associations of t(14;18) with known FL risk factors, including age, gender, pesticide exposure and tobacco smoking [10–12,15–17]. However, all of these studies were too small to simultaneously assess multiple risk factors and to verify the independent association of each of these factors with either t(14;18) prevalence or frequency. Therefore, we characterized a large set of 4152 subjects for t(14;18) prevalence and frequency. We used multivariable methods to evaluate simultaneously the associations of age, gender and smoking with t(14;18).

Material and methods

Subjects/study population

The population-based Study of Health in Pomerania (SHIP) is a cross-sectional epidemiological survey carried out to

*Contributed equally

[†]Current address: DRK-Krankenhaus Luckenwalde, Luckenwalde, Germany

The data of this study were presented in part at the Annual Meeting of the American Society of Hematology in 2009 in New Orleans and at the 11th International Conference on Malignant Lymphoma in Lugano, Switzerland, in June 2011.

Correspondence: Carsten Hirt, MD, Department of Hematology and Oncology, Greifswald University Medical Center, Ferdinand-Sauerbruchstrasse, D-17475 Greifswald, Germany. Tel: + 49-3834-86-22009. Fax: + 49-3834-86-22046. E-mail: hirtenko@uni-greifswald.de

Received 1 February 2013; revised 12 March 2013; accepted 18 March 2013

2 C. Hirt et al.

estimate the prevalence of clinical diseases, subclinical disorders and risk factors, and to study their complex associations.

The objectives and design of this study have been published previously [18]. Briefly, the study took place in Western Pomerania ($n = 213\,057$ inhabitants in 1996) located in the north-eastern part of Germany. In a two-stage design, a stratified sample of 7008 men and women between 20 and 79 years of age (292 persons in each of 12 5-year age strata for both genders) was randomly drawn using German population registries. Excluding migrated or deceased persons, the net sample comprised 6265 individuals invited to participate. A total of 4308 individuals (68.8%; 2192 females, 2116 males) agreed, and written informed consent was obtained from each participant. The study was approved by the Ethics Committee of the Board of Physicians, Mecklenburg-Western Pomerania, at the University of Greifswald. Each participant underwent comprehensive standardized medical and dental examinations. Data collection was completed by computer-aided face-to-face health interview and a self-administered risk factor questionnaire. Venous blood samples were drawn according to the standard procedure. Data collection started in October 1997 and finished in May 2001.

Smoking status and history were assessed in the computer-aided interview. Current smokers were defined as individuals who answered "yes" to the question "Do you currently smoke cigarettes?" Ex-smokers were defined as persons who did not currently smoke but had done so in the past. Non-smokers were defined as persons who had never smoked at least one cigarette per day. The percentage of persons who smoked cigars or pipes was very low (1.9%). Persons who smoked cigars or pipes were not grouped separately but were regarded as smokers or former smokers, depending on their current tobacco use. Cumulative cigarette exposure was assessed as dose times duration in terms of pack years, defined as smoking 20 cigarettes per day for 1 year. Pack years were categorized as none, < 10 , $10 - < 20$, $20 - < 30$, $30 - < 40$ and ≥ 40 . Pipe and cigar smokers were not considered in the pack year analysis. Fifteen individuals were excluded from this evaluation who had no interview, interrupted interviews with no data on smoking behaviors, or refused to answer the smoking questions.

Biosamples and t(14;18)-PCR

DNA was isolated from peripheral blood buffy coat fractions using the phenol-chloroform method and stored at -20°C . Real-time quantitative PCR was carried out for the t(14;18)-major breakpoint region (MBR) of *BCL2* and for the wild type *K-RAS* reference gene (two copies per genome), as described previously [19]. Five replicates of $1\ \mu\text{g}$ DNA, equivalent to testing a total of 7.5×10^5 nucleated cells, were used for the t(14;18) assay. The mean sensitivity of the t(14;18)-MBR PCR assay was estimated as one t(14;18)-positive cell in 5×10^5 nucleated cells (NCs). The PCR mixture contained forward and reverse primers each at a concentration of 400 nM, a TaqMan probe at a concentration of 200 nM, the standard TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and $1\ \mu\text{g}$ DNA in a total volume of 50 μL . After 2 min incubation at 50°C to allow for cleavage

by uracil-*N*-glycosylase, AmpliTaq Gold was activated by incubation at 95°C for 10 min. Each PCR cycle consisted of 15 s denaturation at 95°C , and 1 min of combined annealing/extension at 61°C . Standard curves were established for both the t(14;18)-MBR PCR and the *K-RAS* reference PCR by dilutions of DNA from Karpas 422 cells. All PCR experiments included appropriate positive and negative controls.

Buffy coat samples from 4152 individuals were received for testing in this study. For analysis of t(14;18) prevalence, a sample was regarded as positive if t(14;18) was detected in at least one of its DNA replicates and negative if t(14;18) was not detected. However, t(14;18)-negative samples containing $< 200\,000$ *K-RAS* genome equivalents were regarded as not informative and excluded from further consideration ($n = 184$). For analysis of t(14;18) frequency, the sum of t(14;18) copies from all five replicates was divided by the total number of tested cells (i.e. *K-RAS* copies divided by 2), multiplied by 10^6 and expressed as t(14;18)-positive cells per million NCs.

Statistical analyses

The statistical software packages SAS (V 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC) and Stata (Stata/SE 10; StataCorp, College Station, TX) were used. Categorical data were expressed as percentages; continuous data were expressed as median and interquartile range (IQR). Differences between groups were tested using the χ^2 test, Mann-Whitney *U*-test, and Kruskal-Wallis test (for three and more group comparison). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

We used multivariable logistic regression models to calculate odds ratios and 95% confidence intervals of t(14;18) prevalence for age and gender as well as smoking status and smoking history.

To analyze t(14;18) frequency with regard to age, gender and smoking, we fitted negative binomial regression models for persons with at least one copy of t(14;18). We also calculated zero-inflated negative binomial regression models including t(14;18) positive and negative subjects. Results from the latter models using data from all subjects irrespective of t(14;18) status showed in general similar associations to models that were restricted to t(14;18)-positive subjects. Therefore, and in order to allow comparison of the results of the present study to previously reported data, we only show the t(14;18) frequency results from analyses restricted to t(14;18)-positive subjects.

To represent the wide numerical range of *K-RAS* genome equivalents (45 000–1 900 000), the number per subject was considered as a weighting factor in the multivariable analyses.

Role of the funding source

The funding source of the SHIP trial (German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, grant 01ZZ96030, 01ZZ0701); the Ministry for Education, Research, and Cultural Affairs; and the Ministry for Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania) had no involvement in the study design, collection, analysis or interpretation of the data, writing of the report or in the decision to submit the paper for publication.

Results

The demographic characteristics of the study population are described in Table I. One thousand and eighty-five (27.4%) of the 3966 study subjects (both genders combined) were current smokers, 1022 (25.8%) former smokers and 1859 (46.9%) non-smokers.

Results of bivariate analyses of t(14;18) prevalence and age, sex and smoking

In a bivariate analysis, t(14;18) prevalence in both sexes combined increased from 24.1% in the age group 20–29 years to 47.2% in the age group 50–59 years (Table I), with no further increase above the age of 60. The percentage of t(14;18)-positive subjects was significantly higher in men than in women (43.3% vs. 33.7%, $p < 0.001$, Table I), with a consistently higher t(14;18) prevalence in men in all age groups [Figure 1(A)].

In a comparison of t(14;18) prevalence according to smoking status, non-smokers had the lowest and former smokers the highest t(14;18) prevalence (Table I). In this analysis was done within age and sex groups, there was no clear effect of smoking status on t(14;18) prevalence (Supplementary Table S1 to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>). When we analyzed the association of t(14;18) prevalence with lifelong smoking exposure quantified as

cumulative pack years, we observed a significant increase from 34.6% in the group of subjects with > 0–10 pack years to 52.5% in subjects with at least 40 pack years (Table I). This significant increase was present only in men, but not in women [Figure 1(B)].

No association of t(14;18) prevalence and exposure to cigarette smoking in multivariable models adjusting for age and sex

Multivariable logistic regression models containing age, sex and different smoking parameters confirmed the association of age and sex and t(14;18) prevalence. In all models, t(14;18) prevalence was higher in men than in women and increased with higher age [Figure 2, Supplementary Figures S1(A)–1(C) and Table SII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>]. In contrast, the increase in t(14;18) prevalence with increasing smoking exposure as observed in the bivariate analyses could not be confirmed in multivariable analysis. In none of the models was t(14;18) prevalence associated with smoking, either in analyses of pack years of cigarette smoking [Supplementary Figures S1(A) and S1(B) to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>] or in analyses of smoking status alone [Supplementary Figure S1(C) to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>].

Table I. Prevalence and frequency of t(14;18) in SHIP-0.

Characteristics	All [n(%)]	t(14;18)-positive [n(%)]	p-Value	Median t(14;18) frequency* per 10 ⁵ NCs of t(14;18)-positive cells (IQR)	p-Value
n	3966 (100)	1526 (38.5)		3.9 (2.0;8.1)	
Age (years)					
Median (IQR)	50 (36;64)	54 (40;65)		—	
Age group (years)					
20–29	511 (12.9)	123 (24.1)		3.0 (1.7;4.6)	
30–39	706 (17.8)	236 (33.4)		3.7 (1.9;6.3)	
40–49	706 (17.8)	265 (37.5)		3.5 (2.1;6.5)	
50–59	721 (18.2)	340 (47.2)		4.1 (2.1;9.4)	
60–69	732 (18.5)	318 (43.4)		4.9 (2.5;9.7)	
70–81	590 (14.9)	244 (41.4)	< 0.05†	3.9 (1.9;8.6)	< 0.001§
Sex					
Male	1962 (49.5)	850 (43.3)		3.9 (2.1;8.0)	
Female	2004 (50.5)	674 (33.7)	< 0.001†	3.9 (2.0;8.3)	0.41¶
Smoking status					
Non-smoker	1859 (46.9)	678 (36.5)		3.9 (2.0;8.3)	
Ex-smoker	1022 (25.8)	430 (42.1)		3.8 (2.1;8.1)	
Current smoker	1085 (27.4)	418 (38.5)	0.01†	3.9 (2.1;7.8)	0.90§
Pack years					
Median (IQR)	1 (0;15)	3 (0;18)			
Pack year categories					
Missing	162 (4.1)	72 (44.4)		—	
0	1865 (47.0)	680 (36.5)		3.9 (2.0;8.3)	
> 0–< 10	688 (17.3)	238 (34.6)		3.8 (2.1;7.1)	
10–< 20	520 (13.1)	204 (39.2)		3.8 (1.9;7.3)	
20–< 30	360 (9.1)	154 (42.8)		3.4 (2.0;7.2)	
30–< 40	194 (4.9)	85 (43.8)		4.2 (2.3;8.5)	
≥ 40	177 (4.5)	93 (52.5)	< 0.05†	5.0 (2.7;10.9)	0.06§

SHIP, Study of Health in Pomerania; NCs, nucleated cells; IQR, interquartile range.

*Median t(14;18) frequency among t(14;18)-positive subjects.

† χ^2 test.

‡ χ^2 test.

§Kruskal–Wallis-test.

¶Mann–Whitney U-test.

4 C. Hirt et al.

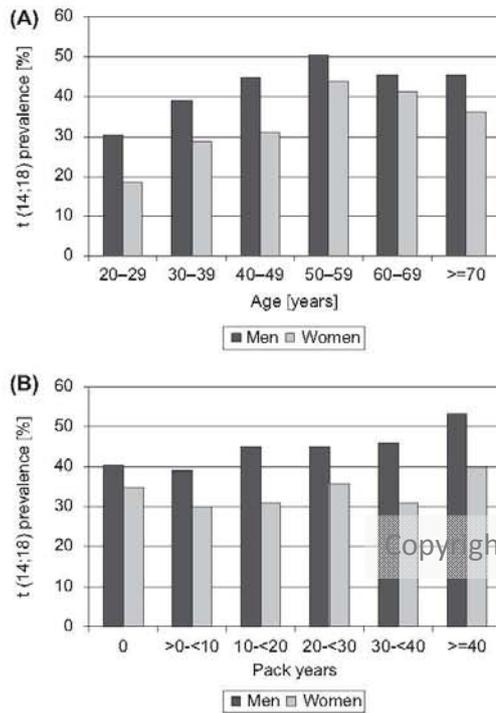


Figure 1. t(14;18) prevalence according to age and sex (A) and pack year categories of cigarette smoking (B).

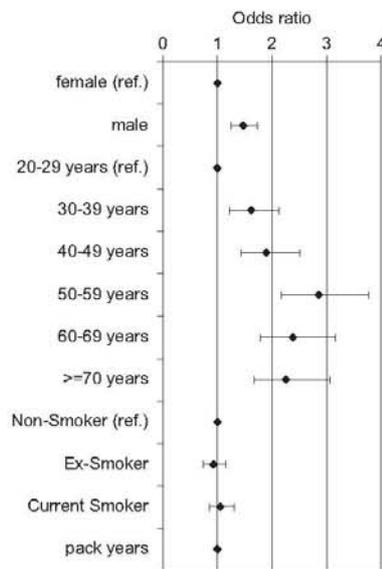


Figure 2. Odds ratios (♦) and 95% confidence intervals for t(14;18) prevalence from a logistic regression model containing sex, age, smoking status and pack years of cigarette smoking as a continuous variable.

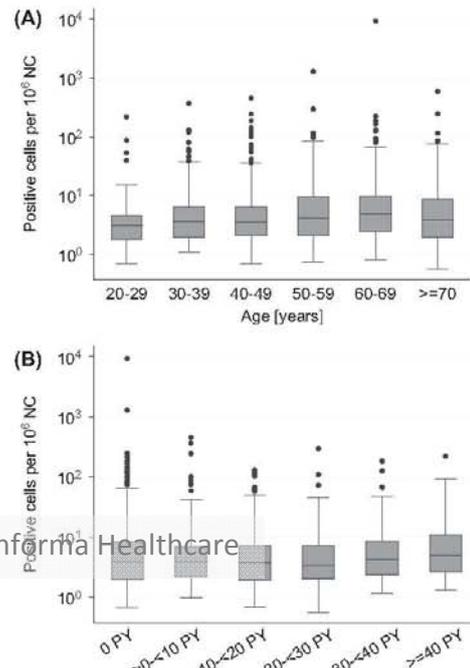


Figure 3. Univariate analysis of t(14;18) frequency according to age (A) and pack year categories of cigarette smoking (B). Horizontal lines within boxes denote median t(14;18) frequency, lower and upper bounds of boxes represent 25th and 75th percentiles, I bars indicate upper (largest data value that is less than or equal to third quartile + 1.5 × Interquartile range) and lower (smallest data value that is greater than or equal to first quartile - 1.5 × Interquartile range) adjacent limits, and ♦ represents outliers.

com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177], or in a combined analysis of pack years and smoking status (Figure 2).

Results of uni- and bivariate analyses of t(14;18) frequency and age, sex and smoking

Analyses of the association of age, sex and smoking with the frequency of t(14;18)-positive cells were restricted to t(14;18)-positive subjects. The median t(14;18) frequency of all positive subjects was 3.9 per million NCs, and the maximum observed was 9299 per million NCs. Similar to the age-dependent rise in t(14;18) prevalence, there was a small but statistically significant increase in t(14;18) frequency with age [Table I, Figure 3(A)]. Unlike the prevalence, t(14;18) frequency did not differ significantly between men and women [Table I, Supplementary Figure S2(A) to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>].

