

Stefan Peter Pfeiffer
Dr. med.

Dendritische Zellen beim multiplen Myelom: In vitro Kultivierung dendritischer Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit multiplem Myelom

Geboren am 04. Juni 1971 in Karlsruhe
Reifeprüfung am 30. Oktober 1990 in Kapstadt / Südafrika
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis SS 1999
Physikum am 29. März 1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg und London / Großbritannien
Praktisches Jahr in Heidelberg und Kapstadt / Südafrika
Staatsexamen am 12. Mai 1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Medizin / Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. H. Goldschmidt

Durch Chemotherapie und dosiseskalierte Behandlung konnte die Prognose für Patienten mit multiplem Myelom in den letzten 30 Jahren verbessert werden. Jedoch führten diese Behandlungen zu keinem Plateau der Überlebenszeit. Neue Therapieverfahren werden gesucht, um Patienten mit multiplem Myelom zu heilen. Eine dieser Strategien ist das Auslösen von immunologischen Antitumorreaktionen. Die neoplastischen Plasmazellen sezernieren ein monoklonales krankheitstypisches Immunglobulin und kommen somit als Zielzellen für das Immunsystem in Frage. Um Patienten mit multiplem Myelom immuntherapeutisch zu behandeln, ist eine verstärkte Stimulation von T-Zellen Voraussetzung. Der Erfolg dieser Aktivierung hängt maßgeblich von optimaler Antigenpräsentation und Kostimulation ab. Dendritische Zellen werden als die stärksten antigenpräsentierenden Zellen betrachtet.

In dieser Studie wurden dendritische Zellen in Flüssigkultur mit GM-CSF, SCF, IL-4 und flk-2/flt-3-Ligand kultiviert. Als Ausgangspopulation wurden adherente PBMC von 10 Patienten mit multiplem Myelom und 10 gesunden Blutspendern verwendet. Die Kulturen wurden mit $9,38 \pm 2,19 \times 10^5$ adherenten PBMC begonnen. Durchfluß-zytometrische Untersuchungen dieser Zellen zeigten T-Lymphozyten (13,35-45,95%) und Monozyten-Makrophagen (76,68-56,55%) in der Kultur. Die Erträge der Kulturen von Patienten und Probanden wurden nach 10 Tagen verglichen. In den Patientenkulturen wurden durchschnittlich $1,97 \times 10^6$ Zellen, in den Probandenkulturen $1,83 \times 10^6$ Zellen ausgezählt. Der statistische Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,53$). Durchfluß-zytometrisch konnten bei den Patienten $8,19 \times 10^5$ dendritische Zellen (41% der kultivierten Leukozyten) und bei den Probanden $9,87 \times 10^5$ dendritischen Zellen (51% der kultivierten Leukozyten) nachgewiesen werden. Der Vergleich dendritischer Zellzahlen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Probandengruppe ($p=0,53$).

Um die kultivierten dendritischen Zellen von Patienten und Probanden genauer zu charakterisieren, wurden sie durchfluß-zytometrisch phänotypisiert. Dabei wurden dendritische Zellen als CD1a-positiv, HLA DR-positiv, CD80-positiv, und CD14-negativ definiert. Bei der mikroskopischen Beurteilung der kultivierten Zellen wurden große Zellen mit dendritischen Fortsätzen und feiner Granulierung als dendritische Zellen gewertet. Die Anzahl mikroskopisch definierter dendritischer Zellen korrelierte mit der Anzahl der phänotypisch definierten dendritischen Zellen.

Die Stimulationskapazität kultivierter dendritischer Zellen wurde mittels Thymidin-Inkorporationsassays getestet. Diese dendritischen Zellen waren in der Patientengruppe und der Probandengruppe effektivere Stimulatoren der primären, allogenen gemischten Leukozyten-Reaktion als die PBMC des gleichen Individuums. Ein statistischer Vergleich der Stimulationskapazitäten von Patienten- und Probanden-Zellgut ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,76$).

Weiter wurde ein Versuchsaufbau dokumentiert, in dem kultivierte mit Myelom-Protein beladene („pulsed“) dendritische Zellen in vitro autologe, naive T-Zellen in einem Thymidin-Inkorporationsassay stimulierten. In diesem In-Vitro-Modell zeigten wir, daß autologe T-Zellen von Myelom-Protein beladenen dendritischen Zellen zur Proliferation angeregt werden können. Inwiefern dies in vivo möglich ist, soll in weiteren Experimenten untersucht werden. Hsu *et al.* behandelte erfolgreich Patienten mit B-Zell-Lymphom immuntherapeutisch mit kultivierten dendritischen Zellen. Potentiell ist dies auch bei Patienten mit multiplem Myelom möglich.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß dendritische Zellen aus peripheren Blutzellen von Patienten mit multiplen Myelom kultiviert werden können. In den funktionellen Tests zeichnen sich diese durch starke Stimulationskapazität in Thymidin-Inkorporationsassays aus. Dendritische Zellen von Patienten mit multiplem Myelom unterscheiden sich weder in Phänotyp noch in Funktion von dendritischen Zellen, die aus peripheren Blutzellen von gesunden Blutspendern kultiviert wurden.