

Charlotte Kallmeyer  
Dr. med.

## **Quantifizierung zirkulierender B-Zellen bei Patienten mit Multiplem Myelom**

Geboren am 24.01.1972 in Köln  
Reifeprüfung am 11.06.1991 in Ladenburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis WS 1998/1999  
Physikum am 07.04.1994 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 23.11.1998 an der Universität Heidelberg

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

Das Multiple Myelom ist eine klonale B-Zellerkrankung, die durch Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert ist. Die maligne Transformation erfolgt jedoch nicht erst auf Plasmazellebene, sondern schon früher in der Entwicklung der B-Zellen. Auch im Blut zirkulierende B-Zellen können zum Tumorklon gehören. Diese Erkenntnis ist von besonderer Bedeutung, da Myelompatienten bis 65 Jahre meist mit Hochdosis-Chemotherapie und Rückgabe von autologen Blutstammzellen behandelt werden. Es besteht somit die Gefahr einer Reinfusion von Tumorzellen.

Über das Ausmaß der Beteiligung zirkulierender B-Zellen am malignen Klon herrscht beim Multiplen Myelom Uneinigkeit. Es gibt Berichte von verminderten, nicht malignen B-Zellen bis hin zu solchen von einem stark vergrößerten, tumorhaltigen B-Zellkompartiment im peripheren Blut. Auch von einer Chemotherapie-Resistenz dieser Zellen wurde berichtet, die somit für die beim Multiplen Myelom typischen Rezidive verantwortlich sein könnten.

In dieser Arbeit wurde der Gehalt an monoklonalen und polyklonalen B-Zellen im Blut von Myelompatienten vor und nach konventioneller Chemotherapie sowie nach Hochdosistherapie untersucht.

Die B-Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD19, einen Pan-B-Zellmarker, markiert und mittels Durchflußzytometrie quantifiziert. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene kommerziell erwerbbar Antikörper gegen CD19 getestet. Der Anti-CD19-Antikörper von Immunotech und der Leu-12-Antikörper von Becton Dickinson erwiesen sich als gleichwertig, während der B4-Antikörper von Coulter durch eine Färbung von myelomonozytären Zellen, charakterisiert durch die Koexpression von CD11b, CD13 und CD14, auffiel. Aufgrund einer besseren Abgrenzbarkeit der CD19<sup>+</sup>-Zellen wurde in dieser Studie der Anti-CD19-Antikörper von Immunotech verwendet. Die Monoklonalität der B-Zellen wurde mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen Leichtketten sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Zahl der zirkulierenden B-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Myelom vor Beginn einer Therapie signifikant vermindert ist gegenüber gesunden Probanden ( $195.34 \pm 28.19 \times 10^6/l$  vs.  $321.64 \pm 38.99 \times 10^6/l$ ;  $p = .005$ ). Eine Monoklonalität dieser Zellen ließ sich nicht nachweisen: Kein Patient zeigte in der  $\kappa/\lambda$ -Ratio einen "clonal excess", d. h. ein Überwiegen der Leichtkette des

monoklonalen Immunglobulins. In einer Gruppe von Myelompatienten nach glukokortikoidhaltiger Chemotherapie zeigte sich eine gegenüber unbehandelten Patienten hoch signifikant geringere B-Zellzahl ( $54.5 \pm 10.29 \times 10^6/l$ ;  $p < .001$ ). Auch bei diesen Patienten fand sich in keinem Fall ein "clonal excess". Im Rahmen einer Hochdosistherapie-Studie wurde eine zweite Gruppe von Patienten sowohl unmittelbar vor als auch 4 Wochen nach drei Zyklen Chemotherapie nach dem VAD-Schema untersucht. Es zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion der B-Zellen durch die VAD-Therapie (vor VAD  $165.22 \pm 29.13 \times 10^6/l$ ; nach VAD  $62.89 \pm 12.46 \times 10^6/l$ ;  $p < .001$ ). Eine Monoklonalität dieser Zellen ließ sich weder vor noch nach Chemotherapie mittels  $\kappa/\lambda$ -Ratio nachweisen. Bereits drei Monate nach Hochdosistherapie fand sich eine vollständige Rekonstitution der B-Zellen ( $225.93 \pm 32.15 \times 10^6/l$ ;  $p = .841$  beim Vergleich mit dem Referenzkollektiv), die aufgrund der  $\kappa/\lambda$ -Ratio als polyklonal eingestuft werden können.

Eine Vermehrung von Zellen, die zusammen mit CD19 auch CD38<sup>++</sup> als Plasmazellmarker koexprimieren und somit als unreife Plasmazellen anzusehen wären, fand sich in keiner der Gruppen (maximal  $2.35 \pm 1.00 \times 10^6/l$ ; im Referenzkollektiv  $1.00 \pm 0.44$ ;  $p = .731$ ).

Entgegen veröffentlichten Berichten (Bergsagel et al., 1995) zeigen diese Untersuchungen, daß bei unbehandelten Myelompatienten keine zirkulierende Tumorphosphation in Form von B-Zellen oder unreifen Plasmazellen nachweisbar ist. Außerdem wurde nachgewiesen, daß die Reduktion polyklonaler B-Zellen durch eine konventionelle Chemotherapie nicht zum Hervortreten einer monoklonalen B-Zellpopulation führt. Diese Untersuchungen zeigen, daß das periphere Blut bei Myelompatienten weniger mit Tumorzellen kontaminiert ist als das Knochenmark und daher als Stammzellquelle vorzuziehen ist. Nach Hochdosis-Chemotherapie erfolgt die Rekonstitution durch polyklonale B-Zellen.