In bivariate analyses, cigarette smoking did not show a clear association with t(14;18) frequency. Comparing the median t(14;18) frequencies for non-smokers (3.9 per million NCs), ex-smokers (3.8 per million NCs) and current smokers (3.9 per million NCs), we observed no differences [$p = 0.9$, Table I, Supplementary Figure S2(B) to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>].

t(14;18) in healthy individuals 5

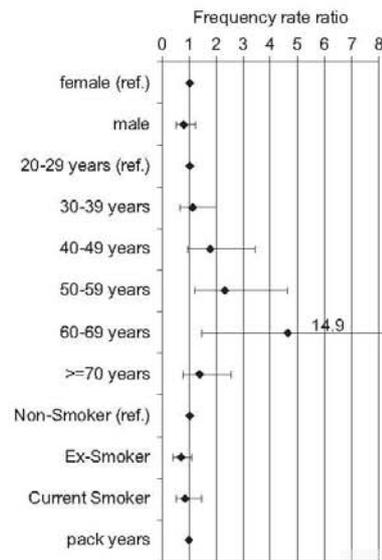


Figure 4. Frequency rate ratios (●) and 95% confidence intervals from a multivariable negative binomial regression model of t(14;18) frequency in t(14;18)-positive subjects containing sex, age, smoking status and pack years of cigarette smoking as a continuous variable.

10.3109/10428194.2013.788177]. Similarly, there was no association with the number of pack years [Table I and Figure 3(B)].

Multivariable analyses confirm that age but not sex or smoking is associated with t(14;18) frequency in subjects without lymphoma

Multivariable models of age, sex and different measures of smoking exposure confirmed that only age was indeed positively associated with t(14;18) frequency, whereas sex was not (relative frequency for men compared to women 0.77, $p = 0.28$; Figure 4, Supplementary Table SIII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>). Median t(14;18) frequency rose continuously with increasing age up to 60–69 years (Figure 4 and Supplementary Table SIII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>).

The results for smoking were inconclusive. Multivariable models containing age, sex and pack years either categorized or as a continuous variable failed to demonstrate a consistent association with t(14;18) frequency [Supplementary Figures S3(A) and S3(B), Supplementary Table SIII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>]. Compared to non-smokers (0 pack years), t(14;18) frequency was lower in all pack year categories. The model of age, sex and smoking status showed a lower t(14;18) frequency in both current smokers and ex-smokers compared to non-smokers [Supplementary Figure 3(C), Table SIII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>]. In a combined analysis of sex, age, smoking

status and pack years, the only parameter that was significantly associated with t(14;18) frequency was age, whereas measures of smoking exposure were not associated with t(14;18) frequency (Figure 4, Supplementary Table SIII to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>).

Discussion

The detection of t(14;18)-positive cells in individuals without lymphoma was first described in 1991 [9]. Since then, a number of studies have analyzed the association of known FL risk factors with the prevalence and/or frequency of t(14;18)-positive cells in individuals without lymphoma. However, results were conflicting as to whether t(14;18) prevalence and frequency increases with age [10,12,16,17] or not [14,20–22]. Two studies reported a higher t(14;18) prevalence in males than in females [11,12], an observation that was not confirmed by other authors [14,20,22]. Baccarelli *et al.* found in bivariate analyses a higher prevalence in men than in women, but the difference was not statistically significant [23]. Similarly, the authors did not observe any differences in

cells by sex. Only two studies examined the association between smoking and t(14;18) prevalence and frequency in healthy individuals [11,21]. Rauzy *et al.* demonstrated an association between higher smoking exposure measured as pack years and t(14;18) prevalence among 39 bone marrow samples, but found no association with smoking habits in peripheral blood samples from 137 additional healthy volunteers [21]. In a study of blood samples from 86 smokers and 36 non-smokers, Bell *et al.* reported a statistically significant association between smoking exposure and t(14;18) prevalence and frequency, although the differences in t(14;18) frequencies between pack year groups were very small. To our knowledge the report of Bell *et al.* was the first (and so far only) analysis that examined different smoking exposure measures in combination with age, sex and race. Sex and, unlike in our analysis, pack years remained statistically significant, whereas age showed no significant association in the adjusted model [11]. However, the small sample size required broad pack year categories, increasing the chance of residual confounding.

Hence, common limitations of most previous studies were small sample sizes (Liu: $n = 84$ [10], Ji: $n = 132$ [12], Rauzy: $n = 185$ [21], Summers: $n = 481$ [14], Schmitt: $n = 204$ [22], Roulland: $n = 26$ individuals [16]), and usually a focus on only one risk factor or exposure. Because of the small sample sizes, most studies were not able to perform multivariable analyses and to adjust for confounding of different variables that might affect t(14;18) prevalence and frequency in healthy individuals.

To overcome these limitations of previous studies, we used peripheral blood buffy coat samples and epidemiological cross-sectional data of 4152 subjects from a population-based cohort study in north-eastern Germany (SHIP) to analyze factors associated with the prevalence and frequency of t(14;18)-positive cells in individuals without lymphoma. We did not find an association of smoking status or pack years and either t(14;18) prevalence or frequency in individuals

6 C. Hirt et al.

without lymphoma. The observation of an increasing t(14;18) prevalence with increasing numbers of pack years in the initial bivariate analysis turned out to be completely due to confounding by age and sex, as documented by multivariable analysis [Figure 2, Supplementary Figures S1(A) and S1(B) to be found online at <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.788177>]. Therefore we assume that positive associations of heavy smoking and t(14;18) frequency and prevalence as reported in much smaller studies [11,21] also resulted most likely from confounding, and do not represent true associations.

This absence of an impact of smoking on t(14;18) prevalence and frequency in HIs is in line with the evidence for associations of smoking with DLBCL and FL risk. Most epidemiologic studies did not observe an association between smoking status or a positive dose-response relationship of pack years of smoking and non-Hodgkin lymphoma (NHL) risk [24]. When analyzed according to histologic subtype, there seems to be a weak association with FL but no significant association for DLBCL [25–27].

Moreover, this lack of association is in accordance with results from studies that examined risk factors according to t(14;18) status of patients with DLBCL and FL (detected by either fluorescence *in situ* hybridization [FISH] [28–30] or PCR [31]), which also found no consistent association between smoking and t(14;18)-positive NHL. Two of three studies that analyzed NHL cases according to the presence of a FISH-detectable t(14;18) found only an association between tobacco exposure and t(14;18)-negative NHL, but no clear association between t(14;18)-positive NHL and tobacco use [28,29]. The study by Chang *et al.* did not find any association of smoking habits and t(14;18)-positive DLBCL and FL [30]. An earlier report from the Factors Affecting Rural Men (FARM) study that used PCR for the identification of t(14;18)-positive NHL [31] showed non-significant positive associations for cigarette smoking with t(14;18)-positive NHL (odds ratio [OR] 1.7, confidence interval [CI] 0.9–3.3), and ORs were around unity for all categories of high smoking exposure. These inconsistent results indicate that there is – if any – only a weak association between smoking and t(14;18)-positive NHL.

The results of the present study document clearly that t(14;18) prevalence and frequency in HIs rise steadily with increasing age. The t(14;18) prevalence was highest in the age group 50–59 years, and did not increase further in subjects older than 60 years. Among the prevalent subjects t(14;18) frequency increased up to the age group 60–69 years, with a non-significant drop in the median frequency in subjects 70 years and older. Agopian *et al.* demonstrated in pesticide-exposed persons but also in some unexposed subjects that this increase in t(14;18) frequency was mainly due to a clonal expansion of one or two dominant t(14;18)-positive clones, and not a result of the accumulation of an increasing number of distinct clones [32]. These authors hypothesized that clonal expansion results from an immunogenic effect of agricultural pesticide exposure and other environmental factors. Higher age by itself leads to an altered adaptive as well as innate immune response [33], and these alterations might – in addition to other factors – contribute to both increased t(14;18) frequency and increased FL incidence with increasing age.

In the present study we observed a higher t(14;18) prevalence in men than in women (43.3% vs. 33.7%, ratio 1.3, $p < 0.001$) that parallels the higher incidence rates of FL and DLBCL in men (US Surveillance, Epidemiology and End Results [SEER]: male-female incidence rate ratios among whites: 1.6 for DLBCL and 1.2 for FL) [34]. There was no difference in the frequency of t(14;18)-positive cells between men and women.

A potential weakness of our results is the lack of information on differential blood counts of the samples, and therefore we were unable to adjust the t(14;18) results for the percentage of lymphocytes. However, using white blood cell count in an alternative analysis based on absolute rather than relative t(14;18) frequency did not change the parameter estimates.

To date this report is the largest population-based cross-sectional study analyzing t(14;18) prevalence and frequency in subjects without lymphoma. Our data confirm that the detection of t(14;18)-positive cells is clearly associated with the known FL risk factors age and sex and that there is no association with smoking. Recent studies have demonstrated that t(14;18)-positive cells harbor additional molecular changes, indicating that these cells could be bona fide lymphoma precursor cells [32], suggesting the potential utility of t(14;18) as a biomarker of lymphoma risk. It remains to be established by prospective studies in the future whether in some of these subjects t(14;18)-positive cells indeed transform into malignant lymphoma cells, and which features of malignant progression [e.g. t(14;18) frequency, ongoing activation-induced cytidine deaminase (AID) expression] allow an early identification of individuals at risk.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Ute Pett.

SHIP is part of the Community Medicine Net (<http://www.medizin.uni-greifswald.de/icm>) of the University of Greifswald, which is funded by grants from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, grant 01ZZ96030, 01ZZ0701); the Ministry for Education, Research, and Cultural Affairs; and the Ministry for Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

- [1] Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, et al. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987;317:1185–1189.
- [2] Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:18–29.
- [3] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
- [4] Graninger WB, Seto M, Boutain B, et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 1987;80:1512–1515.
- [5] Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334–336.

- [6] Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-442.
- [7] McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
- [8] McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 1991;349:254-256.
- [9] Limpens J, De Jong D, Van Krieken JHJM, et al. Bcl-2/ I_H rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 1991;6:2271-2276.
- [10] Liu Y, Hernandez AM, Shbata D, et al. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8910-8914.
- [11] Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:223-224.
- [12] Ji W, Qu G, Ye P, et al. Frequent detection of bcl-2/ I_H translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res* 1995;55:2876-2882.
- [13] Dölken G, Illerhaus G, Hirt C, et al. BCL-2/ I_H -rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol* 1996;14:1333-1344.
- [14] Summers KE, Goff LK, Wilson AG, et al. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2001;19:420-424.
- [15] Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, et al. Characterization of the t(14;18) BCL2-IgH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 2004;64:2264-2269.
- [16] Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, et al. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* 2006;20:158-162.
- [17] Schüller F, Dölken L, Hirt C, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer* 2009;124:958-963.
- [18] John U, Greiner B, Hensel E, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz Präventivmed* 2001;46:186-194.
- [19] Dölken L, Schüller F, Dölken G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *BioTechniques* 1998;25:1058-1064.
- [20] Fuscoe JC, Setzer RW, Collard DD, et al. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposure to carcinogens. *Carcinogenesis* 1996;17:1013-1020.
- [21] Rauzy O, Galoin S, Chale JJ, et al. Detection of t(14;18) carrying cells in bone marrow and peripheral blood from patients affected by non-lymphoid diseases. *Mol Pathol* 1998;51:333-338.
- [22] Schmitt C, Balogh B, Grundt A, et al. The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. *Leuk Res* 2006;30:745-750.
- [23] Baccarelli A, Hirt C, Pesatori AC, et al. t(14;18) translocations in lymphocytes of healthy dioxin-exposed individuals from Seveso, Italy. *Carcinogenesis* 2006;27:2001-2007.
- [24] Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 2007;120(Suppl. 12):1-39.
- [25] Morton LM, Hartge P, Holford TR, et al. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (Interlymph). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:925-933.
- [26] Parker AS, Cerhan JR, Dick F, et al. Smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in a cohort of older women. *Leuk Lymphoma* 2000;37:341-349.
- [27] Stagnaro E, Tumino R, Parodi S, et al. Non-Hodgkin's lymphoma and type of tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:431-437.
- [28] Chiu BC, Dave BJ, Blair A, et al. Cigarette smoking, familial hematopoietic cancer, hair dye use, and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol* 2007;165:652-659.
- [29] Chang CM, Schroeder JC, Olshan AF, et al. A case-control study of tobacco use and other non-occupational risk factors for lymphoma subtypes defined by t(14;18) translocations and bcl-2 expression. *Cancer Causes Control* 2010;21:1147-1154.
- [30] Chang CM, Wang SS, Dave BJ, et al. Risk factors for non-Hodgkin lymphoma subtypes defined by histology and t(14;18) in a population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 2009;20:939-947.
- [31] Schroeder JC, Olshan AF, Baric R, et al. A case-control study of tobacco use and other non-occupational risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13:159-168.
- [32] Agopian J, Navarro JM, Gac AC, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med* 2009;206:1473-1483.
- [33] Cramer DW, Flinn OJ. Epidemiologic perspective on immune-surveillance in cancer. *Curr Opin Immunol* 2011;23:265-271.
- [34] Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006;107:265-276.

Supplementary material available online

Tables SI-SIII and Figures S1-S3 showing further results

Supplementary material: Hirt C*, Weitmann K*, Schüler F, Kiefer T, Rabkin CS, Hoffmann W, Dölken G. Circulating t(14;18)-Positive Cells in Healthy Individuals - Association with Age and Sex but not with Smoking. LEUKEMIA & LYMPHOMA. 2013; 54(12):2678-2684

Supplemental Table SI: t(14;18) Prevalence According to Age, Sex and Smoking Status

Age [Years]	Smoking Status	Men					Women				
		N	%	t(14;18)-Positive (n)	t(14;18)-Positive (%)	p-value	N	%	t(14;18)-Positive (n)	t(14;18)-Positive (%)	p-value
20-29	Current Smoker	129	53.5	41	31.8	0.70	82	30.4	18	22	0.48
	Ex-Smoker	33	13.7	8	24.2		27	10.0	6	22.2	
	Non-Smoker	79	32.8	24	30.4		161	59.6	26	16.2	
	All	241	100	73	30.3		270	100	50	18.5	
30-39	Current Smoker	145	44.9	65	44.8	0.14	148	38.6	39	26	0.61
	Ex-Smoker	75	23.2	27	36.0		45	11.8	12	26.7	
	Non-Smoker	103	31.9	34	33.0		190	49.6	59	31	
	All	323	100	126	39.0		383	100	110	28.7	
40-49	Current Smoker	139	41.9	58	41.7	0.57	60	16.0	20	33.3	0.86
	Ex-Smoker	109	32.8	50	45.9		60	16.0	20	33.3	
	Non-Smoker	84	25.3	41	48.8		208	55.6	65	31.3	
	All	332	100	149	44.9		374	100	116	31.0	
50-59	Current Smoker	100	28.7	54	54.0	0.72	68	18.2	27	39.7	0.72
	Ex-Smoker	143	41.1	70	49.0		43	11.5	20	46.5	
	Non-Smoker	105	30.2	52	49.5		262	70.2	117	44.7	
	All	348	100	176	50.6		373	100	164	44.0	
60-69	Current Smoker	83	21.4	47	56.6	0.007	33	9.6	14	42.4	0.98
	Ex-Smoker	219	56.4	101	46.1		35	10.2	14	40.0	
	Non-Smoker	86	22.2	28	32.6		276	80.2	114	41.3	
	All	388	100	176	45.4		344	100	142	41.3	
≥70	Current Smoker	39	11.8	18	46.2	0.96	13	5.0	6	46.2	0.74
	Ex-Smoker	205	62.1	92	44.9		28	10.8	10	35.7	
	Non-Smoker	86	26.1	40	46.5		219	84.2	78	35.6	
	All	330	100	150	45.5		260	100	94	36.2	
All	Current Smoker	635	32.4	283	44.6	0.25	450	22.5	135	30.0	0.16
	Ex-Smoker	784	40.0	348	44.4		238	11.9	82	34.5	
	Non-Smoker	543	27.7	219	40.3		1316	65.7	459	34.9	
	All	1962	100	850	43.3		2004	100	676	33.7	

Supplemental Table S11: Logistic Regression Model of t(14;18) Prevalence

Parameter	model 1		model 2		model 3		model 4	
	OR	p-value	OR	p-value	OR	p-value	OR	p-value
female	1		1		1		1	
male	1.47	<0.001	1.48	<0.001	1.46	<0.001	1.45	<0.001
20-29 years	1		1		1		1	
30-39 years	1.61	0.001	1.57	0.001	1.61	0.001	1.59	0.001
40-49 years	1.90	<0.001	1.89	<0.001	1.91	<0.001	1.87	<0.001
50-59 years	2.85	<0.001	2.91	<0.001	2.83	<0.001	2.79	<0.001
60-69 years	2.38	<0.001	2.41	<0.001	2.33	<0.001	2.30	<0.001
>=70 years	2.26	<0.001	2.26	<0.001	2.20	<0.001	2.17	<0.001
Non-Smoker	1		1		1		1	
Ex-Smoker	0.92	0.44	1.00	0.99				
Current Smoker	1.05	0.65	1.09	0.32				
0 pack years	1		1		1		1	
>0-<10 pack years	0.92	0.44	1.00	0.99	1.02	0.85	0.83	1.25
10-<20 pack years	1.05	0.65	1.09	0.32	1.07	0.57	0.85	1.33
20-<30 pack years					0.97	0.81	0.75	1.25
30-<40 pack years					0.99	0.96	0.71	1.37
>=40 pack years					1.21	0.27	0.86	1.72
pack years (continuous)	1.00	0.48	0.996	1.01			1.00	0.37
								0.997; 1.01

model 1: Sex, age, smoking status and pack years as a continuous variable

model 2: Sex, age and smoking status

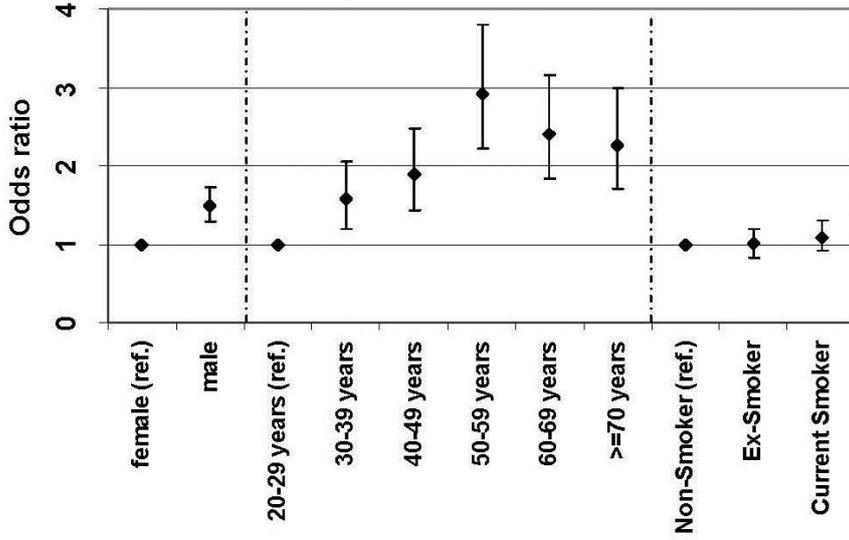
model 3: Sex, age and pack year groups

model 4: Sex, age and pack years as a continuous variable

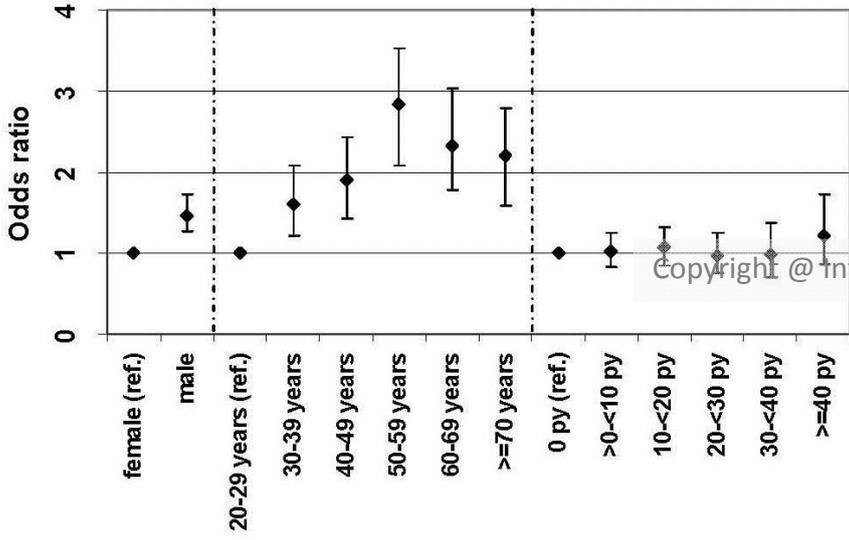
OR: Odds ratio, CI: Confidence Interval

Copyright @ Informa Healthcare

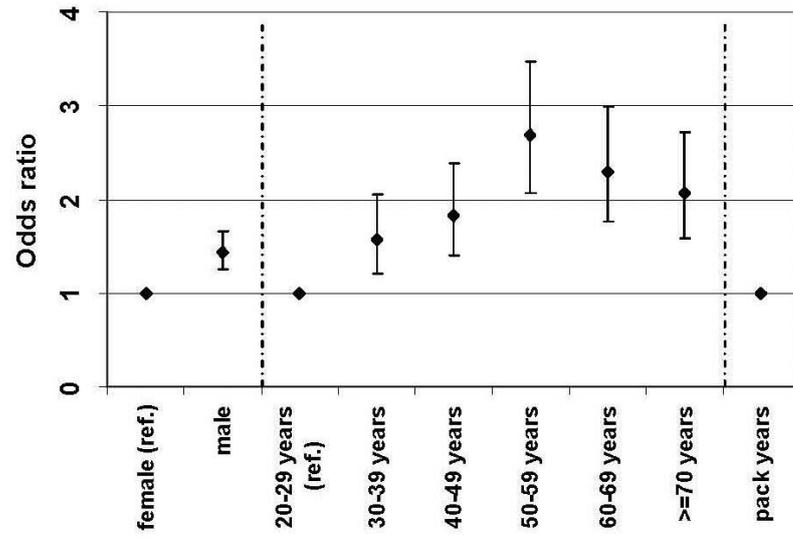
Supplemental Figure S1C



Supplemental Figure S1B



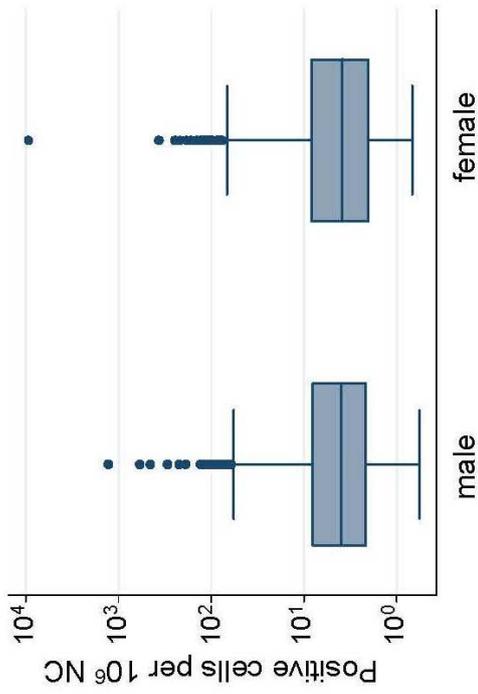
Supplemental Figure S1A



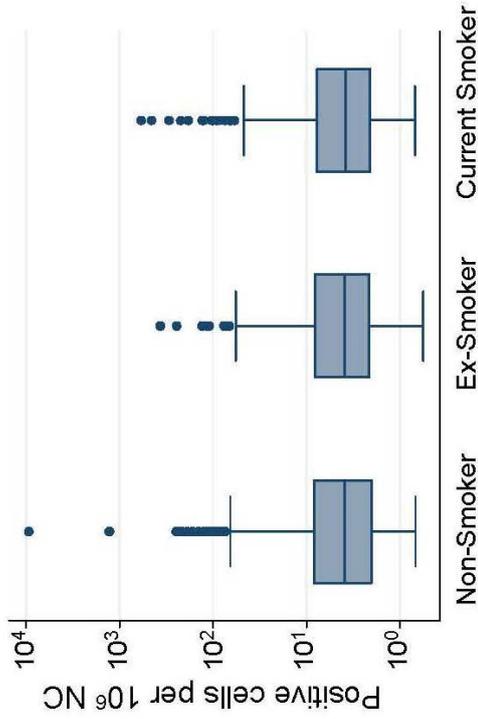
Supplemental Figure S1: Multivariable logistic regression model of t(14q11.8) prevalence containing sex, age groups and pack years of cigarette smoking as a continuous variable (S1A), pack year groups (S1B) and smoking status (S1C).

Copyright © Informa Health

Supplemental Figure S2A

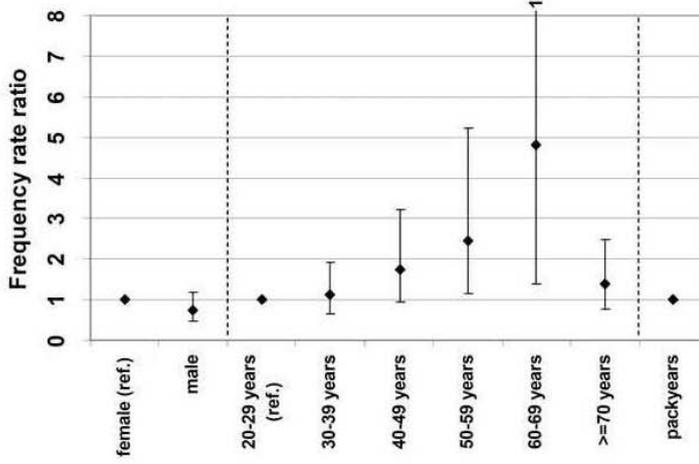


Supplemental Figure S2B

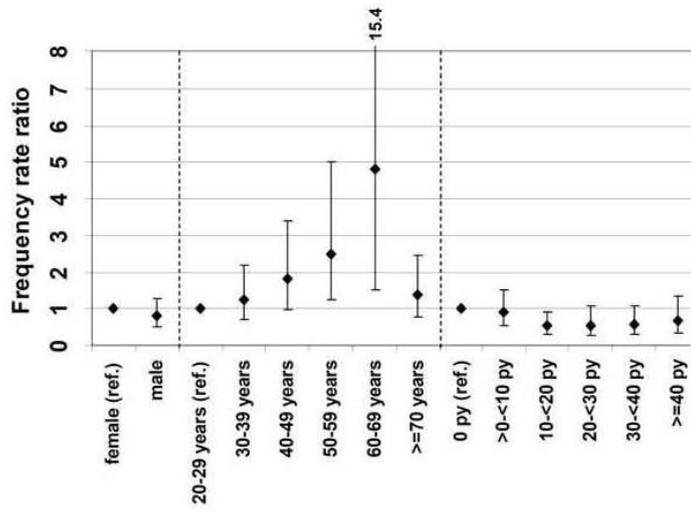


Supplemental Figure S2: Bivariate analyses of $t(14;18)$ frequency according to sex (Fig. S2A) and smoking status (Fig. S2B). The horizontal lines within the boxes denotes the median $t(14;18)$ -frequency, the lower and upper bounds of the boxes represent the 25 and the 75 percentile, the I bars indicate upper (largest data value that is less than or equal to the 3rd quartile + 1.5 x interquartile range) and lower (smallest data value that is greater than or equal to the 1st quartile - 1.5 x interquartile range) adjacent limits, and • represents outliers.

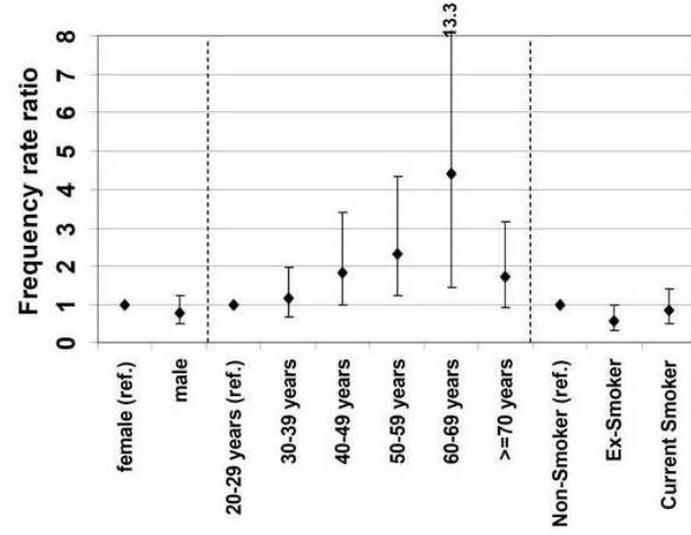
Supplemental Figure S3A



Supplemental Figure S3B



Supplemental Figure S3C



Supplemental Figure S3: Multivariable analysis of the association between t(14;18) frequency in t(14;18)-positive subjects and sex, age and pack years of smoking as continuous variable (S3A), pack year groups (S3B) and smoking status (S3C).

Cancer Causes Control (2015) 26:455–465
DOI 10.1007/s10552-015-0525-4

ORIGINAL PAPER

Influence of reproductive history and exogenous hormone use on prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in a population-based cross-sectional study

Kerstin Weitmann · Carsten Hirt · Sabine Schwarz · Charles Rabkin · Gottfried Dölken · Wolfgang Hoffmann

Received: 5 May 2014 / Accepted: 10 January 2015 / Published online: 30 January 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Purpose The t(14;18) translocation might represent an intermediate step in the pathogenesis of follicular lymphoma (FL), one of the most common subtypes of non-Hodgkin lymphoma. Circulating t(14;18)-positive cells can also be detected in 30–60 % of healthy individuals at low frequencies. Some studies found a negative association between reproductive factors or use of menopausal hormone therapy (MHT) with FL. The objective of this study was to evaluate whether there is an association between number of frequencies, oral contraceptive (OC) use, menopausal status and MHT, and t(14;18) prevalence and frequency in a representative population analysis based on an epidemiologic study in the north-eastern part of Germany.

Methods The analysis is based on results of buffy coat samples from 1,981 women of the Study of Health in Pomerania (SHIP-0) and data obtained in standardized face-to-face

interviews. For prevalence, odds ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI) were calculated using unconditional logistic regression. Frequency data were analyzed using negative binomial regression. The multivariable models included age, number of pregnancies, menopausal status (premenopausal, natural, medical/surgical menopause), OC use and MHT as a measure for exogenous hormone exposure use.

Results We found no association between reproductive history and combined exogenous hormone use on the prevalence of circulating t(14;18)-positive cells. Modeling MHT and OC use separately in a sensitivity analysis, the MHT parameter yielded statistical significance [OR 1.37 (95 % CI 1.04;1.81)]. t(14;18) frequency was associated with use of OC [incidence rate ratio (IRR) for ever use 3.18 (95 % CI 1.54;6.54)], current use [IRR 3.86 (1.56;9.54)], >10 years use [IRR 3.93 (1.67;9.23)] and MHT [restricted to postmenopausal women; IRR 2.63 (95 % CI 1.01;6.85)] in bivariate age-adjusted analyses. In the multivariable model, medical/surgical menopause [IRR 2.46 (1.11;5.44)] and the category ever use of OC and MHT were statistically significant [IRR 2.41 (1.09;5.33)].

Conclusions Exogenous hormone use might be a risk factor for t(14;18) frequency rather than for t(14;18) prevalence. Further research on healthy individuals carrying a t(14;18) translocation and possible risk factors for malignant lymphoma is necessary to determine the additional molecular or immunological events that have to occur to develop FL.

Keywords t(14;18) translocation · Healthy individuals · Reproductive history · Exogenous hormone use

Introduction

Non-Hodgkin lymphomas (NHL) comprise a heterogeneous group of lymphoid malignancies of different morphology and

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10552-015-0525-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Weitmann (✉) · G. Dölken · W. Hoffmann
Department Epidemiology of Health Care and Community Health, Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, Ellernholzstr. 1-2, 17487 Greifswald, Germany
e-mail: kerstin.weitmann@uni-greifswald.de

C. Hirt
Department of Haematology and Oncology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

S. Schwarz
German Agency for Quality in Medicine ÄZQ, Berlin, Germany

C. Rabkin
Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

genetic characteristics [1]. Causes for common NHL subtypes remain largely unclear [2]. In epidemiologic studies, risk factors for NHL were often associated with the immune system [3], including HIV infection and immunosuppressive therapy following organ transplantation [2]. Female hormones like estrogen, progesterone, and prolactin modulate the immune system and influence the immune response. Estrogen decreases plasma levels of interleukin 6, which is a growth factor for intermediate- and high-grade NHL [4, 5]. During pregnancy, estrogen and progesterone levels rise [6, 7]. Hence, reproductive factors could explain the lower prevalence of NHL in females compared to males [8, 9].

The two most common subtypes of NHL are follicular lymphomas (FL) with about 20 % and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) with about 20–35 % of NHL cases [10–12]. In the USA, for both lymphoma subtypes, higher incidence rates have been reported in men than in women [FL: male–female incidence rate ratio (IRR) of 1.2 for Whites and Asians; IRR 1.6 for Blacks; DLBCL: male–female IRR of 1.6 for Whites; IRR 1.8 for Blacks; IRR 1.4 for Asians] [13]. However, systematic gender differences may be restricted to subgroups of the subtypes. Recent data from Europe show no sex differences or even a slightly reversed gender ratio of 0.9 for FL [14].

In both FL and DLBCL, high t(14;18) translocation prevalence rates have been detected (FL: 70–90 %, DLBCL: 30–50 %) [15–17]. The t(14;18) translocation involves the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus on chromosome 14q32 and the BCL-2 gene on chromosome 18q21 [18]. The translocation results from an illegitimate V(D)J-recombination [19] and leads to a constitutive overexpression of the BCL-2 gene [20]. The resulting BCL-2 protein is involved in a deregulation of apoptosis [21]. Hence, the t(14;18) translocation might represent an intermediate step in the pathogenesis of both NHL subtypes [22, 23]. In animal studies, it was shown that estrogen treatment reduces early $\text{c}\mu$ + pre-B cells and IgH gene rearrangements [24]. So estrogen might decrease the genesis of the t(14;18) translocation.

The t(14;18) translocation can also be detected in healthy individuals, as first described by Limpens et al. [25]. In Western countries, about 30–60 % of healthy persons are carrying this genetic translocation, whereas in Asia, lower prevalence rates were reported [26–28]. These results are in line with the low incidence of FL in Japan [29]. Similar to FL prevalence rates, higher prevalence rates of the t(14;18) translocation in males compared to females were observed in healthy individuals [26, 30–32].

Some studies reported negative association between FL and higher sex hormone levels [33–37]. Changes in estrogen hormone levels in women occur during and after pregnancy and menopause and can also be influenced exogenously by gender-specific drug use like oral contraceptives (OC) or menopausal hormone replacement therapy (MHT).

Particularly high t(14;18) frequencies in healthy individuals have been shown to be an early biomarker for FL [38]. Currently, it is unknown whether there is an association between sex-specific hormone levels and the prevalence of the t(14;18) translocation in healthy women. Therefore, the objective of our study was to evaluate a possible association between both the prevalence and the frequency of circulating t(14;18)-positive cells with number of pregnancies and menopausal status as well as gender-specific use of exogenous hormones such as OC and MHT in healthy women in a large representative population-based cross-sectional analysis.

Materials and methods

Study population

The Study of Health in Pomerania (SHIP-0) is a representative sample of the general population in the north-eastern part of Germany. Details on the study design, recruitment and objectives have been published previously [39]. Briefly, in a two-stage design, a population sample of 7,008 men and women between 20 and 79 years was drawn randomly using German population registries. After exclusion of migrated or deceased persons, the net sample comprised 6,265 individuals. A total of 4,308 individuals (2,192 females, 2,116 males) participated (response proportion 68.8 %). Written informed consent was obtained from each participant. Aims of SHIP-0 are to estimate the prevalence of risk factors, subclinical disorders, and common clinical diseases as well as their complex associations.

Each participant underwent a comprehensive standardized medical examination. Data collection included a computer-aided personal face-to-face interview (CAPI) and a health- and risk factor-related questionnaire to be completed by the participants. Blood samples were drawn from the cubital vein according to standardized procedures. The SHIP-0 study was approved by the Ethics Committee of the University of Greifswald.

Biosamples

The detection of the t(14;18) translocation in this study population was described previously [32]. The phenol-chloroform method was used to isolate DNA from peripheral blood buffy coat cells (nucleated cells, NC). DNA was stored at -20°C . The t(14;18) MBR (major break-point region) of BCL2 was identified by using real-time quantitative PCR. Wild-type K-RAS gene (reference gene, two copies per genome) was determined as described previously [40]. For the t(14;18) assay, five replicates of 1 μg DNA were used. The t(14;18) MBR PCR assay had a sensitivity of one

t(14;18)-positive cell in 5×10^5 nucleated cells. A forward and reverse primer at a concentration of 400 nM, a TaqMan probe at a concentration of 200 nM, the standard TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), and 1.0 μ g DNA in a total volume of 50 μ l were contained in the PCR mixture. The 2-min incubation at 50 °C to allow for cleavage by Uracil-N-Glycosylase was followed by incubation at 95 °C for 10 min to activate AmpliTaq Gold. Each PCR cycle included 15 s denaturation at 95 °C, and 1 min of combined annealing/extension at 61 °C. Dilution DNA of Karpas 422 cells was used to establish standard curves for the t(14;18) MBR PCR and for the K-RAS wild-type PCR. In all PCR experiments, appropriate positive and negative controls were included.

For analyzing the influence of reproductive history and exogenous hormone exposure on prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells, peripheral blood buffy coat samples from a total of 2,008 (91.6 %) women were available. A biosample was classified as t(14;18) MBR positive if ≥ 1 of the replicates was PCR positive. None of the t(14;18) negative samples met our a priori exclusion criterion of containing less 200,000 K-RAS genome equivalents. To obtain the t(14;18) frequency, the t(14;18) copies from all five replicates were summed up and afterward divided by the sum of tested cells (WT K-RAS copies: 2). The result was multiplied by 10^6 to express the frequency as t(14;18)-positive cells per million NC.

Assessment of reproductive history and exogenous hormone use

In the standardized computer-assisted personal interview (CAPI), reproductive history and menopausal status as well as gender-specific drug use including OC and MHT were solicited from all female participants in SHIP-0.

The number of pregnancies and the number of births were categorized as none, one, two, three, and four or more. Women who responded “yes” to ever having taken OC were classified as ever users. Women who responded “no” to the same question were classified as non-users. Based on the question concerning current use of OC, ever users were differentiated in current and past users; unknown current usage was categorized as unknown. Duration of OC use was categorized to >0 to <5 , 5 to <10 , and ≥ 10 years.

The determination of menopausal status was based on questions concerning presence of menstrual bleeding (yes/no), age at last period, and reason of cessation of periods (natural or medical/surgical). Women aged >40 years fulfilling the criteria of no menstrual bleeding for at least 1 year prior to the interview were categorized as being natural menopausal. Women reporting an induced cessation of menses were categorized as postmenopausal by medical/surgical reasons. Ever users of MHT were defined

as women who answered “yes” to the following question: “If you are menopausal, did you ever take any hormones during the menopausal transition or thereafter, e.g., patches, tablets, injections?” Based on the reported duration of hormone use, the MHT users were classified in two categories (>0 to <5 , ≥ 5 years). Approximate age at menopause was categorized in tertiles.

In the invitation letters, all participants were asked to bring their medication packages along and in the interview prescribed medication over the seven preceding days was solicited. On the basis of the provided medications, we were able to identify current MHT users. For an explorative analysis, we coded the medication according to the ATC (Anatomical Therapeutic Chemical classification system)-code subgroup GE03 “Sex hormones and modulators of the genital system.”

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the software package STATA (Intercooled STATA, STATA/SE 10.1, StataCorp., Texas, USA). In the descriptive statistics, categorical data were expressed as percentages; continuous data were expressed as median and interquartile range (IQR). Two group comparisons were calculated using Chi-squared test (χ^2 test) for categorical data and Mann–Whitney–U test (MW-test) or Kruskal–Wallis test for continuous data. A p value <0.05 was considered statistically significant. All statistical tests were two-sided. Unconditional logistic regression was used to calculate adjusted odds ratio (OR) and 95 % confidence intervals (CI). For frequency data, negative binomial regression models were conducted and incidence rate ratio (IRR) calculated including only t(14;18) positive women. All models were weighted by the number of tested cells. The calculation of the likelihood ratio test is not possible with a simultaneous application of the weight option. Applying the likelihood ratio test by calculating un-weighted models yielded that our count data are over-dispersed. Since the negative binomial regression can be regarded as a generalization of Poisson regression and should be used in cases of over-dispersion, we decided to use the negative binomial regression method as the non-conservative method.

Prior results concern age and sex as influencing factors both to prevalence and frequency for t(14;18). Since only women were investigated, we included only age as potential confounder in the full models. The remaining model variables operationalize major determinants of hormonal status, e.g., number of pregnancies, menopausal status including type of menopause (medical/surgical, natural) and exogenous hormone exposure use (only OC, only MHT, OC and MHT vs. no exogenous hormone exposure). This operationalization was selected to reflect our hypotheses of a risk

due to any exogenous female sex hormone rather than the effect of any specific source. In a sensitivity analysis, we provide corresponding results for a model in which ever use of OC and MHT were modeled as separate variables.

Results

A total of 2,192 women (median: 49, IQR: 36–62 years) participated in the SHIP-0 cohort. Results of biosamples were available for 2,008 females. Altogether 17 women were excluded from this evaluation: four of these declined to be interviewed and 13 cases reported a history of cancer at the time of the interview. Missing data of variables included in the multivariable model yielded to an exclusion of 23 women.

One thousand nine hundred and sixty-eight women could be analyzed (89.8 % of the total study population) for the prevalence of the t(14;18) translocation. Descriptive characteristics of reproductive history (number of pregnancies, number of birth) and exogenous hormone use are presented in supplementary Table S1.

Prevalence of t(14;18)

In 33.4 % ($N = 657$) of the women, at least one t(14;18) copy was detected per 10^6 cells [prevalence of t(14;18)]. In older women, the prevalence was higher than in younger women. The median age of t(14;18) prevalent females was 53 years (IQR: 40–63), whereas the non-prevalent women had a median age of 46 years (IQR: 34–61) (MW-test: $p < 0.001$). For increasing 10-year age categories, we found a positive prevalence trend from 18.5 % in the age group 20–29 years up to 43.8 % in the age group 50–59 years, followed by a 3 % decline in the next age group 60–69 years down to 35.5 % in the last group of ≥ 70 years (Table 1).

Reproductive history and exogenous hormone use as potential risk factors for the prevalence of the t(14;18) translocation are described in Table 1. In our study group, 85.3 % of the women had at least one pregnancy. The maximum number of pregnancies in our sample was 12. Women reporting two pregnancies represent the largest group among the t(14;18) prevalent women. Among women without any pregnancy, 25.3 % were t(14;18) positive, whereas the prevalence of t(14;18) among women with at least one pregnancy was 34.8 % (χ^2 test: $p = 0.001$). The prevalence of the t(14;18) translocation increased with increasing number of pregnancies from 25.3 % in women with zero pregnancies up to 38.6 % in women with four or more pregnancies (Table 1). This positive association of the t(14;18) prevalence with number of pregnancies was observed in almost the same manner for an increasing number of births.

Ever users of oral contraceptives had a lower t(14;18) prevalence rate (31.3 %) than never users (38.1 %) (χ^2 test: $p = 0.004$). Among the postmenopausal women, a significant higher percentage was t(14;18) positive (39.8 %) compared to premenopausal women (27.8 %, χ^2 test: $p < 0.001$). t(14;18) prevalence did not differ for approximate age at menopause (<48 years: 36.6 %, 48 to >52 years: 44.4 %, ≥ 52 years: 39.7 %, χ^2 test: $p = 0.14$). The crude OR showed a positive association of the t(14;18) prevalence with the number of pregnancies, use of oral contraceptives and menopausal status, which are mostly influenced by age (Table 1).

Analyses of hormone replacement therapy (MHT) were restricted to postmenopausal women only. The t(14;18) translocation was detected in almost half of the women (47.3 %) who reported ever use of MHT. The prevalence of never users was significantly lower (36.0 %, χ^2 test: $p = 0.002$). In bivariate age-adjusted analyses, ever use of MHT compared to never use yielded a statistically significant OR of 1.47 (1.09;2.00) as well as MHT use >0 to <5 years [OR 1.52 (1.07;2.18)].

In the multivariable model, we included age, number of pregnancies, menopausal status including type of menopause and exogenous hormone use for oral contraceptive use and menopausal hormone replacement therapy. In this model, only age showed a significant association with t(14;18) prevalence with the highest OR of 2.93 in age group 50–59 years (Table 1).

The risk estimates of age, number of pregnancies and menopausal status in a logistic regression model including OC and MHT as separate ever/never variables revealed comparable OR with the model in which both types of use were operationalized in one variable. The OR for OC use in the sensitivity model was 0.92 (0.69;1.23) and very similar to the OC/no MHT [OR 0.94 (0.67;1.32)] category, the OR for MHT use was 1.37 which is slightly lower as the parameter estimate for the category no OC/MHT [OR 1.42 (0.93;2.16)], and reached statistical significance (95 % CI 1.04;1.81).

Frequency of t(14;18)

Analyzing frequency data was restricted to t(14;18) positive women (33.2 %). Supplementary Table S2 provides median values of t(14;18) frequency per 10^6 NC for reproductive factors and exogenous hormone use categorized by age. The median number of positive NCs for the whole sample was 3.86 per 10^6 NC (IQR: 1.98–8.27) and increased with increasing age up to age group 60–69 (median: 4.75) followed by a small decrease in women aged ≥ 70 (median: 4.18). For the number of pregnancies, we did not observe statistically significant associations with t(14;18) frequency (Table 2). The age-adjusted parameter estimates up to three pregnancies were below one, only for women with more than three pregnancies

Table 1 Association of t(14;18) prevalence with reproductive history and exogenous hormone use

Total	N	t(14;18)-negative	t(14;18)-positive (%)	Crude OR (95 % CI)	Age-adjusted OR (95 % CI)	Multivariable ^a OR (95 % CI)
	1,968	1,311	657 (33.2)			
Age group						
20–29 years	270	220	50 (18.5)	1	–	1
30–39 years	381	271	110 (28.9)	1.78 (1.19;2.66)	–	1.72 (1.10;2.68)
40–49 years	370	257	113 (30.5)	2.01 (1.34;3.01)	–	1.80 (1.13;2.87)
50–59 years	368	207	161 (43.8)	3.54 (2.39;5.26)	–	2.93 (1.66;5.17)
60–69 years	334	198	136 (40.7)	3.05 (2.05;4.56)	–	2.57 (1.35;4.89)
≥70 years	245	158	87 (35.5)	2.52 (1.64;3.87)	–	2.25 (1.12;4.53)
Number of pregnancies						
Never pregnant (reference)	289	216	73 (25.3)	1	1	1
≥1	1,679	1,095	584 (34.8)	1.51 (1.13;2.04)	1.01 (0.72;1.41)	–
1	379	268	111 (29.3)	1.19 (0.82;1.71)	0.90 (0.61;1.33)	0.89 (0.60;1.32)
2	607	398	209 (34.4)	1.43 (1.03;1.99)	0.97 (0.67;1.40)	0.98 (0.67;1.42)
3	348	217	131 (37.6)	1.82 (1.27;2.60)	1.21 (0.80;1.81)	1.23 (0.81;1.85)
≥4	345	212	133 (38.6)	1.79 (1.25;2.57)	1.11 (0.74;1.66)	1.14 (0.75;1.72)
Number of births						
None (reference)	318	235	83 (26.1)	1	1	–
≥1	1,650	1,076	574 (34.8)	1.41 (1.06;1.87)	0.88 (0.64;1.22)	–
1	474	336	138 (29.1)	1.07 (0.76;1.50)	0.76 (0.53;1.09)	–
2	718	468	250 (34.8)	1.41 (1.03;1.92)	0.91 (0.64;1.30)	–
3	274	167	107 (39.1)	1.66 (1.15;2.39)	0.99 (0.65;1.49)	–
≥4	184	105	79 (42.9)	2.13 (1.42;3.19)	1.21 (0.77;1.91)	–
Use of OC						
Never (reference)	609	377	232 (38.1)	1	1	–
Ever	1,359	934	425 (31.3)	0.75 (0.61;0.93)	0.99 (0.74;1.31)	–
Past	676	479	197 (29.1)	0.83 (0.66;1.04)	0.97 (0.73;1.29)	–
Current	403	300	103 (25.6)	0.56 (0.42;0.75)	0.96 (0.65;1.44)	–
Past/current unknown	280	155	125 (44.6)	2.05 (0.85;4.90)	1.63 (0.65;4.09)	–
Total number of years of OC use^b						
>0 to <5 years	352	247	105 (29.8)	0.67 (0.50;0.91)	0.89 (0.63;1.26)	–
5 to <10 years	335	237	98 (29.3)	0.70 (0.52;0.95)	1.21 (0.82;1.77)	–
≥10 years	662	442	220 (33.2)	0.83 (0.65;1.06)	1.02 (0.74;1.39)	–
Menopausal status						
Premenopausal (reference)	1,054	761	293 (27.8)	1	1	1
Postmenopausal	914	550	364 (39.8)	1.67 (1.37;2.05)	0.98 (0.66;1.45)	–
Type of menopause						
Natural	647	390	257 (39.7)	1.64 (1.32;2.05)	0.93 (0.61;1.42)	0.94 (0.61;1.43)
Medical/surgical	267	160	107 (40.1)	1.76 (1.31;2.36)	1.04 (0.68;1.58)	0.97 (0.63;1.48)
Use of MHT^c						
Never (reference)	603	386	217 (36.0)	1	1	–
Ever	311	164	147 (47.3)	1.54 (1.15;2.07)	1.47 (1.09;2.00)	–
Total number of years of MHT use^{b,c}						
>0 to <5 years	188	98	90 (47.9)	1.59 (1.12;2.25)	1.52 (1.07; 2.18)	–
≥5 years	119	65	54 (45.4)	1.42 (0.93;2.16)	1.34 (0.86;2.07)	–
Ever use of OC/MHT						
No OC/no MHT (reference)	467	302	165 (25.1)	1	1	1
No OC/MHT	142	745	67 (10.2)	1.53 (1.02;2.29)	1.37 (0.91;2.07)	1.42 (0.93;2.16)
OC/no MHT	1,110	796	314 (47.8)	0.72 (0.57;0.92)	0.96 (0.69;1.34)	0.94 (0.67;1.32)

Table 1 continued

Total	<i>N</i>	t(14;18)-negative	t(14;18)-positive (%)	Crude OR (95 % CI)	Age-adjusted OR (95 % CI)	Multivariable ^a OR (95 % CI)
	1,968	1,311	657 (33.2)			
OC/MHT	249	138	111 (16.9)	1.46 (1.05;2.03)	1.30 (0.89;1.90)	1.26 (0.86;1.86)

^a Multivariable model including age, number of pregnancies, type of menopause, and exogenous hormone exposure use

^b Do not sum up to 100 % due to missing data

^c Restricted to menopausal women

OC, oral contraceptive; MHT, menopausal hormone therapy; OR, odds ratio (method: logistic regression); 95 % CI, 95 % confidence interval

the IRR was about 2.1-fold greater compared to never pregnant women that means t(14;18) frequency of women ≥ 4 pregnancies is over twice as high compared to never pregnant women. Ever use (IRR 3.18) as well as current (IRR 3.86) and past use (IRR 3.14) of OC showed a positive association with t(14;18) frequency as well as OC use ≥ 10 years in the bivariate age-adjusted models (Table 2). Median t(14;18) frequency did not depend on age at menopause [<48 years: 3.9 (IQR: 1.8–10.0); 48 to <52 years: 4.8 (IQR: 2.9–12.2); ≥ 52 years: 3.9 (IQR: 1.9–8.8), $p = 0.06$]. The age-adjusted IRR for women with medical/surgical menopause was increased [IRR 3.52 (1.25;9.89)]. In the models restricted to postmenopausal woman, a higher frequency of t(14;18) was observed among ever users of MHT [IRR 2.63 (1.01;6.85)] and among short-term users (>0 to <5 years) of MHT [IRR 4.56 (1.01;20.58)], but not among long-term users [≥ 5 years, IRR 1.08 (0.50;2.33)] (Table 2).

We did not observe a linear trend in the association between age and reproductive history and t(14;18) frequency in the multivariable model (Table 2). No statistically significant association was observed for number of pregnancies (IRR between 0.74 and 0.99). Natural menopause showed no association with t(14;18) frequency. The IRR for medical/surgical menopause, however, was significantly increased [IRR 2.46 (1.11;5.44)]. The multivariable model revealed no statistically significant IRR for the subgroup of women who had used only OC or MHT. For the subgroup of women who had used both IRR were increased 2.41 (1.09;5.33) (Table 2). In a sensitivity analysis, separate risk estimates for OC use and MHT were calculated. The IRR for OC use was statistically significant 2.29 (1.31;4.00), but not for MHT [IRR 1.02 (0.65;1.61)].

Discussion

The biologic mechanisms for developing NHL are currently unclear. The t(14;18) translocation is the genetic hallmark for FL and DLBCL, two of the most common subtypes of NHL. The translocation can be found in 70–90 % of FL cases and in 30–50 % of DLBCL cases [15–17]. In Western countries, this mutation is detectable in about 30–60 % of

healthy individuals [26–28]. Prevalence and frequency of t(14;18)-positive cells in healthy individuals are associated with known FL risk factors like increasing age and male sex [27, 28, 32, 41]. Roulland et al. [38] published very recently that the presence of t(14;18)-positive cells in healthy individuals is associated with an increased risk for FL and that these cells represent true lymphoma precursors which are clonally related to the clinically overt lymphoma that manifests at a later time point.

Epidemiologic observations link reproductive factors and gender-specific hormone use with risk of NHL [1, 9, 33]. Estrogen seems to be a protective factor for FL and DLBCL.

To the best of our knowledge, this is the first study investigating a possible association between circulating t(14;18)-positive cells and reproductive factors and exogenous hormone use in healthy females. In bivariate analyses, we found some positive associations between the t(14;18) prevalence and MHT use (ever vs. never, years of use). In the multivariable model, only age remains a statistically significant predictor showing a positive association with the t(14;18) prevalence. In a sensitivity analysis including OC use and MHT as separate variables in the model, an increased OR for MHT was observed. Restricting the multivariable model to postmenopausal women did not change the risk estimates significantly (data not shown).

Analyzing t(14;18) frequency in the multivariable model, the parameter estimates for age are less consistent and only age group 60–69 was associated with a significantly increased frequency (IRR 3.67). A positive association of medical/surgical menopause was observed (IRR 2.46). For ever use of both OC and MHT, the IRR of 2.41 was statistically significant. Restricting the multivariable model to postmenopausal women yielded comparable risk estimates (data not shown). A sensitivity analysis of OC use and MHT as separate variables in the model including all women yielded a statistically significant IRR for history of OC use. The separate parameter estimate for MHT was not statistically significant. Approximately three times as many women have ever taken OC compared to MHT (Table 1). Compared to MHT, OCs were taken on average at considerably younger ages. Based on these

Table 2 Association of t(14;18) frequency with reproductive history and exogenous hormone use

	Number (<i>N</i> = 657)	Median (first; third quartile) of t(14;18) frequency among positives per 10 ⁶ NC	Crude IRR (95 % CI)	Age-adjusted IRR (95 % CI)	Multivariable ^a IRR (95 % CI)
Age group					
20–29 years	50	3.15 (1.77;5.03)	1	–	1
30–39 years	110	3.72 (1.99;5.16)	0.94 (0.34;2.41)	–	1.08 (0.43;2.72)
40–49 years	113	3.13 (1.93;6.25)	1.23 (0.47;3.22)	–	1.43 (0.55;3.70)
50–59 years	161	3.97 (1.99;8.58)	0.97 (0.40;2.32)	–	1.15 (0.44;3.03)
60–69 years	136	4.75 (2.27;10.12)	6.35 (1.06;37.96)	–	3.67 (1.10;12.27)
≥70 years	87	4.18 (1.90;10.01)	1.15 (0.39;3.37)	–	2.19 (0.65;7.34)
Number of pregnancies					
Never pregnant (reference)	73	3.14 (1.79;5.63)	1	1	1
≥1	584	3.94 (1.99;8.38)	2.13 (0.66;6.91)	0.98 (0.51;1.90)	–
1	111	3.46 (1.83;6.80)	1.03 (0.47;2.26)	0.95 (0.44;2.05)	0.91 (0.43;1.94)
2	209	4.20 (2.11;9.08)	1.10 (0.54;2.24)	0.86 (0.44;1.68)	0.85 (0.44;1.64)
3	131	3.98 (2.43;7.99)	1.05 (0.48;2.28)	0.87 (0.40;1.93)	0.74 (0.35;1.55)
≥4	133	3.86 (1.92;9.11)	5.74 (1.00;33.11)	2.13 (0.74;6.14)	0.99 (0.48;2.08)
Number of births					
None (reference)	83	3.14 (1.76;5.63)	1	1	–
≥1	574	3.95 (1.99;8.41)	1.84 (0.55;6.14)	0.82 (0.41;1.65)	–
1	138	3.63 (1.93;8.16)	0.87 (0.42;1.82)	0.81 (0.38;1.73)	–
2	250	4.04 (2.03;9.01)	0.91 (0.45;1.84)	0.71 (0.35;1.45)	–
3	107	3.97 (2.44;7.37)	6.03 (1.03;35.26)	2.26 (0.68;7.53)	–
≥4	79	3.86 (1.76;9.13)	0.68 (0.32;1.45)	0.38 (0.18;0.80)	–
Use of OC					
Never (reference)	232	4.24 (2.12;9.19)	1	1	–
Ever	425	3.65 (1.92;6.91)	2.54 (0.74;8.68)	3.18 (1.54;6.54)	–
Past	197	2.96 (1.81;5.61)	3.01 (0.75;12.11)	3.14 (1.50;6.59)	–
Current	103	3.86 (2.22;6.25)	1.29 (0.67;2.48)	3.86 (1.56;9.54)	–
Past/current unknown	125	4.18 (1.83;9.13)	0.68 (0.32;1.45)	1.70 (0.74;3.90)	–
Total number of years of OC use^b					
>0 to <5 years	105	4.05 (1.92;8.29)	1.00 (0.53;1.88)	2.05 (0.96;4.38)	–
5 to <10 years	98	2.79 (1.80;5.75)	0.93 (0.49;1.74)	2.05 (1.01;4.18)	–
≥10 years	220	3.82 (2.00;7.10)	3.99 (0.92;17.38)	3.93 (1.67;9.23)	–
Menopausal status					
Premenopausal (reference)	293	3.39 (1.91;5.33)	1	1	1
Postmenopausal	364	4.29 (2.05;9.49)	2.84 (0.80;10.18)	1.16 (0.71;1.90)	–
Type of menopause					
Natural	257	4.17 (2.03;8.99)	0.89 (0.61;1.29)	0.68 (0.38;1.24)	0.68 (0.38;1.23)
Medical/surgical	107	4.77 (2.10;11.27)	7.37 (1.48;36.58)	3.52 (1.25;9.89)	2.46 (1.11;5.44)
Use of MHT^c					
Never (reference)	217	4.18 (2.05;8.46)	1	1	–
Ever	147	4.73 (2.09;12.05)	4.76 (0.89;25.49)	2.63 (1.01;6.85)	–
Total number of years of MHT use^{b,c}					
>0 to <5 years	90	4.44 (2.17;12.23)	7.25 (1.20;43.77)	4.56 (1.01;20.58)	–
≥5 years	54	5.73 (1.99;11.93)	0.90 (0.45;1.80)	1.08 (0.50;2.33)	–
Ever use of OC/MHT					
No OC/no MHT (reference)	165	4.09 (2.00;8.34)	1	1	1
No OC/MHT	67	5.49 (2.60;12.23)	0.63 (0.35;1.12)	0.79 (0.44;1.43)	0.68 (0.40;1.16)
OC/no MHT	314	3.48 (1.92;6.04)	0.97 (0.54;1.73)	1.93 (0.95;3.93)	1.77 (0.94;3.33)

Table 2 continued

	Number (<i>N</i> = 657)	Median (first; third quartile) of t(14;18) frequency among positives per 10 ⁶ NC	Crude IRR (95 % CI)	Age-adjusted IRR (95 % CI)	Multivariable ^a IRR (95 % CI)
OC/MHT	111	3.91 (1.83;9.11)	5.96 (1.03;34.42)	4.55 (1.33;15.53)	2.41 (1.09;5.33)

Example of interpreting IRR. (1) age-adjusted IRR of postmenopausal women is 1.16; t(14;18) frequency is 16 % higher compared to premenopausal women, (2) age-adjusted IRR of women with 1 pregnancy is 0.95; t(14;18) frequency is 5 % less high compared to never pregnant women

^a Multivariable model including age, number of pregnancies, type of menopause, and exogenous hormone exposure use

^b Do not sum up to 100 % due to missing data

^c Restricted to menopausal women

OC, oral contraceptive; MHT, menopausal hormone therapy; IRR, incidence rate ratio (method: negative binomial regression); 95 % CI, 95 % confidence interval; NC, nucleated cells

results, it could be speculated that exposure at younger ages may have a positive impact on t(14;18), while it does not affect prevalence.

Our multivariable analyses revealed no statistically significant parameter estimates for number of pregnancies, neither on prevalence nor on frequency. However, we observed decreased risks on t(14;18) frequency for women with at least one pregnancy. Several studies reported also a negative association between number of pregnancies and risk of DLBCL or FL [33–35, 42]. In line with this, two other studies showed an enhanced risk of NHL for null and low parity [43, 44].

Our results of the positive association between ever use of OC and t(14;18) frequency are consistent with Costas et al. [45] who reported slightly increased risks of FL (OR 1.49) and DLBCL (OR 1.28) with ever use of OC. Other studies reported inconsistent risks of NHL or its subtypes FL and DLBCL with use of OC [34, 46, 47]. This variation, however, might at least partly be attributable to low sample sizes.

Type of menopause was investigated by Morton et al. [9] in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. The authors observed increased risks of women with surgical menopause versus women being natural menopausal (aged 50–54 years) for FL and DLBCL which is in line with our t(14;18) frequency results.

Inconclusive findings were published for MHT use. Among postmenopausal women, Mildon et al. [36] reported a decreased but statistically not significant risk of MHT users compared to non-users for FL (OR 0.6) and DLBCL (OR 0.7). Similar results were presented in a pooled analysis of the InterLymph case-control study for ever versus never MHT users with an OR of 0.82 for FL and an OR of 0.66 for DCBCL [37]. However, data from the California Teachers Study show elevated but not significant risks for ever versus never MHT use (FL: RR = 1.57; DLBCL: RR = 1.15) [47]. These results are in line with our

bivariate age-adjusted findings restricted to postmenopausal women. Ever use of MHT compared to never use yielded a statistically significant OR of 1.47 in a prevalence analysis and a statistically significant IRR of 2.63 in a frequency analysis.

Cerhan et al. [48] compared current and former users with never users of MHT analyzing data from the Iowa Women's Health Study cohort and found significantly increased risk estimates for FL (RR current: 3.3; RR former: 2.6), but no association for diffuse NHL. The SHIP interview did not differentiate between current use and former use of MHT. Based on the 7-day medication, we identified 13.7 % current MHT users among the 914 postmenopausal women with GE03 medication based on ATC classification. 44.8 % of these current users are carrying the t(14;18) translocation. The prevalence among women currently not taking any menopausal therapy is slightly lower (39.0 %) ($p = 0.24$). t(14;18) frequency of women currently applying MHT is not different compared to women who are not current users [4.47 (1.83;8.52) vs. 4.24 (2.10;10.11) per 10⁶ NC, $p = 0.75$].

Analyzing only the subgroup of current MHT users, we were able to differentiate estrogen, estrogen + progestin, and progestin users. We did not observe a difference of t(14;18) prevalence and frequency of women with current use of only estrogen versus estrogen + progestin as MHT [41 % vs. 46 %, $p = 0.63$; 3.58 (1.58;7.83) vs. 5.22 (2.31;8.61) per 10⁶ NC; $p = 0.20$]. The t(14;18) prevalence of MHT containing progestin only was 60 %, but this finding is limited to a small sample size ($N = 5$). Morton et al. reported similar risks for different types of MHT in FL and DLBCL patients [9]. Data from the California Teachers Study and the Iowa Women's Health Study showed also increased risk estimates with duration of MHT use compared to never users, although sample sizes are often small [47, 48]. In bivariate age-adjusted analyses, we observed a statistically significantly increased risk for MHT use >0 to <5 years for prevalence (OR 1.52) as well

as for frequency (IRR 4.56) but not for MHT use ≥ 5 years. We cannot completely exclude a possible bias due to a changing pattern of MHT use over time (e.g., dose and/or application pattern) or with respect to the application of different formulation/types of MHT.

Heterogeneous results in published risk estimates concerning NHL and hormone-associated factors in women might be attributable to a lack of differentiation of the NHL subtypes in many analyses. Only very few studies assessed possible risk factors separately for specific NHL subtypes. Other influencing factors include study setting, selection of confounding factors, small sample sizes, limited age range of participants, formulation of exogenous hormones, and duration of the application.

We observed a curvilinear association of age with both translocation prevalence and frequency. This observation is consistent with the age-specific incidence of FL. The median age at diagnosis for FL is about 65 years [49], which is comparable to the age with the highest t(14;18) prevalence and frequency in our study group. It is, however, unclear, why in older ages t(14;18) prevalence and frequency decline, while lymphoma incidence continues to increase.

Our analysis is based on the baseline examination of a population-based cohort, which is characterized by a high life-time prevalence of OC and MHT use [50]. The population-based sampling together with a high response proportion compared to other German cohorts [51] limit major selection bias and increases the external validity of these results. The study size of well-characterized women reduces statistical uncertainty. Information on reproductive history (number of pregnancies, parity) and hormone use (OC, MHT) was collected based on a standardized personal face-to-face interview (CAPI) conducted in designated study centers with each study participant. Reliability of self-reporting of reproductive factors and women health has been shown [52].

We were not able to evaluate the number of years after last birth, the age at menarche, the number of years of ovulation, and sex of the children born because the respective data were not collected. Furthermore, we did not consider hormonal influences of non-oral contraceptives like hormone injection or patches. In Germany, however, these methods play a minor role in contraception [53, 54], so we do not assume a considerable bias. Prescribed medication was solicited over the seven days preceding the interview. In the invitation letters, participants were asked to bring their medication packages along, and most did so. Data about calendar year or age of first/last OC medication, duration or pattern of application were not collected. Therefore, we were neither able to consider changes in OC formulation over the lifetime of women nor to perform a dose–response analysis.

In epidemiologic studies, no standardized definition for menopausal status exists [55, 56]. Due to (1) a variety of

different definitions, (2) the complex processes of the transition from pre- to postmenopausal status, which can occur over several years or (3) a changing symptomology because of the use of MHT or hysterectomy, it is not trivial to characterize the menopausal status of women in population-based studies. We cannot exclude a potential misclassification of some of the women regarding their menopausal status. We used information on menstrual bleeding, which is difficult to evaluate in women who are taking MHT or had a hysterectomy or are in the perimenopausal status. Nevertheless, we only had 1.9 % of women aged ≥ 40 years with an uncertain menopausal status. Because of this small percentage, we assume no major bias, if any.

The t(14;18) translocation is the genetic hallmark for FL and DLBCL. The complex relationship by which exogenous hormone use like OC or MHT may lead to both NHL subtypes is not fully understood. It is known that sex hormones influence the B cell development [57]. Kane et al. indicate that estrogen at physiological levels suppresses the humoral response, whereas the exogenous estrogen from OC increases the humoral response. This leads to a reduction of IFN- γ and the enhancement of IL-6 and IL-10, which together may induce an increase of the number of B lymphocyte subpopulations and estrogen-induced expression of the BCL-2 gene which reduces apoptosis of B cells [42]. Both mechanisms could support the persistence of cells carrying the t(14;18) translocation over longer periods of time, which would explain the positive associations between t(14;18) frequency and use of OC and MHT observed in this study.

Conclusion

To our knowledge, this is the first study analyzing t(14;18) prevalence and frequency data with regard to female reproductive history and exogenous hormone use in a population-based sample of healthy women.

In summary, we found a strong curvilinear trend of age on the prevalence of the t(14;18) translocation with a maximum among the 50–59 old and lower prevalence for the younger and older women, respectively. Our results suggest no relevant influence of number of pregnancies or type of menopause on the prevalence of the t(14;18) translocation.

For t(14;18) frequency, significant associations were observed with age-adjusted ever use of OC, and especially among current and long-term users. In the multivariable model, medical/surgical menopause and the category ever use of both OC and MHT showed significantly increased risk estimates.

Our results suggest that exogenous hormone use is a risk factor for t(14;18) frequency rather than for t(14;18)

prevalence. In our study, some 80 % of all women prevalent for t(14;18) had only one clone. Only one woman had four different clones, which was the highest number of different clones observed. Hence exogenous hormone use might rather act on the expansion of existing clones than causing de novo mutations. Since it has been shown that the detection of t(14;18)-positive cells in healthy individuals represents a biomarker of increased FL risk [38], future research should aim at defining which individuals are at highest risk and which additional molecular or immunological events ultimately lead to the transformation of a t(14;18)-positive cell into a fully malignant lymphoma clone. A promising starting point might be a systematic prospective follow-up of healthy individuals carrying a t(14;18) translocation as a possible FL precursor in the SHIP-cohort. In a prospective approach, a variety of NHL risk factors can be monitored and their respective contribution toward developing clinical FL or DLBCL can be quantified.

Acknowledgments The authors greatly acknowledge the excellent technical assistance of Ute Pett, who prepared the biosamples. SHIP is part of the Community Medicine Research net of the University Medicine Greifswald, Germany, which is funded by the Federal Ministry of Education and Research (Grants Nos. 01ZZ9603, 01ZZ0103, 01ZZ0403), the Ministry of Cultural Affairs as well as the Social Ministry of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Nelson RA, Levine AM, Bernstein L (2001) Reproductive factors and risk of intermediate- or high-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma in women. *J Clin Oncol* 19:1381–1387
- Alexander DD, Mink PJ, Adami HO et al (2007) The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120(Suppl 12):1–39
- Hoover RN (1992) Lymphoma risks in populations with altered immunity—a search for mechanism. *Cancer Res* 52:5477s–5478s
- Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R (1997) Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. *Ann Intern Med* 127:186–194
- Straub RH (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28:521–574
- Xiong YH, Yuan Z, He L (2013) Effects of estrogen on CD4(+) CD25(+) regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac J Trop Med* 6:748–752
- Moor RM (1968) Foetal homeostasis: conceptus-ovary endocrine balance. *Proc R Soc Med* 61:1217–1226
- Olsen NJ, Kovacs WJ (1996) Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17:369–384
- Morton LM, Wang SS, Richesson DA, Schatzkin A, Hollenbeck AR, Lacey JV Jr (2009) Reproductive factors, exogenous hormone use and risk of lymphoid neoplasms among women in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *Int J Cancer* 124:2737–2743
- Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES et al (2008) Follicular lymphoma. In: WHO (ed) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: WHO, pp 220–226
- Stein H, Warnke RA, Chan WC et al. (2008) Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: WHO (ed.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: WHO, pp 233–237
- Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD (1998) Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's lymphoma classification project. *Ann Oncol* 9:717–720
- Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood* 107:265–276
- Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E (2011) Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 105:1684–1692
- Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ (2007) Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21:18–29
- Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA (1995) Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol* 103:472–478
- Chang CM, Wang SS, Dave BJ et al (2011) Risk factors for non-Hodgkin lymphoma subtypes defined by histology and t(14;18) in a population-based case-control study. *Int J Cancer* 129:938–947
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097–1099
- Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B (2002) V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med* 195:85–98
- Heckman CA, Cao T, Somsouk L et al (2003) Critical elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancers for deregulated expression of bcl-2. *Cancer Res* 63:6666–6673
- Korsmeyer SJ (1992) Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 13:285–288
- Galteland E, Sivertsen EA, Svendsrud DH et al (2005) Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 19:2313–2323
- Biagi JJ, Seymour JF (2002) Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood* 99:4265–4275
- Medina KL, Strasser A, Kincaid PW (2000) Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood* 95:2059–2067
- Limpens J, Stad R, Vos C et al (1995) Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85:2528–2536
- Nambiar M, Raghavan SC (2009) Prevalence and analysis of t(14;18) and t(11;14) chromosomal translocations in healthy Indian population. *Ann Hematol* 89:35–43
- Dölken G, Dölken L, Hirt C, Fusch C, Rabkin CS, Schüler F (2008) Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. *J Natl Cancer Inst Monogr* 39:44–47
- Janz S, Potter M, Rabkin CS (2003) Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 36:211–223

29. Yasukawa M, Bando S, Dölken G et al (2001) Low frequency of BCL-2/J(H) translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals. *Blood* 98:486–488
30. Ji W, Qu GZ, Ye P, Zhang XY, Halabi S, Ehrlich M (1995) Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res* 55:2876–2882
31. Schmitt C, Balogh B, Grundt A et al (2006) The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. *Leuk Res* 30:745–750
32. Hirt C, Weitmann K, Schüller F et al (2013) Circulating t(14;18)-positive cells in healthy individuals: association with age and sex but not with smoking. *Leuk Lymphoma* 54:2678–2684
33. Zhang Y, Holford TR, Leaderer B et al (2004) Menstrual and reproductive factors and risk of non-Hodgkin's lymphoma among Connecticut women. *Am J Epidemiol* 160:766–773
34. Lee JS, Bracci PM, Holly EA (2008) Non-Hodgkin lymphoma in women: reproductive factors and exogenous hormone use. *Am J Epidemiol* 168:278–288
35. Prescott J, Lu Y, Chang ET et al (2009) Reproductive factors and non-Hodgkin lymphoma risk in the California Teachers Study. *PLoS One* 4:e8135
36. Mildon KH, Ansell P, Roman E, Kane EV (2010) Reproductive factors, menopausal hormone therapy, and risk of non-Hodgkin, diffuse large B-cell and follicular lymphomas: a UK case-control study. *Cancer Causes Control* 21:2079–2083
37. Kane EV, Bernstein L, Bracci PM et al (2013) Postmenopausal hormone therapy and non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol* 24:433–441
38. Roulland S, Kelly RS, Morgado E et al (2014) t(14;18) Translocation: a predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 32:1347–1355
39. John U, Greiner B, Hensel E et al (2001) Study of Health in Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz - Präventivmed* 46:186–194
40. Dölken L, Schüller F, Dölken G (1998) Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *Biotechniques* 25:1058–1064
41. Schüller F, Dölken L, Hirt C et al (2009) Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer* 124:958–963
42. Kane EV, Roman E, Becker N et al (2012) Menstrual and reproductive factors, and hormonal contraception use: associations with non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol* 23:2362–2374
43. Cerhan JR, Habermann TM, Vachon CM et al (2002) Menstrual and reproductive factors and risk of non-Hodgkin lymphoma: the Iowa women's health study (United States). *Cancer Causes Control* 13:131–136
44. Olsson H, Olsson ML, Ranstam J (1990) Late age at first full-term pregnancy as a risk factor for women with malignant lymphoma. *Neoplasma* 37:185–190
45. Costas L, Casabonne D, Benavente Y et al (2012) Reproductive factors and lymphoid neoplasms in Europe: findings from the EpiLymph case-control study. *Cancer Causes Control* 23:195–206
46. Bernstein L, Ross RK (1992) Prior medication use and health history as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma: preliminary results from a case-control study in Los Angeles County. *Cancer Res* 52:5510s–5515s
47. Lu Y, Wang SS, Sullivan-Halley J et al (2011) Oral contraceptives, menopausal hormone therapy use and risk of B-cell non-Hodgkin lymphoma in the California Teachers Study. *Int J Cancer* 129:974–982
48. Cerhan JR, Vachon CM, Habermann TM et al (2002) Hormone replacement therapy and risk of non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1466–1471
49. Roman E, Smith AG (2011) Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 58:4–14
50. Schwarz S, Völzke H, Alte D, Hoffmann W, John U, Dören M (2005) Gynaecological health care utilization and use of sex hormones—the study of Health in Pomerania. *Hum Reprod* 20:2916–2922
51. Stang A, Moebus S, Dragano N et al (2005) Baseline recruitment and analyses of nonresponse of the Heinz Nixdorf Recall Study: identifiability of phone numbers as the major determinant of response. *Eur J Epidemiol* 20:489–496
52. Bosetti C, Tavani A, Negri E, Trichopoulos D, La Vecchia C (2001) Reliability of data on medical conditions, menstrual and reproductive history provided by hospital controls. *J Clin Epidemiol* 54:902–906
53. Wiegratz I, Thaler C (2011) Hormonal contraception—What kind, when, and for whom? *Deutsches Ärzteblatt International* 108:495–505
54. Johnson S, Pion C, Jennings V (2013) Current methods and attitudes of women towards contraception in Europe and America. *Reprod Health* 10:7
55. Phipps AI, Ichikawa L, Bowles EJ et al (2010) Defining menopausal status in epidemiologic studies: a comparison of multiple approaches and their effects on breast cancer rates. *Maturitas* 67:60–66
56. Utian WH (2004) Menopause-related definitions, vol 1266. Elsevier, New York, pp 133–138
57. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 11:411–423

Supplementary material: Weitmann K*, Hirt C, Schwarz S, Rabkin CS, Dölken G, Hoffmann W. Influence of reproductive history and exogenous hormone use on prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in a population-based cross sectional study. *CANCER, CAUSES & CONTROL*. 2015 Mar;26(3):455-65

Table S1 Descriptive statistic of reproductive history, exogenous hormone use and age (N=1968)

	20-29 years	30-39 years	40-49 years	50-59 years	60-69 years	≥70 years
Total N	270	381	370	368	334	245
Number of pregnancies						
never pregnant	58.5%	9.2%	4.9%	7.3%	6.9%	11.4%
≥1	41.5%	90.8%	95.1%	92.7%	93.1%	88.6%
1	26.7%	23.6%	16.5%	16.3%	14.4%	19.6%
2	9.3%	42.3%	34.9%	36.7%	26.7%	27.8%
3	4.1%	13.9%	24.9%	17.4%	23.7%	20.0%
≥4	1.5%	11.0%	18.9%	22.3%	28.4%	21.2%
Number of births						
none	64.4%	11.3%	5.4%	7.9%	6.9%	11.8%
≥1	35.6%	88.7%	94.6%	92.1%	93.1%	88.2%
1	24.8%	31.0%	24.9%	22.3%	18.0%	22.5%
2	10.0%	47.0%	49.7%	44.6%	28.4%	28.2%
3	0.0%	8.9%	14.1%	14.7%	26.1%	19.2%
≥4	0.7%	1.8%	6.0%	10.6%	20.7%	18.4%
Use of OC						
never	4.8%	7.9%	8.7%	29.4%	56.0%	97.6%
ever	95.2%	92.1%	91.4%	70.7%	44.0%	2.5%
past	39.6%	52.2%	66.0%	34.2%	-	-
current	55.6%	39.9%	25.1%	2.2%	-	-
past/current unknown	-	-	0.3%	34.2%	44.0%	2.5%
Total number of years of OC use¹						
>0-<5 years	29.6%	20.5%	21.3%	26.2%	41.5%	50.0%
5-<10 years	56.0%	21.9%	16.6%	14.2%	13.6%	16.7%
≥10 years	14.0%	57.5%	61.5%	58.8%	42.2%	16.7%
Menopausal Status						
premenopausal	100%	98.7%	84.9%	25.3%	0.3%	-
postmenopausal	-	1.3%	15.1%	74.7%	99.7%	100%
Type of menopause²						
natural	-	-	28.6%	65.1%	78.1%	78.4%
surgical	-	100%	71.4%	34.9%	21.9%	21.6%
Use of MHT²						
never	-	100%	69.6%	50.2%	63.1%	86.1%
ever	-	-	30.4%	49.8%	36.9%	13.9%
Total number of years of MHT use^{1,2}						
>0-<5 years	-	-	88.2%	58.4%	58.5%	61.8%
≥5 years	-	-	11.8%	40.9%	40.7%	32.4%

¹do not always sum up to 100% due to missing values; ²restricted to menopausal women; OC: oral contraceptive; MHT: menopausal hormone therapy

Table S2: Median (1st quartile;3rd quartile) of t(14;18) frequency per 10⁶ NC by age for categories of reproductive history and exogenous hormone use restricted to t(14;18) positive women (N=657)

	20-29 years		30-39 years		40-49 years		50-59 years		60-69 years		≥70 years	
	N	median (1 st q.;3 rd q.)	N	median (1 st q.;3 rd q.)	N	median (1 st q.;3 rd q.)	N	median (1 st q.;3 rd q.)	N	median (1 st q.;3 rd q.)	N	median (1 st q.;3 rd q.)
Number of pregnancies												
never pregnant	32	2.6 (1.7;4.8)	7	2.5 (1.9;4.3)	4	1.9 (1.4;3.3)	11	6.5 (4.9;8.7)	7	2.4 (1.9;4.7)	12	3.5 (1.5;14.3)
≥1	18	3.7 (1.9;5.1)	103	3.7 (2.0;5.2)	109	3.3 (2.0;6.3)	150	3.7 (1.9;8.4)	129	5.0 (2.5;10.2)	75	4.4 (1.9;10.0)
	1	3.9 (1.9;4.4)	27	4.5 (2.0;5.4)	19	3.3 (1.7;12.7)	23	2.7 (1.6;6.8)	19	3.5 (1.8;7.2)	13	3.7 (2.5;5.8)
	2	5.1 (2.2;11.3)	46	2.9 (1.9;5.0)	38	3.9 (2.2;9.8)	61	4.1 (2.0;8.6)	35	7.3 (3.3;18.2)	26	4.5 (2.2;11.2)
	3	2.6 (1.7;3.5)	22	4.0 (2.7;6.0)	26	3.7 (2.4;6.2)	33	3.8 (1.5;6.9)	32	4.7 (3.1;9.5)	14	5.5 (1.9;17.2)
≥4	1	13.1 (-)	8	3.5 (1.6;6.0)	26	2.3 (1.5;3.7)	33	4.1 (2.2;9.1)	43	5.3 (1.9;12.4)	22	4.3 (1.8;7.6)
Number of births												
none	35	2.5 (1.6;4.5)	10	2.5 (1.9;4.3)	5	2.4 (1.5;4.1)	13	6.1 (4.5;8.6)	7	2.4 (1.9;4.7)	13	3.7 (1.7;7.7)
≥1	15	4.1 (2.2;9.7)	100	3.7 (2.0;5.3)	108	3.2 (2.0;6.3)	148	3.7 (1.9;8.5)	130	5.0 (2.5;10.2)	74	4.3 (1.9;10.0)
	1	4.2 (2.8;7.0)	33	4.6 (2.7;6.8)	29	3.3 (1.7;6.2)	31	2.7 (1.6;9.9)	23	3.5 (1.8;8.3)	14	3.4 (1.9;8.8)
	2	3.5 (2.2;5.1)	52	2.9 (1.7;5.2)	54	3.5 (2.1;8.4)	77	4.0 (2.0;8.6)	35	7.3 (3.8;18.2)	26	4.8 (2.3;12.7)
	3	-	14	3.6 (2.7;4.0)	15	3.0 (1.8;6.5)	25	4.0 (2.3;6.6)	39	4.8 (3.1;10.2)	14	3.7 (1.9;10.0)
≥4	1	13.1 (-)	1	1.6 (-)	10	2.7 (1.5;3.7)	15	3.4 (1.7;9.1)	32	4.9 (1.8;11.8)	20	4.5 (1.8;9.0)
Use of OC												
never	3	5.3 (1.8;13.1)	10	3.7 (2.3;4.9)	10	2.4 (1.5;3.9)	48	3.5 (2.1;7.8)	76	6.3 (2.8;12.3)	85	4.2 (1.9;9.3)
ever	47	3.1 (1.8;4.5)	100	3.7 (2.0;5.2)	103	3.3 (2.0;6.3)	113	4.1 (1.9;10.0)	60	4.0 (1.9;8.5)	2	24.4 (3.9;44.8)
	past	2.8 (1.6;4.5)	55	2.7 (1.8;4.5)	68	2.8 (1.8;5.3)	48	3.9 (2.0;8.2)	-	-	-	-
	current	3.1 (1.9;4.2)	45	4.4 (2.5;6.8)	34	3.9 (2.4;8.4)	3	3.4 (1.8;34.3)	-	-	-	-
	past/current unknown	-	-	-	1	12.7 (-)	62	4.3 (1.8;14.7)	60	4.0 (1.9;8.5)	2	24.4 (3.9;44.8)

A.2 Publikationsliste

Artikel

Herzog S*, Fink M, **Weitmann K**, Friedel C, Hadlich S, Langner S, Kindermann K, Holm T, Böhm A, Eskilsson E, Miletic H, Hildner M, Fritsch M, Vogelgesang S, Havemann C, Ritter C, Meyer zu Schwabedissen H, Rauch B, Hoffmann W, Kroemer H, Schroeder H, Bien-Möller S. Pim1 kinase is upregulated in glioblastoma multiforme and mediates tumor cell survival. (Originalartikel)
NEURO-ONCOLOGY. 2015; 17(2):223-242.

Kuon E*, **Weitmann K**, Hoffmann W, Dörr M, Hummel A, Riad A, Busch M, Felix S, Empen K. Multicenter Long-Term Validation of a Minicourse in Radiation-Reducing Techniques in the Catheterization Laboratory. (Originalartikel)
AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY. 2015; 115(3):367-373.

Weitmann K*, Hirt C, Schwarz S, Rabkin C, Dölken G, Hoffmann W. Influence of reproductive history and exogenous hormone use on prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in a population-based cross sectional study. (Originalartikel)
CANCER CAUSES & CONTROL. 2015; 26(3):455-65.

Glaubitz M*, Block S, Witte J, Empen K, Groß S, Schlicht R, **Weitmann K**, Klingel K, Kandolf R, Hoffmann W, Gottschalk K, Busch M, Dörr M, Helm C, Felix S, Riad A. Stiffness of left ventricular cardiac fibroblasts contributes to ventricular dilation in patients with recent-onset cardiomyopathy. (Originalartikel)
CIRCULATION JOURNAL. 2014; 78(7):1696-700.

Kuon E*, **Weitmann K**, Hoffmann W, Dörr M, Reffelmann T, Hummel A, Riad A, Busch M, Empen K, Felix S. Efficacy of a Minicourse in Radiation-Reducing Techniques in Invasive Cardiology: A Multicenter Field Study. (Originalartikel)
JACC-CARDIOVASCULAR INTERVENTIONS. 2014; 7(4):382-390.

Kuon E*, Felix S, **Weitmann K**, Büchner I, Hummel A, Dörr M, Reffelmann T, Riad A, Busch M, Empen K. ECG-gated coronary angiography enables submillisievert imaging in invasive cardiology. (Originalartikel)
HERZ. 2014.

Weigel M*, **Weitmann K**, Rautmann C, Schmidt J, Bruns R, Hoffmann W. Impact of physicians' attitude to vaccination on local vaccination coverage for pertussis and measles in Germany. (Originalartikel)
EUROPEAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH. 2014; 24(6):1008-1015.

Weigel M*, Bruns R, **Weitmann K**, Hoffmann W. Durchimpfungsraten bei der Schuleingangsuntersuchung 2012 - Deutschlandweite Erhebung auf Ebene der Landkreise und kreisfreien Städte. (Originalartikel)
DEUTSCHES ARZTEBLATT INTERNATIONAL. 2014; 111(46):788-94.

Escher F*, Lassner D, Kühl U, Gross U, Westermann D, Poller W, Skurk C, **Weitmann K**, Hoffmann W, Tschöpe C, Schultheiss H. Analysis of endomyocardial biopsies in suspected myocarditis-Diagnostic value of left versus right ventricular biopsy. (Letter)
INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY. 2014; 177(1):76-78.

Hirt C*, **Weitmann K***, Schüler F, Kiefer T, Rabkin C, Hoffmann W, Dölken G. Circulating t(14;18)-Positive Cells in Healthy Individuals - Association with Age and Sex but not with Smoking. (Originalartikel)
LEUKEMIA & LYMPHOMA. 2013; 54(12):2678-2684.

Hoffmann W*, Meiboom M*, **Weitmann K**, Terschüren C, von Boetticher H. Influence of age, sex and calendar year on lifetime accumulated red bone marrow dose from diagnostic radiation exposure. (Originalartikel)
PLOS ONE. 2013; 8(11):e78027.

Kuon E*, Empen K, **Weitmann K**, Staudt A, Hummel A, Dörr M, Reffelmann T, Hoffmann W, Felix S. Long-Term Efficacy of a Mini-Course in Radiation-Reducing Techniques in Invasive Cardiology. (Originalartikel)

ROFO-FORTSCHRITTE AUF DEM GEBIET DER RONTGENSTRAHLEN UND DER BILDGEBENDEN VERFAHREN. 2013; 185(8):720-725.

Kuon E*, **Weitmann K**, **Hummel A**, **Dörr M**, **Reffelmann T**, **Riad A**, **Busch M**, **Felix S**, **Hoffmann W**, **Empen K**. Latest-generation catheterization systems enable sub-millisievert invasive coronary angiography. (Originalartikel)
HERZ. 2013.

Oberstadt M*, **Bien-Möller S**, **Weitmann K**, **Herzog S**, **Hentschel K**, **Rimmbach C**, **Vogelsang S**, **Balz E**, **Fink M**, **Michael H**, **Zeden J**, **Bruckmüller H**, **Werk A**, **Cascorbi I**, **Hoffmann W**, **Roßkopf D**, **Schroeder H**, **Kroemer H**. Epigenetic modulation of the drug resistance genes MGMT, ABCB1 and ABCG2 in glioblastoma multiforme. (Originalartikel)
BMC CANCER. 2013; 13(1):617.

Riad A*, **Weitmann K**, **Herda L**, **Empen K**, **Groß S**, **Nauck M**, **Dörr M**, **Klingel K**, **Kandolf R**, **Hoffmann W**, **Felix S**. Initial white blood cell count is an independent risk factor for survival in patients with dilated cardiomyopathy. (Originalartikel)
INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY. 2013; 168(2):1207-1213.

Riad A*, **Meyer Zu Schwabedissen H**, **Weitmann K**, **Herda L**, **Dörr M**, **Empen K**, **Kieback A**, **Hummel A**, **Reinthal M**, **Grube M**, **Klingel K**, **Nauck M**, **Kandolf R**, **Hoffmann W**, **Kroemer H**, **Felix S**. Variants of Toll-like receptor 4 predict cardiac recovery in patients with dilated cardiomyopathy. (Originalartikel)
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2012; 287(32):27236-27243.

Rochow N*, **Jochum F**, **Redlich A**, **Korinekova Z**, **Linnemann K**, **Weitmann K**, **Boehm G**, **Müller H**, **Kalhoff H**, **Topp H**, **Hoffmann W**, **Fusch C**. Fortification of breast milk in VLBW infants: Metabolic acidosis is linked to the composition of fortifiers and alters weight gain and bone mineralization. (Originalartikel)
CLINICAL NUTRITION. 2011; 30(1):99-105.

Empen K*, **Kuon E**, **Hummel A**, **Gebauer C**, **Dörr M**, **Könemann R**, **Hoffmann W**, **Staudt A**, **Weitmann K**, **Reffelmann T**, **Felix S**. Comparison of rotational with conventional coronary angiography. (Originalartikel)
AMERICAN HEART JOURNAL. 2010; 160(3):552-563.

Staudt A*, **Herda L**, **Trimpert C**, **Lubenow L**, **Landsberger M**, **Dörr M**, **Hummel A**, **Eckerle L**, **Beug D**, **Müller C**, **Hoffmann W**, **Weitmann K**, **Klingel K**, **Kandolf R**, **Kroemer H**, **Greinacher A**, **Felix S**. Fcγ-receptor IIa polymorphism and the role of immunoadsorption in cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. (Originalartikel)
CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS. 2010; 87(4):452-458.

Felix S*, **Kroemer H**, **Kandolf R**, **Klingel K**, **Weitmann K**, **Mueller C**, **Beug D**, **Eckerle L**, **Hummel A**, **Dörr M**, **Landsberger M**, **Lubenow L**, **Trimpert C**, **Herda L**, **Staudt A**. Fc(γ)-Receptor IIa Polymorphism and the Role of Immunoadsorption in Cardiac Dysfunction in Patients With Dilated Cardiomyopathy. (Abstract)
CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS. 2010; 4(87):452.

Angelow A*, **Weitmann K**, **Schmidt M**, **Schwedler S**, **Vogt H**, **Havemann C**, **Staudt A**, **Felix S**, **Stangl K**, **Klingel K**, **Kandolf R**, **Kühl U**, **Lassner D**, **von Schlippenbach J**, **Schultheiss H**, **Hoffmann W**. The German Transregional Collaborative Research Centre 'Inflammatory Cardiomyopathy--Molecular Pathogenesis and Therapy'. Methods and baseline results from a 3-Centre Clinical Study. (Originalartikel)
CARDIOLOGY. 2009; 113:222-230.

Heymann R*, **Weitmann K**, **Weiß S**, **Thierfelder D**, **Fleßa S**, **Hoffmann W**. Bevölkerungsdichte, Altersverteilung und Urbanität als Einflussfaktoren der Hausbesuchshäufigkeit - eine Analyse für Mecklenburg-Vorpommern. (Originalartikel)
GESUNDHEITSWESEN. 2009; 71(7):423-428.

Pinkert S*, **Westermann D**, **Wang X**, **Klingel K**, **Dörner A**, **Savvatis K**, **Gröbl T**, **Krohn S**, **Tschöpe C**, **Zeichhardt H**, **Kotsch K**, **Weitmann K**, **Hoffmann W**, **Schultheiss H**, **Spiller O**, **Poller W**, **Fechner H**. Prevention of Cardiac

Dysfunction in Acute Coxsackievirus B3 Cardiomyopathy by Inducible Expression of a Soluble Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor. (Originalartikel)
CIRCULATION. 2009; 120(23):2358-2366.

Schüler F*, Dölken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, Weitmann K, Hoffmann W, Fusch C, Janz S, Rabkin C, Dölken G. Prevalence and frequency of circulating t(14,18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. (Originalartikel)
INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. 2009; 124(4):958-963.

Angelow A*, Schmidt M, Weitmann K, Schwedler S, Vogt H, Havemann C, Hoffmann W. Methods and implementation of a central biosample and data management in a three-centre clinical study. (Originalartikel)
COMPUTER METHODS AND PROGRAMS IN BIOMEDICINE. 2008; 91(1):82-90.

Westermann D*, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss H, Tschöpe C. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. (Originalartikel)
CIRCULATION. 2008; 117(16):2051-2060.

Kasner M*, Westermann D, Steendijk P, Gaub R, Wilkenshoff U, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Schultheiss H, Pauschinger M, Tschöpe C. Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study. (Originalartikel)
CIRCULATION. 2007; 116(6):637-647.

Buchbeiträge

Marschall P, Laslo T, Hoffmann W, Weitmann K, Fleßa S. Assessing Individualized Medicine — The example of immunoabsorption.
In: Fischer T (Hrsg.), Langanke M (Hrsg.), Marschall P (Hrsg.), Michl S (Hrsg.). Individualized medicine, ethical, economical and historical perspectives. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer-Verlag; 2015. p. 273-291.

Konferenzbeiträge

Weigel M, Weitmann K, Rautmann C, Schmidt J, Bruns R, Hoffmann W. Zusammenhang zwischen ärztlicher Impfeinstellung und regionaler Durchimpfungsrate für Pertussis und Masern in ganz Deutschland. (Poster)
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2014 Sep 18; Ulm. In: Abstractband 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi). 178-179.

Hoffmann W, van den Berg N, Weitmann K. The demographic change and other changes- challenges in medical care -. (eingeladener Vortrag)
47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI); 2014 Sep 12; Dresden.

Hoffmann W, Bahr J, Weitmann K, van den Berg N. Modelling risk factors-adjusted incidences of myocardial infarctions using multivariate regression. (Vortrag)
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2014 Sep 17; Ulm. In: Abstractband 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi). 36.

van den Berg N, Ulbricht S, Schwaneberg T, Weitmann K, Braatz J, Groß S, Dörr M, Hoffmann W. Erhebung von körperlicher Aktivität mit 3d-Aktimetern – Adhärenz zum Trageeregime. (Vortrag)
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2014 Sep 17; Ulm. In: Abstractband 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi). 49.

Fink M, Herzog S, Friedel C, Fritsch M, Weitmann K, Havemann C, Vogelgesang S, Meyer zu Schwabedissen H, Hoffmann W, Siegmund W, Kroemer H, Schroeder H, Bien-Möller S. Up-regulation of the carnitin transporter OCTN2 is associated with a poor survival of patients with Glioblastoma multiforme. (Poster)
Braintumor Berlin 2013; 2013 Mai 23; Berlin.

Herzog S, Fink M, Friedel C, Fritsch M, Weitmann K, Havemann C, Meyer zu Schwabedissen H, Vogelgesang S, Ritter C, Hoffmann W, Siegmund W, Kroemer H, Schroeder H, Bien-Möller S. Impact of Pim1 kinase as a novel therapeutic target in GBM. (Poster)
Braintumor Berlin 2013; 2013 Mai 23; Berlin.

Riad A, Weitmann K, Witte J, Dörr M, Empen K, Petersmann A, Nauck M, Hoffmann W, Felix S. The immune protein MD-2 is a novel independent predictor for long term mortality in dilated cardiomyopathy and non-inferior to nt-pro BNP. (Poster)
ESC Congress 2013; 2013 Aug 31; Amsterdam.

Hoffmann W, Meiboom M, Weitmann K, Terschüren C, von Boetticher H. Influence of age, sex and calendar year on lifetime accumulated red bone marrow dose from diagnostic radiation exposure. (Vortrag)
8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi) und 1. Internationales LIFE-Symposium; 2013 Sep 26; Leipzig. In: Abstractband 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi) und 1. Internationales LIFE-Symposium, Leipzig, 24.-27.09.2013. 260.

Neumann K, Hundt M, Witte J, Dörr M, Empen K, Weitmann K, Hoffmann W, Felix S, Riad A. The immune protein MD-2 is increased in serum of patients with dilated cardiomyopathy and stimulates cell specific directly the TLR4/NFkB pathway. (Vortrag)
79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK); 2013 Apr 05; Mannheim.

Riad A, Weitmann K, Herda L, Empen K, Groß S, Nauck M, Dörr M, Klingel K, Kandolf R, Hoffmann W, Felix S. Initial white blood cell count is an independent risk factor for survival in patients with dilated cardiomyopathy. (Vortrag)
79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK); 2013 Apr 03; Mannheim.

Weitmann K, Hirt C, Schüler F, Dölken G, Hoffmann W. Assoziation zwischen BMI, Alkohol und der t(14;18) Translokation in einer bevölkerungsbezogenen Querschnittstudie. (Vortrag)
8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi) und 1. Internationales LIFE-Symposium; 2013 Sep 27; Leipzig. In: Abstractband 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi) und 1. Internationales LIFE-Symposium, Leipzig, 24.-27.09.2013. 258.

Weitmann K, Dreier A. Wieviel Generation 60+ erwarten wir - und was erwartet sie von uns? Der demografische Wandel aus Sicht der Versorgungsepidemiologie. (eingeladener Vortrag)
4. Greifswalder Pflegesymposium; 2012 Nov 14; Greifswald.

Weitmann K, Hirt C, Schüler F, Dölken G, Hoffmann W. Einfluss der Zahl der Schwangerschaften auf die Prävalenz der t(14;18)-Translokation. (Vortrag)
7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2012 Sep 28; Regensburg. In: Abstractband 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi), Regensburg, 26.-29.09.2012. 66.

Hahn S, Weitmann K, Havemann C, Hoffmann W. Prozessablauf des Probenhandlings im SFB/TR 19 am Beispiel des Studienzentrums Greifswald. (Vortrag)
11. Fachtagung des Deutschen Verbandes Medizinischer Dokumentare; 2011 Feb 17; Hannover.

Hirt C, Weitmann K, Schüler F, Kiefer T, Hoffmann W, Dölken G. Prevalence and frequency of circulating T(14;18)-positive cells in healthy individuals of a population-based cross sectional study – association with age and gender but not with smoking status. (Vortrag)
11. International Conference on Malignant Lymphoma; 2011 Mai 07; Chicago.

Riad A, Meyer zu Schwabedissen H, Weitmann K, Grube M, Dörr M, Herda L, Empen K, Kieback A, Hummel A, Kandolf R, Hoffmann W, Kroemer H, Felix S. Variants of Toll Like Receptor 4 Have Prognostic Value in Patients with Dilated Cardiomyopathy. (Vortrag)

American Heart Stroke Association Scientific Sessions 2011; 2011 Nov 15; Orlando, Florida.

Hoffmann W, Angelow A, Havemann C, Hahn S, Weitmann K. Federated Biosample and Data Management in the SFB/TR 19 "Inflammatory Cardiomyopathy - molecular pathogenesis and therapy" – Principles and Design. (Poster)

Internationales Symposium "New Molecular Pathomechanismus and Novel Therapeutic Approaches in Heart Failure"; 2010 Jan 23; Berlin.

Oberstadt M, Bien-Möller S, Rimbach C, Weitmann K, Vogelgesang S, Zeden J, Schroeder H, Hoffmann W, Roßkopf D, Kroemer H. Influence of ABCB1, ABCG2 and MGMT promoter methylation and gene polymorphisms on clinico-pathological characteristics of glioma patients. (Poster)

35. Kongress der European Society for Medical Oncology (ESMO); 2010 Okt 12; Mailand. In: ANNALS OF ONCOLOGY. 333.

Rochow N, Weitmann K, Nötzel C, Kalhoff H, Kattner E, Nelle M, Roth B, Hoffmann W, Fusch C. Multizentrische Studie: Metabolische Azidosen, Ernährung und Wachstum von VLBW-Frühgeborenen. (Poster)

36. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI); 2010 Jun 19; Saarbrücken.

Schmidt J, Hoffmann W, Weigel M, Rautmann C, Weitmann K, Bruns R. Deutschlandweite Studie zur Impfeinstellung und zum Impfverhalten niedergelassener Pädiater mit und ohne Schwerpunkt-/ Zusatzbezeichnung Homöopathie. (Poster)

3. Europäischer Kongress für Integrative Medizin (ECIM); 2010 Dez 04; Berlin.

Weitmann K, Havemann C, Hahn S, Angelow A, Hoffmann W. Federated Biosample and Data Management in the SFB/TR 19 "Inflammatory Cardiomyopathy - molecular pathogenesis and therapy" - Present status. (Poster)

Internationales Symposium "New Molecular Pathomechanismus and Novel Therapeutic Approaches in Heart Failure"; 2010 Jan 23; Berlin.

Hoffmann W, Rautmann C, Weigel M, Schmidt J, Bruns R, Weitmann K. Multivariate Analyse des Impfverhaltens von Hausärzten in einer deutschlandweit-repräsentativen Querschnittsstudie: Ost-West-Vergleich und Anwendung alternativer Methoden. (Vortrag)

5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2010 Sep 25; Berlin. In: GESUNDHEITSWESEN. 72:543.

Bruns R, Weigel M, Rautmann C, Schmidt S, Schmidt J, Weitmann K, Hoffmann W. Study about vaccination and vaccination practice of pediatricians in Germany. (Poster)

27. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (ESPID); 2009 Jun 13; Brüssel.

Schwedler S, Weitmann K, Hoffmann W. Probenmanagement im SFB/TR 19 „Inflammatorische Kardiomyopathie“. (Poster)

10. Fachtagung des Deutschen Verbandes Medizinischer Dokumentare (DVMD) „Die Welt der Dokumentation“; 2009 Apr 04; Ludwigshafen.

Hirt C, Weitmann K, Schüler F, Späth C, Hoffmann W, Dölken G. Assessment of circulating t(14;18)-positive cells in 4152 individuals without lymphoma shows association with age and gender, but not with smoking status: Results from the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP). (Poster)

51. Jahreshauptversammlung der American Society of Hematology; 2009 Dez 08; Orleans.

Weitmann K, Empen K, Kuon E, Felix S, Hoffmann W. Überprüfung des Übereinstimmungsgrades von zwei unterschiedlichen Koronarangiographieverfahren bei Patienten mit Verdacht auf Koronare Herzkrankheit. (Poster)

4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2009 Sep 19; Münster.

Angelow A, Weitmann K, Schwedler S, Havemann C, Vogt H, Hoffmann W. Analyse des Nikotinkonsums als potentieller Risikofaktor bei Patienten mit Inflammatorischer Kardiomyopathie. (Poster)
3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2008 Sep 27; Bielefeld. In: Tagungsband 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie. 269.

Weitmann K, Angelow A, Schwedler S, Havemann C, Vogt H, Hoffmann W. Gesundheitsbezogene Lebensqualität (SF-12) von Patienten mit Inflammatorischer Kardiomyopathie in Abhängigkeit von krankheitsassoziierten Faktoren. (Poster)
3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2008 Sep 27; Bielefeld. In: Tagungsband 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie. 270.

Hoffmann W, Weitmann K, Havemann C, van den Berg N, Angelow A. Zentrales Datenmanagement vernetzter Forschungsprojekte. (eingeladener Vortrag)
April-Tagung des Arbeitskreises der Leiter der Rechenzentren der Universitätskliniken (ALKRZ); 2008 Apr 17; Greifswald.

Angelow A, Weitmann K, Schmidt M, Schwedler S, Vogt H, Hoffmann W. Zentrales Datenmanagement im Sonderforschungsbereich Inflammatorische Kardiomyopathie - Deskriptive Analyse der ersten 588 Patientenfälle. (Poster)
2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi) gemeinsam mit der 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Sozialmedizin und Prävention e.V., der 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (gmds), des 2. LGL Kongresses für den Öffentlichen Gesundheitsdienst, der Jahrestagung des Medizinischen Dienstes der Krankenversicherung (MDK) in Bayern und der 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Soziologie e.V.; 2007 Sep 21; Augsburg. In: Abstractband Kongress Medizin und Gesellschaft 2007. 485.

Weitmann K, Terschüren C, Hoffmann W. Weiterführende Untersuchung zu möglichen Ursachen der Leukämiehäufung in der Elbmarsch mittels einer Stratifizierung nach Zeitfenstern. (Poster)
1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epidemiologie (DGEpi); 2006 Sep 20; Greifswald.

Hoffmann W, Weitmann K, Fendrich K. Veränderte Allgemeinerkrankungen in der Bevölkerung – Worauf muss sich der Zahnarzt künftig einstellen. (eingeladener Vortrag)
11. Greifswalder Fachsymposium der Mecklenburg-Vorpommerschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an den Universitäten Greifswald und Rostock e.V. „Orale Medizin und Parodontologie“, im Rahmen der 550-Jahrfeier der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.; 2006 Jun 24; Greifswald.

Weitmann K, Feuerschütz D, Sümnick W, Hoffmann W. Früherkennung und Prävention von Präkanzerosen und Mundhöhlentumoren. (Poster)
4. Deutscher Kongress für Versorgungsforschung (DKVF); 2005 Sep 21; Berlin. In: Tagungsband.

Weitmann K, Feuerschütz D, Sümnick W, Hoffmann W. Versorgungsepidemiologische Untersuchung zur Abklärung von Mundschleimhautbefunden durch niedergelassene Zahnärzte in einer bevölkerungsbezogenen Querschnittsstudie. (Vortrag)
12. Jahrestagung der DAE; 2005 Sep 14; Freiburg. In: Tagungsband gmds / dae. 714-716.

A.3 Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hoffmann, MPH, Herrn Prof. Gottfried Dölken sowie Herrn Dr. Carsten Hirt für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Publikationen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Probanden der Study of Health in Pomerania, den Untersuchern, Leitern und Mittelgebern, die durch Ihre Unterstützung eine Forschung zu diesem Thema ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt Frau Ute Pett für die Durchführung der Bioprobenanalyse.

Darüber hinaus danke ich ganz herzlich meiner Familie, meinen Freunden sowie meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Community Medicine, Abt. VC. für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation.