

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Prävalenz und Koprävalenz der Monoklonalen Gammopathie
unklarer Signifikanz (MGUS) und der monoklonalen B-Zell-
Lymphozytose (MBL) in einer großen Hospitalkohorte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Birthe Kathrin Vogler
geboren in Hannover

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.02.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Martin Trepel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Carsten Bokemeyer

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Mascha Binder

Für meine Eltern
Helga und Dieter W.
Wehde

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Allgemeines zu B-Lymphozyten	6
1.2	Lymphoproliferative Erkrankungen	7
1.2.1	Chronisch Lymphatische Leukämie	7
1.2.2	Monoklonale B-Zell Lymphozytose (MBL)	8
1.2.3	Multiples Myelom	10
1.2.4	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz	11
1.3	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Allgemeine Materialien	15
2.1.2	Material für Zellseparation	15
2.1.3	Material für Durchflusszytometrie	16
2.1.4	Material für Immunfixation	17
2.1.5	Material für Kapillar-Elektrophorese	17
2.1.6	Material für Differentialblutbild-Bestimmung durch Durchflusszytometrie	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Blutpräparation und Zellseparation	18
2.2.2	Durchflusszytometrie	19
2.2.3	Immunfixation	24
2.2.4	Kapillar-Elektrophorese	26
2.2.5	Differentialblutbild	26
2.2.6	Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Patientencharakteristika	29
3.2	Differentialblutbild und Serum-Elektrophorese	30
3.3	Auswertung der sekundären Endpunkte	31
3.3.1	Immunfixation	31
3.3.2	FACS-Analyse	35
3.4	Resultate des primären Endpunktes	44
3.4.1	Auswertung der Koprävalenz von MBL und MGUS	44
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4	Diskussion	47
4.1	Prävalenz von MBL und MGUS im Patientenkollektiv	48
4.1.1	MBL	48

4.1.2	MGUS.....	50
4.2	Koprävalenz von MBL und MGUS im Patientenkollektiv	51
4.3	Ausblick.....	55
5	Zusammenfassung	57
6	Abkürzungen	58
7	Literaturverzeichnis.....	59
8	Abbildungsverzeichnis.....	64
9	Tabellenverzeichnis.....	65
10	Danksagung	66
11	Lebenslauf.....	67
12	Eidesstattliche Versicherung	68

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten dienen der humoralen Immunantwort. Jeder Lymphozyt ist zu Anfang „naiv“ und spezialisiert sich erst unter Antigenexposition zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle oder zur Gedächtniszelle (Milstein, 1986). Die Spezifität des Immunsystems wurde in ihren Grundzügen erstmals 1890 von Behring und Kitasato beschrieben (Behring and Kitasato, 1965). Die Entstehung und Differenzierung der B-Lymphozyten geschieht im Knochenmark aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen. Wichtig sind hierfür die Stromazellen des Knochenmarks, welche die Signalgebung zur Synthese von kompetenten B-Zell-Rezeptoren auslösen. Hierzu wird in mehreren Reifungsschritten geprüft, ob die Rezeptoren der jungen B-Zellen funktionstüchtig sind. Ist dies nicht der Fall oder zeigen sie eine Affinität zu körpereigenen Strukturen, werden sie inaktiviert und eliminiert.

Die Antigenrezeptoren auf der Oberfläche der B-Lymphozyten haben eine Y-förmige Struktur (Valentine and Green, 1967), bestehend aus schweren und leichten Proteinketten, welche über Disulfidbrücken verbunden sind (Porter, 1972). Das antigenbindende Ende der Rezeptoren besteht aus V-, D- und J-Regionen, welche durch Kombination und somatische Punktmutation auf Genebene die Spezifität des Rezeptors definieren. Die B-Lymphozyten können im Gegensatz zu den T-Lymphozyten mit dem Paratop des entsprechenden Immunglobulins komplette Antigen-Moleküle binden. Bei naiven B-Lymphozyten werden die membranständigen Immunglobuline M und D produziert. Durch Antigene, welche den B-Zellen präsentiert werden, wird mittels Rekombination ein Klassenswitch an den B-Zellen ausgelöst, der die Produktion von Antikörpern initiiert (Milstein, 1986). Die Plasmazelle produziert nun lösliche, spezifische Antikörper (Jerne, 1985). Neben den Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche der B-Lymphozyten Marker, welche je nach Entwicklungszustand der B-Zelle unterschiedlich sind. So findet man auf einer reifen B-Zelle u.a. die Oberflächenmarker CD5, CD19, CD20, CD40 und FMC7. Anhand dieser Marker können andere körpereigene Zellen mit den B-Lymphozyten interagieren, sie erkennen und stimulieren.

Die Zahl der im peripheren Blut befindlichen Lymphozyten lässt sich im Labor mittels eines Differentialblutbilds bestimmen. Hierfür wird die absolute Anzahl von Lymphozyten (ALC) mittels folgender Formel berechnet (Shapiro et al., 1998):

$$ALC = \frac{\text{Leukozyten} \left(\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{Lymphozyten (\%)}}{100}$$

Von einer Lymphozytose spricht man bei Erwachsenen bei Werten $>4,0 \times 10^9/L$ im peripheren Blut. Eine Lymphozytose kann reaktiv bedingt sein oder aus einer malignen Erkrankung resultieren. Bei einer reaktiven Lymphozytose, etwa bei einem Virusinfekt, erscheinen ausgereifte Lymphozyten im peripheren Blut. Bei lymphoproliferativen Erkrankungen können klonale B-Zellen ins periphere Blut ausgeschwemmt werden.

1.2 Lymphoproliferative Erkrankungen

Aus der Fehlentwicklung von Lymphozyten können unterschiedliche Erkrankungen entstehen. Hierzu zählen primär und sekundär erworbene Immundefekte, das Hodgkin-Lymphom, die verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und die akute lymphatischen Leukämien (Jaffe, 2009).

Im folgenden wird genauer auf die chronische lymphatische Leukämie (CLL) mit ihrer Vorstufe, der monoklonalen B-Zell Lymphozytose (MBL), und auf das Multiple Myelom (MM) mit seiner Vorstufe, der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), eingegangen.

1.2.1 Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL gehört zum Formenkreis der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) und tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 4,1 für Männer und 2,1 für Frauen pro 100.000 Einwohner auf (Wendtner, 2012). Damit erkranken Männer ungefähr doppelt so häufig wie Frauen. Das mediane Alter einer Erstdiagnose liegt bei 70 Jahren. Die Ursachen der CLL sind noch unklar. Ein spezifischer Zusammenhang zwischen einem Defekt auf genetischer Ebene und der CLL ist nicht nachgewiesen, jedoch treten häufig Deletionen der Chromosomen 13q, 11q, und 17p sowie numerische Zugewinne von Chromosom 12 auf (Döhner et al., 2000).

Diese veränderten Chromosomen tragen möglicherweise zur Verhinderung der Apoptose autoreaktiver Gedächtniszellen bei. Im weiteren Verlauf erfolgt durch eine Zytokinausschüttung eine klonale Vermehrung dieser immuninkompetenten, klonalen B-Zellen und eine Infiltration der hämatopoetischen Organe und Gewebe, wodurch die Produktion von normalen Blutzellen durch Verdrängung drastisch reduziert wird (Dighiero and Hamblin, 2008). Als Folge zeigt sich das klinische Bild einer Leukozytose mit einer Lymphozytose und durch Infiltration der lymphatischen Organe derbe, indolente Lymphknotenschwellungen sowie ggf. mit einer Thrombozytopenie und Anämie. Für die CLL gilt folgender Immunphänotyp als charakteristisch: Die B-Zellen exprimieren CD19, CD23, und aberrant das Antigen CD5. CD20 und CD79b werden schwach exprimiert und es liegt eine Leichtkettenrestriktion (Kappa oder Lambda) vor (Bene et al., 1995). Die Prognose hängt u.a. mit den genetischen Veränderungen der CLL-Zellen zusammen. Patienten mit Veränderungen von Chromosom 17p zeigen die ungünstigste Prognose (Döhner et al., 2000). Da die Erkrankung durch Medikamente meist nicht heilbar ist und gehäuft erst im höheren Alter auftritt, sind die Therapiestrategien sehr variabel. In vielen Fällen wird zunächst nur eine Verlaufsbeobachtung durchgeführt; besteht eine Therapieindikation, können anti-CD20-B-Zellantikörper und Zytostatika wie Fludarabin und Cyclophosphamid verabreicht werden. Für wenige ausgewählte Patienten bietet sich die Option einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation an (z.B. bei Patienten in jüngerem Alter mit *TP53*-Genmutation und somit einer ungünstigen Prognose) (Gribben and O'Brien, 2011).

1.2.2 Monoklonale B-Zell Lymphozytose (MBL)

Die MBL bezeichnet ein Vorhandensein von monoklonalen B-Zell-Populationen im Blut mit lymphomtypischem Immunphänotyp, ohne dass ansonsten die Diagnosekriterien eines Lymphoms z.B. einer CLL mit > 5000 Lymphozyten / μl im Blut vorliegen. Der Zusammenhang zwischen einer MBL als Vorläufer der CLL wurde in Studien belegt, in welchen Angehörige von Individuen mit CLL auf MBL untersucht wurden (Marti et al., 2003; Goldin et al., 2010). Dort wurde nachgewiesen, dass bei Angehörigen eines Individuums mit CLL häufiger eine MBL auftritt als in der Normalbevölkerung. Ferner ließen sich bei Individuen mit

MBL Veränderungen der Chromosomen 11q, 12, 13q, und 17p nachweisen, welche auch bei CLL vorkommen (Döhner et al., 2000; Rawstron et al., 2008). Somit spielt eine genetische Prädisposition sicherlich eine Rolle für die Entwicklung einer MBL (Marti et al., 2003).

Die Immunphänotypisierung ermöglichte es, klonale B-Zellen offenbar ohne Krankheitswert auch bei gesunden Individuen zu detektieren (Rawstron et al., 2002). Für diese Fälle wurden folgende Kriterien zur Diagnose einer MBL festgelegt (**Tabelle 1-1**) (Marti et al., 2005).

Tabelle 1-1: Kriterien zur Diagnose einer monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL) nach Marti et al (Marti et al., 2005)

<p>1. Feststellung einer pathologischen B-Zell-Population im peripheren Blut mit</p> <p>a) Kappa:Lambda Ratio >3:1 oder <0,3:1</p> <p>b) Mehr als 25% der B-Zellen zeigen keine oder eine geringe Expression von Oberflächen-Immunglobulin</p> <p>c) Ein erkrankungsspezifischer Immunphänotyp</p>
<p>2. Stabilität der monoklonalen B-Zell-Population über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten</p>
<p>3. Ausschluss-Kriterien</p> <p>a) Lymphadenopathie und/oder Organomegalie</p> <p>b) Damit verbundene Autoimmunprozesse/Infektionen</p> <p>c) Klonale B-Lymphozytenzahl $\geq 5,0 \times 10^9/L$</p> <p>d) Nachweis einer anderen lymphoproliferativen Erkrankung</p>
<p>4. Subklassifikation</p> <p>a) CD5+, CD23+: Die größte Subgruppe, Phänotyp wie bei typischer CLL („CLL-Phänotyp“)</p> <p>b) CD5+, CD23-, CD20++, CD79b-: korreliert mit dem Phänotyp einer „atypischen CLL“</p> <p>c) CD5-: „Non-CLL“ (Phänotyp anders als bei CLL)</p>

Es werden in verschiedenen Studien die folgenden drei Subtypen von MBL beschrieben (siehe auch **Tabelle 1-1**) (Ghia et al., 2004; Marti et al., 2005):

- **„CLL-like MBL“**: CD5+, CD20(+), CD23+
- **„Atypische CLL-like MBL“**: CD5+, CD20++, CD23-
- **„Non-CLL-like MBL“**: CD5-

Diese drei Phänotypen beschreiben die jeweils aufgetretene Population der klonalen B-Zellen. Hierbei werden die Formen der „CLL-like MBL“ und „atypischen CLL-like MBL“ als Präkanzerosen gesehen und die Form der „Non-CLL-like MBL“ zum Teil als Ausdruck des Immunsystems auf einen selbstlimitierten Auslöser diskutiert (Fazi et al., 2011). Als Vorläufererkrankung der CLL steigt die Prävalenz von MBL mit dem Alter an. Mehr als 5% der über 60-Jährigen mit normalem Blutbild weisen eine Monoklonalität der B-Zellen im Sinne einer MBL auf (Marti et al., 2005; Rawstron, 2009). Das Risiko, dass eine MBL in eine CLL transformiert, liegt bei ca. 1% pro Lebensjahr (Rawstron, 2009).

1.2.3 Multiples Myelom (MM)

Wie die CLL gehört das Multiple Myelom zum Formenkreis der B-Non-Hodgkin-Lymphome. Die Erkrankung tritt vermehrt ab dem 60. Lebensjahr auf und ist der häufigste Tumor von Knochenmark und Knochen (Crawford et al., 1987; Kyle et al., 2006). Es handelt sich um eine maligne Erkrankung der Plasmazellen im Knochenmark mit einer monoklonalen Vermehrung von Immunglobulinen. Die Ursache ist weitgehend unbekannt. Die Inzidenz wurde im Vereinigten Königreich mit 7,1 auf 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben, wobei Männer 1,5 mal häufiger erkrankten als Frauen (www.hmrn.org, 2004). Die Vermehrung der monoklonalen Plasmazellen im Knochenmark führt zur Verdrängung der Hämatopoese und zur Inhibierung der Osteoblasten (Tian et al., 2003), sowie zur Aktivierung von Osteoklasten (Mitsiades et al., 2004). Von malignen Plasmazellen werden Immunglobuline produziert, welche im Gewebe und in den Organen akkumulieren. In über 50% der Fälle handelt es sich dabei um das Immunglobulin G (IgG), gefolgt von IgA (25%) und Bence-Jones-Proteinen (20-25%). Selten (1%) entwickeln sich IgD-Myelome (Myeloma Working Group, 2003). Wenn im Knochenmark >10 % klonale Plasmazellen, im Urin und/oder im Serum monoklonale Proteine und Endorganschäden nachgewiesen werden, sind die

Kriterien für ein Multiples Myelom erfüllt. Die klinischen Symptome wie Anämie und Erschöpfung sind Folge der Knochenmarksinsuffizienz. Das Frakturrisiko und die Hyperkalzämie werden durch die erhöhte Osteoklastenaktivität verursacht (Myeloma Working Group, 2003). Der Auslöser der bislang nicht heilbaren Erkrankung ist noch unbekannt, man vermutet aber wie bei der CLL eine Ursache auf genetischer Ebene (Rajkumar, 2011). Die Prognose der Patienten hängt von genetischen Risikofaktoren ab. Veränderungen der Chromosomen, wie 17p-Deletionen und t(14;16), t(14;20) Translokationen stellen ein Hochrisikofaktor dar. Ein mittleres Risiko liegt bei der 13q-Deletion und t(4;14) Translokation vor. Ein Standardrisiko wird angenommen, wenn eine t(11;14) oder t(6;14) Translokation besteht (Mikhael et al., 2013). Man nimmt an, dass die genetischen Veränderungen eine Apoptose der Myelomzellen verhindern und die Proliferation fördern (Mitsiades et al., 2004; Raab et al., 2009). Die Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom beginnt spätestens mit dem Auftreten der klinischen Symptome und kann bis zur autologen Stammzelltransplantation führen (Rajkumar, 2011). Im Rahmen von Studien wird darüber hinaus der Stellenwert der allogenen Stammzelltransplantation für ausgewählte Patienten mit einem Multiplen Myelom untersucht.

1.2.4 Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)

Als Vorstufe des Multiplen Myeloms gilt heute die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) (Landgren et al., 2009b). Sie bezeichnet das Vorhandensein eines monoklonalen Immunglobulins im Serum oder Knochenmark ohne Zeichen einer lymphoproliferativen Erkrankung. Die Diagnosekriterien für das MGUS wurden 2003 von der International Myeloma Working Group festgelegt und beinhalten folgende Punkte (**Tabelle 1-2**) (Myeloma Working Group, 2003):

Tabelle 1-2: Kriterien zur Diagnose eines MGUS von der Internationalen Myelom Arbeitsgruppe (Myeloma Working Group, 2003)

1.	Monoklonales Immunglobulin im Serum <3 g/dL
2.	Klonale Plasmazellen im Knochenmark <10 %
3.	Fehlen von Endorganschäden (Hyperkalzämie, renale Insuffizienz, Anämie und Knochenläsionen)
4.	Keine Anzeichen einer anderen B-Zell-Erkrankung

Die MGUS hat eine ebenso steigende Prävalenz im höheren Lebensalter wie das MM. Bei über 5% der über 60-Jährigen lassen sich monoklonale Immunglobuline (M-Protein) im Serum nachweisen (Kyle et al., 2006). Das Risiko, dass sich eine MGUS über ein indolentes bis zum symptomatischen Myelom entwickelt, liegt bei 1% pro Lebensjahr (Kyle, 1978). Der Zusammenhang zwischen MGUS und Multiplem Myelom wurde seit längerem in Studien vermutet (Kyle et al., 2002), da einzelne Individuen, bei denen ein MGUS beschrieben war, nach mehreren Jahren ein Multiples Myelom entwickelten. Neuere Studien konnten dann schlüssig zeigen, dass jedem Fall von Multiplem Myelom eine MGUS vorausgeht (Landgren et al., 2009b). Auch Patienten mit einer MGUS zeigen klonale genetische Veränderungen der Plasmazellen, welche pathogenetisch eine Rolle spielen dürften (Avet-Loiseau et al., 1998; Mitsiades et al., 2004).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zum Formenkreis der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome gehören die chronische lymphatische Leukämie (CLL) und das Multiple Myelom (MM). Die CLL ist in der westlichen Hemisphäre bei Erwachsenen die häufigste Leukämieform (Hernandez et al., 1995). Patienten mit dem Vorläufer dieser malignen Erkrankung, einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) haben ein Risiko von 1% pro Lebensjahr, eine CLL zu entwickeln (Rawstron, 2009).

Patienten mit einem Multiplen Myelom (MM) haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von fünf Jahren (Krebsregister, 2004) und die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) gilt als ihr obligater Vorläufer. Patienten mit einer MGUS haben ebenfalls ein Risiko von 1% pro Lebensjahr, ein MM zu entwickeln (Kyle, 1978). Da sowohl die CLL als auch das MM (Landgren and Kyle, 2007) B-Zellneoplasien, stellt sich die Frage, ob zwischen den jeweiligen Vorstufen - MBL und MGUS - eine Verbindung besteht (Marti et al., 2005; Vogt and Marti, 2007). Diese Hypothese konnte bisher noch nicht weiter belegt werden. Einzelfallberichte beschreiben Patienten, bei welchen eine Koprävalenz der beiden Vorstufen MBL und MGUS vorlag (McMaster and Landgren, 2010; Shim et al., 2007).

Ziel der Arbeit war, basierend auf der Annahme einer Assoziation zwischen MBL und MGUS, einen überzufälligen Zusammenhang des Auftretens beider Erkrankungen zu finden. Wir untersuchten in dieser Arbeit 1.913 Individuen bei welchen keine hämatologische Erkrankung bekannt war. Die Untersuchungen erfolgten anhand der Immunfixation aus dem peripheren Blut (zur Detektion einer MGUS) und anhand der multiparametrischen Durchflusszytometrie (zur Detektion einer MBL). Die Proben stammten aus der Routinediagnostik von Patienten, welche innerhalb des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, jedoch außerhalb eines onkologischen Zentrums, behandelt wurden.

Neben der Frage der Koprävalenz sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie groß ist die altersabhängige Prävalenz von MBL in dem Patientenkollektiv?
- Wie groß ist die altersabhängige Prävalenz von MGUS in dem Patientenkollektiv?
- Sollte bei Nachweis einer MGUS in der Immunfixation die Diagnostik um eine immunphänotypische Analyse im Sinne eines Screenings auf eine MBL erweitert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Materialien

Material	Firma
Reaktionsgefäße 13 ml, 95 x 16,8 mm, PS	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 5 ml, 75 x 12 mm, PS Flow Cytometry	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon 14 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CellTrics 30 µm	PARTEC, Görlitz, Deutschland

2.1.2 Material für Zellseparation

Material	Firma
CellWash	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
GIBCO Terasaki Park Medium	Life, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendinitriltetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat EDTA/Triplex III (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Labofuge GL	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.3 Material für Durchflusszytometrie

Material	Firma
FC 500	BeckmanCoulter, Galway, Irland
Software	BeckmanCoulter CXP v.2.2, Irland
Auswertungssoftware	BeckmanCoulter CXP Analysis, Irland
CD20-ECD	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD11a-PE	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD19-PC5	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
FMC7-FITC	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD3-ECD	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD79b-PE	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD23-FITC	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
CD5-PC7	BeckmanCoulterIOTest, Galway, Irland
Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda light Chains, Rabbit F(ab') ₂	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa light Chains/FITC, Rabbit F(ab') ₂	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
AB Serum	Biotest, Dreieich, Deutschland
Coulter Isoton II Diluent	BeckmanCoulter, Galway, Irland
Coulter Clenz	BeckmanCoulter, Galway, Irland
Flow Cleaning Agent	BeckmanCoulter, Galway, Irland

2.1.4 Material für Immunfixation

Material	Firma
HydrasisFocusing	SEBIA, Lisses, Frankreich
Hydragel 9 IF <ul style="list-style-type: none"> • Agarose Gel • Pufferschwamm • AcidViolet – Färbelösung • Diluent • Fixierlösung • Applikator Filterpapier (dickes, dünnes) Filterpapier-Kämme	SEBIA, Lisses Frankreich
Iganit-Hum, lambda	SEBIA, Lisses, Frankreich

2.1.5 Material für Kapillar-Elektrophorese

Material	Firma
Capillarys 2	SEBIA, Lisses, Frankreich
CapillarysSoftware	SEBIA, Lisses, Frankreich
Filter	SEBIA, Lisses, Frankreich

2.1.6 Material für Differentialblutbild-Bestimmung durch Durchflusszytometrie

Material	Firma
LH 750 Hematology Analyzer	BeckmanCoulter, Galway, Irland
Software	BeckmanCoulter, Galway, Irland
LH Series Dilueta	BeckmanCoulter, Galway, Irland
LH Series Clenz Cleaning Agent	BeckmanCoulter, Galway, Irland
LH Series Lyse S III	BeckmanCoulter, Galway, Irland
LH Series Pak Diff Kit	BeckmanCoulter, Galway, Irland
LH Series Reagent Kit	BeckmanCoulter, Galway, Irland

2.2 Methoden

2.2.1 Blutpräparation und Zellseparation

2.2.1.1 Probanden

2.2.1.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden 1.913 zufällig ausgewählte Patienten, welche im Zeitraum 01.01.2010 bis 31.12.2011 im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) behandelt wurden und bei welchen eine Blutabnahme mit EDTA als Antikoagulans erfolgte. Einschlusskriterien für die Untersuchung waren das Lebensalter von über 50 Jahren zum Untersuchungszeitpunkt, sowie Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Referenzwertbereich (**Tabelle 2-1**). Untersucht wurden dann die Patientenproben, von denen nach einer ohnehin erforderlichen Blutentnahme noch Restmaterial einer EDTA- und Serums-Probe vorhanden war. Es erfolgte also keine zusätzliche Blutentnahme für die Untersuchung. Die Präanalytik wurde auf einen Zeitraum von 24 Stunden begrenzt.

2.2.1.1.2 Ausschlusskriterien

Die Blutprobe durfte nicht von Patienten stammen, welche innerhalb des Onkologischen Zentrums der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Auch das Auftreten einer hämato-onkologischen Abrechnungsdiagnose im Zentrallaborsystem schloss den jeweiligen Patienten aus.

Tabelle 2-1: Ein- und Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Untersuchung

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter >50 Jahre	Hämatologisch-onkologische Abrechnungsdiagnose
Leukozyten <11,0 x 10 ⁹ /L	Hämatologisch-onkologische Abteilung/Station
Thrombozyten <400 x 10 ⁹ /L	Materialalter der EDTA-Blutprobe >24 Stunden
Vorhandensein einer EDTA-Probe (Materialalter ≤24 h) + Serumprobe (Materialalter ≤7 Tage)	

2.2.1.2 Probengewinnung

Von denjenigen Patienten, welche im Zeitraum vom 1.1.2010 bis 31.12.2011 im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Klinische Chemie untersucht wurden, wurden zufällig 1.913 Fälle ausgewählt. Die Auswahl erfolgte mittels des Laborverwaltungssystems GLIMS („General Laboratory Information System“; Göttert-Software, Griesheim, Deutschland). Es wurde eine Suchabfrage erstellt, welche die Ein- und Ausschlusskriterien (**Tabelle 2-1**) erfasst und die gewünschten Blutproben zusammenstellte. Die Blutproben wurden händisch aus den Lagerstandorten gesucht und weiter verarbeitet.

Es besteht ein Ethikvotum (Bearb.-Nr.: 2322) der Ethik-Kommision der Ärztekammer Hamburg.

2.2.1.3 Zellseparation

Zur Separation von Leukozyten aus dem EDTA-Blut benötigte man eine Erythrozytenpuffer-Lösung. Diese wurde mit folgender Rezeptur erstellt:

Tabelle 2-2: Reagenzien zur Herstellung einer Erythrozytenpufferlösung

Menge	Reagenz
16,58 g	NH ₄ Cl
2,0 g	KHCO ₃
0,744 g	EDTA / Titriplex III
2,0 L	Aqua dest.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Messprinzip

Die FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorting“) bzw. durchflusszytometrische Untersuchung dient der Zellcharakterisierung nach Größe, Granularität und der Separation von Antikörper-markierten Populationen mit Hilfe von Laserstrahlung. Da das Laserlicht durch die Zellbeschaffenheit gestreut wird und auch die Intensität des Lichts differiert, kann die Zellgröße durch das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und die Granularität durch das

Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) bestimmt werden. Nach diesen Faktoren wird die Zelle einer bestimmten Population im Scatterplot zugeordnet (Coulter, 2009; Hawley and Hawley).

Die Phänotypisierung erfolgt durch die gleichzeitig gemessene relative Fluoreszenzintensität der markierten Oberflächenexpression der Antigene. Die Emission der Fluorochrome, mit denen die Antikörper direkt markiert werden, wird im Zytometer in einem optischen System auf dem für seine Wellenlänge spezifischen Detektor (FL) erfasst. Da in den nachfolgenden Messungen Mehrfachfluoreszenzen gemessen werden, verwendet man verschiedene Emissionswellenlängen der Fluorochrome, damit es keine Überlagerungen gibt. Das detektierte Licht wird in elektronische Daten umgewandelt und in einem Computer zur Bearbeitung gespeichert. Hier kann man die Subtypisierung von bestimmten Zellpopulationen mit Hilfe einer Software getrennt voneinander untersuchen. Dafür werden diese elektronisch eingegrenzt („gegatet“) und in unterschiedlichen Dot-Plots oder Histogrammen dargestellt.

2.2.2.2 Protokoll: Bestimmung der B-Zellen

Für die Zellseparation wurde der Inhalt einer EDTA-Probe mit 10 ml Erythrozytenlyse für 10 Minuten inkubiert und anschließend 5 Minuten lang bei 15.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 12 ml Cell-wash resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 200 µl Terasaki-Medium versetzt und auf drei 6,5 ml Sarstedtröhrchen aufgeteilt. Diese wurden nummeriert und mit den folgenden Antikörpern gefüllt:

Reaktionsgefäße 1:

Antikörper			
10µl FITC-CD23	10µl PC-CD79b	5µl ECD-CD20	5µl PC5-CD19
5µl PC7-CD5	30µl AB-Serum		

Reaktionsgefäße 2:

Antikörper				
5µl FITC-Kappa	5µl PE-Lambda	5µl PC5-CD20	5µl PC5-CD19	5µl PC7-CD5
10µl Maus-Normal-Serum	20µl Cell-wash			

Reaktionsgefäße 3:

Antikörper			
10µl FITC-FMC7	10µl PC CD11a	5µl EDC-CD3	5µl PC5-CD19
5µl PC7-CD5	30µl AB-Serum		

Zu jedem Reaktionsgefäße wurden jeweils 50 µl Zellsuspension gegeben und auf dem Vortex gemischt. Dann wurden die Proben bei 4° C 30 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Proben mit 3 ml Cellwash aufgefüllt und 5 Minuten bei 15.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 0,5 ml Cellwash resuspendiert und im Durchflusszytometer FC500 (BeckmanCoulter, Galway, Irland) gemessen.

2.2.2.3 Gating

Es wurden pro Reaktionsgefäße 300.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie von einem FC500 mit einem 488 Argon Ionen Laser und einem 635 rotem Dioden Laser (BeckmanCoulter, Galway, Irland) analysiert und anschließend mit der CXP Analysis-Software (BeckmanCoulter, Galway, Irland) gegatet. Die im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht detektierten Zellen wurden auf der Basis der Größe und Granulierung in der Dot-Plotdarstellung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aufgeteilt (Abbildung 2-1).

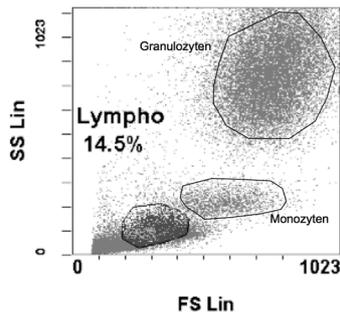
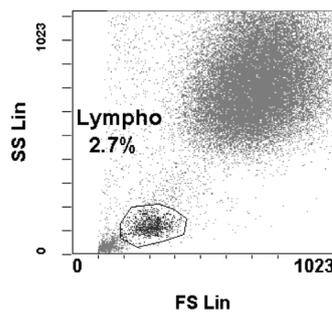


Abbildung 2-1: SSC/FSC Dot-Plot Darstellung von gesundem Vollblut

Hierbei wurden die Eigenschaften der Zellen im Forward Scatter und Side Scatter in einem Diagramm linear gegeneinander aufgetragen, sodass jeder Punkt eine Zelle darstellte. Es wurden im Dot-Plot die vorhandenen Lymphozyten gated und in einem weiteren Schritt die CD19 positiven B-Zellen separiert (**Abbildung 2-2**).

A:



B:

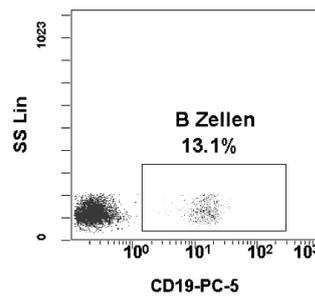


Abbildung 2-2: Gating von B-Zellen. A) Die Region mit Lymphozyten wird markiert. B) Die Zellen in der initialen Markierung werden hinsichtlich CD19 bestimmt. Die Zellen, welche CD19 stark exprimieren und ein schwaches Seitwärtsstreulicht (SSC) erzeugen, werden als B Zellen markiert (Rawstron et al., 2002).

Die Gatingstrategie erfolgte modifiziert nach Rawstron et al.y (Rawstron et al., 2002). Alle weiteren Dot-Plots beziehen sich nur noch auf diese gatedeten B-Zellen und erfassen die in Tabelle 2-3 beschriebenen Antikörper-Kombinationen:

Tabelle 2-3: Kombination genutzter Antikörper

CD19+-PC5/CD20+-ECD	CD19+-PC5/CD5+-PC7	CD19+-PC5/CD23+-FITC
CD19+-PC5/CD79b+-PB	CD19+-PC5/FMC7+-FITC	CD19+-PC5/CD11a+-PE
Anti-Kappa-FITC/Anti-Lambda-PE		

Der Oberflächenmarker CD20 findet sich auf B-Zellen und ist ein typischer Marker für diese, CD5 ist ein typischer T-Zell-Marker, findet sich aber ebenso auf klonalen Zellen einer CLL oder eines Mantelzell-Lymphoms. CD23 befindet sich auf Klonen von leukämischen B-Lymphozyten. CD79b ist ein spezifischer Rezeptor der Immunglobuline von B-Zellen. FMC7 wird ebenfalls von reifen B-Zellen exprimiert. CD11a wird von Lymphozyten exprimiert (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). Bei einem gesunden Individuum sieht diese Kombination der genutzten Antikörper in der Dot-Plot Darstellung folgendermaßen aus (**Abbildung 2-3**):

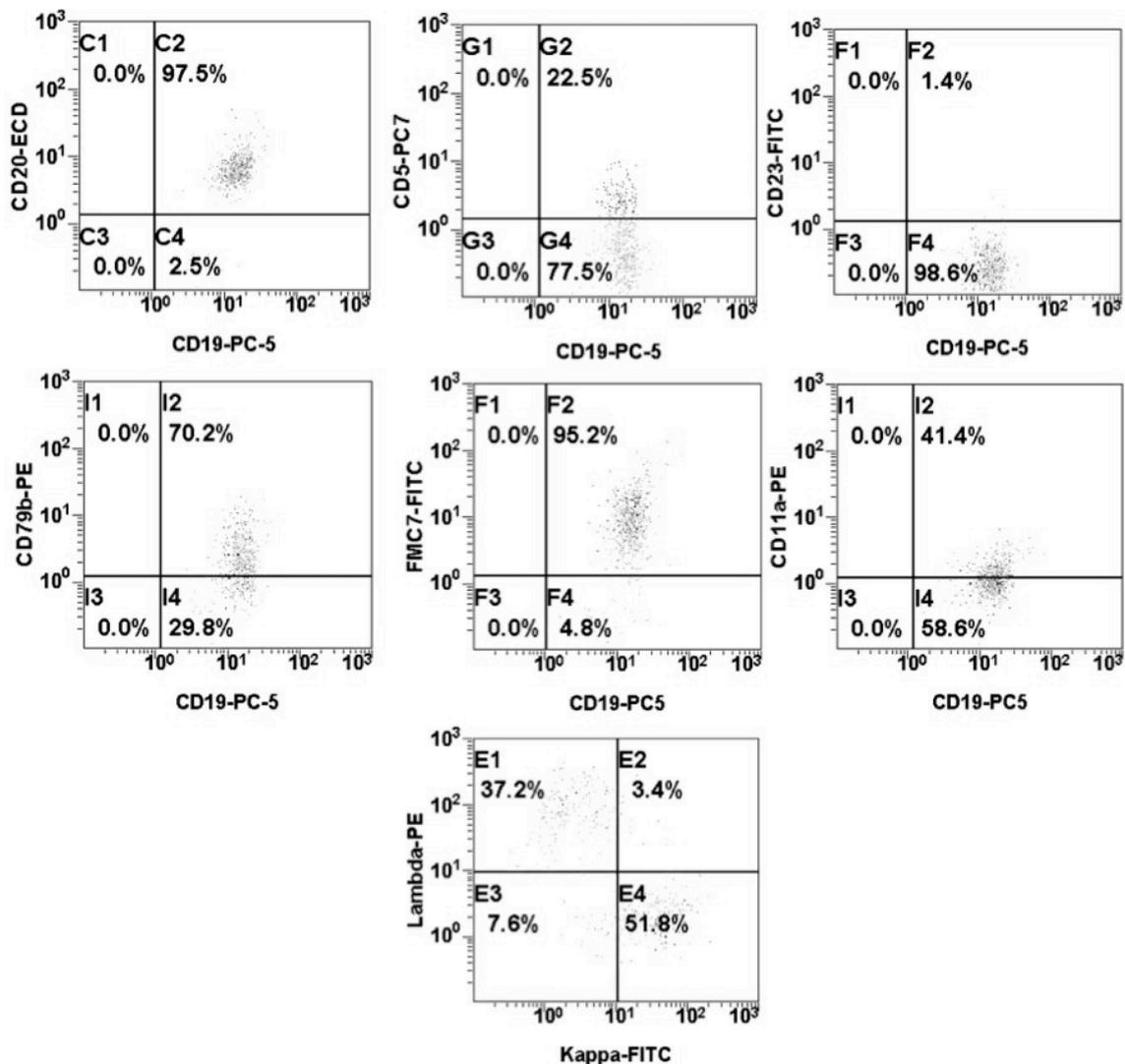


Abbildung 2-3: Darstellung der B-Zellen eines gesunden Individuums in der multiparametrischen Durchflusszytometrie.

Zur Definition einer Population monoklonaler Zellen werden nach Rawstron et al. mindestens 50 Zell-„Events“ benötigt (Rawstron et al., 2002). Das Verhältnis von Kappa/Lambda Immunglobulin-Leichtketten wird als pathologisch gewertet, wenn die Ratio $>3:1$ oder $<0,3:1$ beträgt (Marti et al., 2005).

2.2.3 Immunfixation

2.2.3.1 Messprinzip

Die Immunfixationselektrophorese dient dem sensitiven Nachweis von monoklonalen Proteinen im Serum. Hierfür wird eine Kombination aus Elektrophorese und Immundiffusion verwendet. Zunächst werden auf einem Agarosegel sechs Serumproben eines Patienten elektrophoretisch aufgetrennt. Dann wird das aufgetrennte Eiweiß mit monospezifischen Antiseren gegen die schweren Ketten IgG, IgM, IgA und gegen die Leichtketten Kappa und Lambda überschichtet. Die monoklonalen Antikörper diffundieren zu den als Antigen wirkenden Proteinen und bilden an der Kontaktstelle Präzipitate. Um diese sichtbar zu machen, wird nach dem Auswaschen von überschüssigen Antikörpern das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt und dann ausgewertet. Handelt es sich um monoklonale Immunglobuline, fällt die Präzipitation an dieser Stelle verstärkt aus und es bildet sich eine Linie. Bei einer gleichmäßigen, nicht linienförmigen Anfärbung der Probe kann eine Monoklonalität in der Regel ausgeschlossen werden (**Abbildung 2-4**).

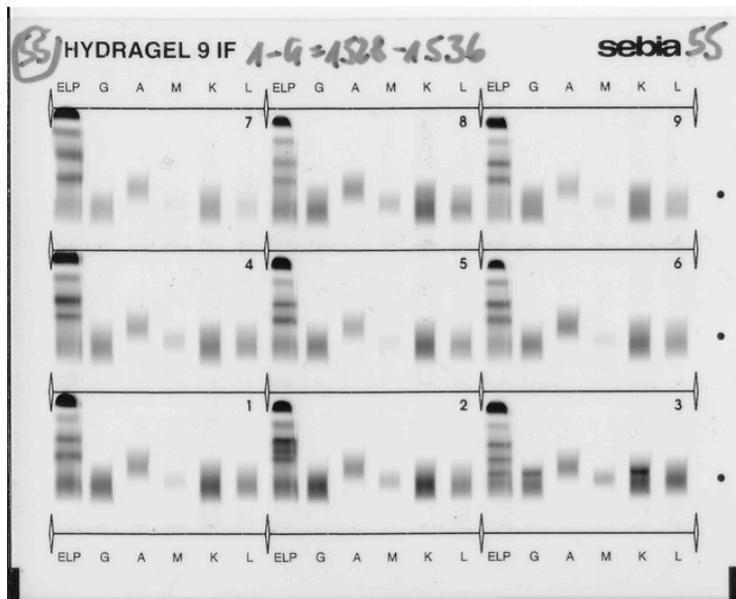


Abbildung 2-4: Immunfixationsgel mit neun Analysen. Eine einzelne Analyse besteht aus einer kompletten Elektrophorese (ELP), den jeweiligen Immunglobulinen G (G), A (A), M (M) und den Leichtketten Kappa (K) und Lambda (L).

2.2.3.2 Protokoll: Bestimmung von Immunglobulinen

Zur Probenpräparation wurde für die Immunglobulin G-Spur 20 µl Serum mit 100 µl Diluent, für die restlichen Immunglobulin-Spuren 20 µl Serum mit 40 µl Diluent gemischt. Auf die nummerierten Applikatoren wurden von den vorbereiteten Seren jeweils 10 µl pipettiert und im Hydrasys (SEBIA, Lisses, Frankreich) 5 Minuten in feuchter Kammer inkubiert. Das abgeblottete Immunfixationsgel (Hydragel) wurde luftblasenfrei aufgelegt und die inkubierten Applikatoren in den Applikatorrahmen einhängt. Nach Beendigung der vom Hydrasys durchgeführten Trennung der Immunglobuline wurde die 9IF Standard-Maske aufgelegt und je 15 µl Antiserum und 20 µl Fixateur einpipettiert. Nach der Inkubation wurden die überschüssigen Antiseren mit dem Filterpapierkamm abgesaugt und nach erneuter Inkubation von 1 Minute mit einem dicken Filterpapier das Gel abgeblottet. Zunächst wurde das Gel getrocknet und anschließend im Färbehälter mit dem Färbeprogramm des Hydrasys gefärbt.

2.2.4 Kapillar-Elektrophorese

2.2.4.1 Messprinzip

Die im Serum befindlichen Proteine können mittels der Serum-Elektrophorese im elektrischen Feld nach den Unterschieden ihrer Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt werden. Da sich die normale Aufteilung der Proteine bei einer Entzündung oder einer pathologischen Vermehrung von Proteinen verändert, können diese dann sichtbar gemacht werden. Bei der Kapillar-Elektrophorese können acht Proben gleichzeitig gemessen werden, da der Capillarys 2 (SEBIA, Lisses, Frankreich) acht parallele Kapillaren besitzt. Jede Probe wird mit Puffer verdünnt und an der anodischen Seite der Kapillare eingebracht. Nun wird eine Spannung von ca. 8.000 V angebracht und die Proteine wandern je nach ihrer Ladung und Mobilität unterschiedlich schnell zur kathodischen Seite. Hier befindet sich ein Fotometer, welches bei 200 nm die Proteine detektiert. Die gemessenen Extinktionen werden dann vom Gerät in ein Elektropherogramm eingetragen. Anschließend werden die Kapillaren mit einer Waschlösung gereinigt und stehen für eine weitere Messung bereit.

2.2.4.2 Erstellung eines Elektropherogramms

Die zu messende Serumprobe wurde auf nachträglich geronnenes Material untersucht und in das Probenrack für die Kapillar-Elektrophorese gestellt. Die Messung erfolgte mit dem Gerät Capillarys 2 der Firma SEBIA. Der Einzug in den Capillarys 2 und die Probenpipettierung erfolgte automatisch. Nach Beendigung der Messung wurden die Ergebnisse an die Auswertungssoftware „CAPILLARYS“ (SEBIA, Lisses, Frankreich) übermittelt. Nach Kontrolle der korrekten Bestimmung der Globulin-Fractionen wurden die Ergebnisse ausgedruckt.

2.2.5 Differentialblutbild

2.2.5.1 Messprinzip

Die Messung des Differentialblutbilds erfolgt mittels einer Volumen-Conduktivitäts-Streulichtmessung (VCS, Coulter-Prinzip), die Hämoglobin-Messung erfolgt photometrisch nach der Lyse der Erythrozyten.

Die Zählung der Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt zeitgleich in einem Messbad. Die Erythrozyten werden in einem Fenster zwischen 36 und 360 fl und die Thrombozyten zwischen 2 und 20 fl gezählt. Die Leukozyten werden nach der Erythrolyse im Messbad in einem Fenster von 35 bis 450 fl gezählt.

Die Hämoglobin-Messung erfolgt photometrisch bei 525 nm. Das in der Lyse freigesetzte Hämoglobin wird in Cyanhämoglobin überführt dann gemessen. Die Ergebnisse der Hämoglobinkonzentration dienen zusammen mit Erythrozytenzahl und dem Einzelvolumen der Berechnung des Hämatokrits und der Erythrozytenindizes.

Zur Leukozytendifferenzierung werden beim VCS die Zellen im integrierten Durchfluss-Zytometer gemessen. Alle Zellen werden fokussiert in einer leitfähigen Flüssigkeit an einer Durchflusszelle vorbeigeführt. Die Änderung im elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden der Durchflusszelle beim Passieren einer Zelle stellt sich als kurzer Anstieg im Widerstand dar. Die Amplitude dieses Anstiegs ist proportional zum Volumen der gemessenen Zelle und die Anzahl der Amplituden ist der der gezählten Zellen proportional.

Es wird simultan bei den Leukozyten zusätzlich das Volumen (s.o.), die Konduktivität und das Streulicht bestimmt. Die Konduktivität erfasst die intrazellulären Bestandteile mittels Wechselstrom im Radiofrequenzbereich. Das Helium-Neon-Laserlicht wird im Vorwärtslicht an jeder Zelle gestreut und mit den sich daraus ergebenden Informationen zur Zellgranularität und Oberfläche werden die fünf Populationen der Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Neutrophile und Basophile) erfasst. Pro Probe werden 8192 Leukozyten analysiert (Hans D. Bruhn, 2008; Coulter).

2.2.5.2 Bestimmung Blutbild

Die zu messende Blutprobe wurde geschwenkt, auf Gerinnsel kontrolliert und in ein Probenrack des Analysegeräts gestellt. Die Bestimmung erfolgte mit dem LH 750-Analyzer der Firma Beckman-Coulter (Galway, Irland). Der Einzug und die Pipettierschritte erfolgten automatisch, nachdem auf der Benutzeroberfläche des Geräts die Option des Differentialblutbildes ausgewählt wurde. Nach Beendigung der Messung wurden die Ergebnisse ausgedruckt.

2.2.6 Statistik

2.2.6.1 Datenbank

Zur Aufzeichnung der Daten wurden in einer in Microsoft-Access (Microsoft®, Redmond, USA) angelegten Datenbank unter einer neu generierten Patienten-Fall-Nummer als Stammdaten die ID, das Geburtsdatum, der Tag der Blutabnahme und die fortlaufende Nummerierung der Serumprobe eingegeben. Die Daten des Differentialblutbildes und der Serumelektrophorese wurden hinzugefügt. Der Befund der Immunfixation wurde in der jeweiligen monoklonalen Ausprägung eingegeben. Bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie wurden die ermittelten Zellzahlen und Prozente der Zellverteilungen eingepflegt und das jeweilige von der Analysesoftware erstellte Dokument im PDF-Format mit dem Datensatz verknüpft.

2.2.6.2 Auswertung

Primärer Endpunkt der Arbeit war die überzufällige Koprävalenz von MBL und MGUS im untersuchten Patientenkollektiv. Sekundärer Endpunkt war die jeweilige Prävalenz von MGUS und MBL. Die statistischen Analysen erfolgten mit IBM SPSS V19.0.0 (IBM®, New York, USA) und Excel 2011 (Microsoft®, Redmond, USA). Zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde der Student'sche gepaarte t-Test mit zweiseitiger Verteilung durchgeführt. Ein Ergebnis von $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Die Bestimmung der Prävalenz der monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) und der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) als eines der Ziele dieser Arbeit setzt eine sorgfältige Auswahl des Patientenkollektivs voraus. Die zu untersuchenden 1.913 Patienten wurden im Zeitraum Januar 2010 bis Dezember 2011 erfasst. Ausgehend von den Erfahrungen aus unterschiedlichen Studien zu MBL und MGUS (Ghia et al., 2004; Kyle et al., 2006; Landgren et al., 2009b; Rawstron et al., 2002) wurden nur Patienten eingeschlossen, die älter als 50 Jahre alt waren und nicht innerhalb des Onkologischen Zentrums der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (UKE) behandelt wurden. Zusätzlich schloss das Auftreten einer hämato-onkologischen Abrechnungsdiagnose im Zentrallaborsystem die Blutprobe des jeweiligen Patienten für die Untersuchung aus. Weiterhin bestanden die Proben der Patienten aus einer EDTA-Probe und einer dazu passenden Serumprobe, welche nicht älter als sieben Tage war. Es wurden nur Patienten einbezogen, welche in der Routinediagnostik die Referenzwerte von Leukozyten ($11 \times 10^9/L$) und Thrombozyten ($400 \times 10^9/L$) nicht überschritten.

Es wurden 415 Proben aus der Auswertung des primären Endpunktes ausgeschlossen. Bei einem Teil der Patienten waren die Einschlusskriterien zwar erfüllt, die Proben konnten jedoch nicht vollständig untersucht werden. Gründe hierfür waren unzureichende Restvolumen der EDTA- bzw. Serum-Probe nach abgeschlossener Routinediagnostik im UKE, oder bei den EDTA-Proben entstand bei der Präparation eine Akkumulation von Zellen mit den Reagenzien für die FACS-Analyse, welche die Untersuchung unmöglich machte. Bei einem weiteren Teil der Proben ließ, trotz der Ausschlusskriterien, die Serum-Elektrophorese den Rückschluss auf eine ausgeprägte Monoklonalität zu. War dies der Fall, so wurde die Probe keiner Immunfixation unterzogen. Wurde bei der FACS-Analyse das Minimum von 300.000 gezählten Zellen nicht erreicht, wurde die Probe von der Analyse ausgeschlossen. Daraus resultiert das Vorhandensein von Resultaten mit jeweils alleiniger Immunfixation oder FACS-Analyse. Zur Resultatbestimmung wurden die folgenden Untersuchungen angewandt.

3.2 Differentialblutbild und Serum-Elektrophorese

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Blutbildes, welches in der Routinediagnostik erfolgte, wurde bei jeder Probe ein Differentialblutbild erstellt. Lag das Differentialblutbild wieder im Rahmen der laboratoriumsspezifischen Referenzbereiche, so wurde an der Probe eine Immunphänotypisierung durchgeführt.

Der Hämoglobin-Gehalt lag bei allen untersuchten Patienten bei 5,3 – 18,9 g/dl bei einem Mittelwert von 11,8 g/dl. Die Zahl der Thrombozyten lag zwischen 23,6 - 399 x 10⁹/L bei einem Mittelwert von 228,3 x 10⁹/L und die der Leukozyten zwischen 2,84 – 11 x 10⁹/L mit einem Mittelwert von 7,6 x 10⁹/L.

Tabelle 3-1: Geschlechtsspezifische Referenzwerte des Blutbilds (für Erwachsene)

	Männer	Frauen
Erythrozyten	4,5 – 5,9 x 10 ¹² /L	4,1 – 5,1 x 10 ¹² /L
Hämoglobin	14,0 – 17,5 g/dl	12,3 – 15,3 g/dl
Thrombozyten	150 – 400 x 10 ⁹ /L	150 – 400 x 10 ⁹ /L
Leukozyten	3,8 – 11 x 10 ⁹ /L	3,8 – 11 x 10 ⁹ /L
Lymphozyten	1,1 – 3,4 x 10 ⁹ /L	1,1 – 3,4 x 10 ⁹ /L

Bei allen Serum-Proben wurde vor der Immunfixation eine Serum-Elektrophorese durchgeführt, um die Patienten zu identifizieren, deren Werte auf eine ausgeprägte Monoklonalität hinweisen. War dies nicht der Fall, so wurde die Probe einer Immunfixation unterzogen.

Die Auswertung der Serum-Elektrophorese ergab in der Gamma-Fraktion einen Mittelwert von 15,6 % (Range 4,5 – 46,7 %).

Tabelle 3-2: Referenzbereiche für Serumproteine in der Kapillar-Elektrophorese

Serumprotein Fraktion	%
Albumin	55,8-66,1
Alpha 1	2,9-4,9
Alpha 2	7,1-11,8
Beta	8,4-13,1
Gamma	11,1-18,8

3.3 Auswertung der sekundären Endpunkte

3.3.1 Immunfixation

Für die Bestimmung der Prävalenz einer MGUS erfolgte bei 1.528 Serumproben eine Immunfixation. Im Agarosegel wurde hierfür durch Elektrophorese aller Serumproteine, die Fraktionen der Immunglobuline G, A, M und die der Leichtketten Kappa und Lambda dargestellt. Die Auswertung der Resultate erfolgte durch eine optische Einschätzung der im Agarosegel vorhandenen Banden der Serumproteinfraktionen zur Identifikation einer monoklonalen Gammopathie (**Abbildung 3-1**).

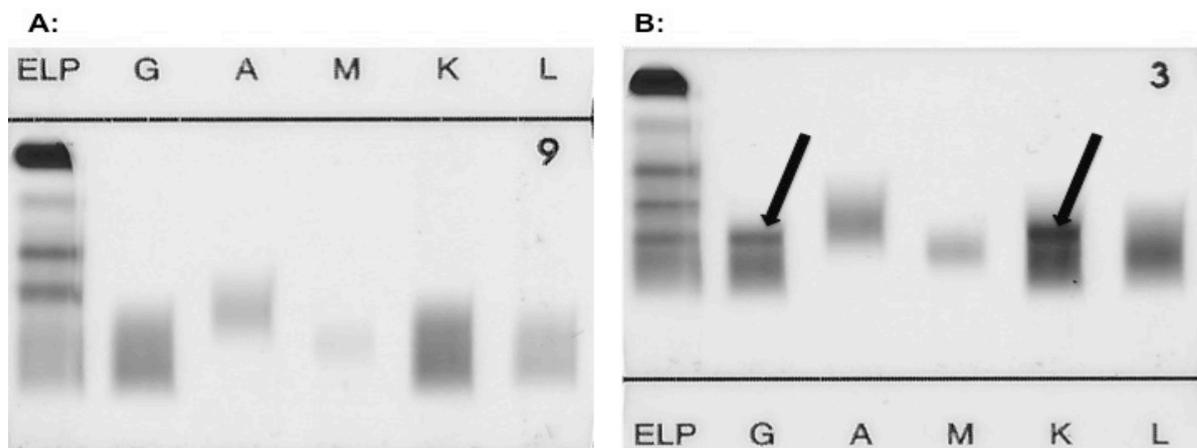


Abbildung 3-1: A) Immunfixation bei einem Gesunden mit Elektrolyse (ELP) aller Serumproteinfraktionen und den Immunglobulinen G, A und M, sowie den Leichtketten Kappa (K) und Lambda (L). B) Immunfixation bei einem Patienten mit MGUS IgG Kappa. Die monoklonale Bande ist deutlich in der ELP und jeweils in IgG und der Leichtkette Kappa (Pfeile) sichtbar.

Bei 154 von 1.528 zu untersuchenden Proben ließ sich in der Immunfixation eine monoklonale Gammopathie feststellen. Das ergab eine Gesamtprävalenz von 10 %. Eine MGUS ließ sich bei 95 von 832 Männern und bei 60 von 696 Frauen nachweisen. Das entsprach einer Prävalenz von 11,4 % bei Männern und 8,6 % bei Frauen. Das mediane Alter bei MGUS-Nachweis lag bei 75 Jahren.

Das Vorkommen der unterschiedlichen monoklonalen Immunglobuline mit ihren Leichtketten bei Männern und Frauen ist in **Abbildung 3-2** dargestellt. Die Verteilung zeigt mit 62,3 % IgG als häufigsten monoklonalen Immunglobulin-Typ gefolgt von IgM mit 24,0 % und IgA mit 13,6 %. Die Leichtkette Kappa überwiegt mit 60,4 % aller Fälle, Lambda kam in 39,6 % der Fälle vor.

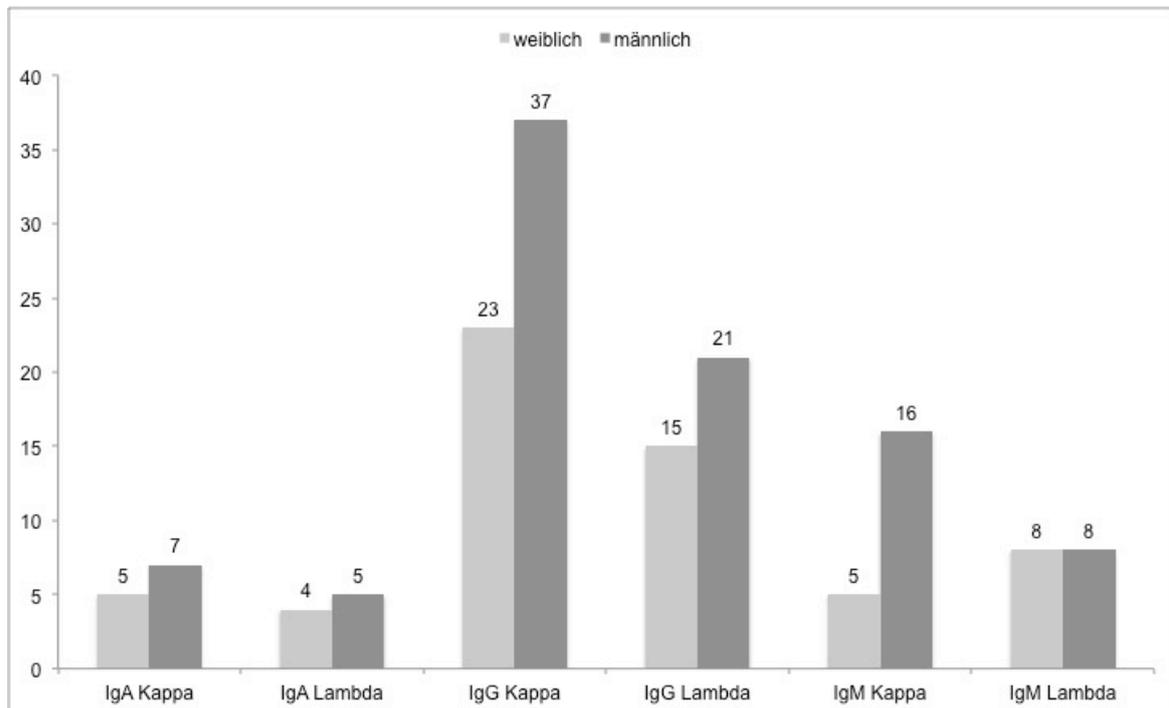


Abbildung 3-2: Verteilung der verschiedenen Immunglobuline mit monoklonalen Banden in der Immunfixation. Immunglobulin G trat am häufigsten auf, gefolgt von Immunglobulin M und A. Das Immunglobulin der Leichtkette Kappa dominierte. Auf der Y-Achse ist die jeweilig Fallzahl dargestellt.

Die Auswertung entsprechend der Alterskohorten zeigt in **Abbildung 3-3**, dass sich mit steigendem Alter häufiger eine MGUS nachweisen lässt. Die Prävalenz liegt bei 6 % bei den 50-Jährigen im Vergleich zu 12 % bei den über 80 Jährigen.

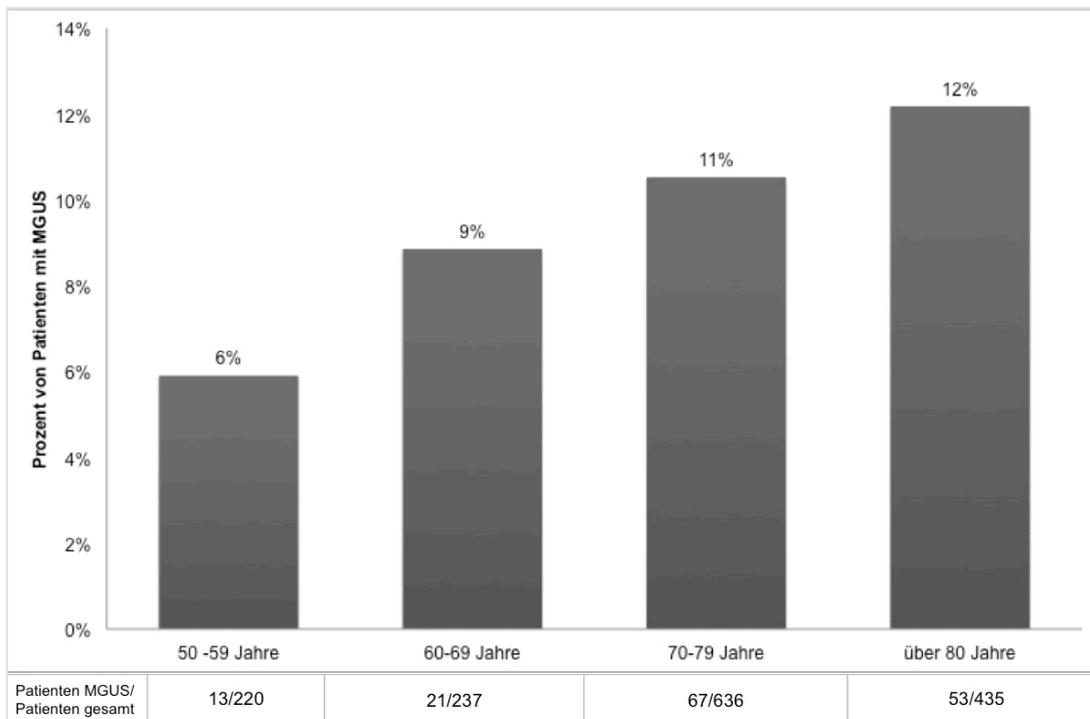


Abbildung 3-3: MGUS Verteilung in den Alterskohorten. Es wird die prozentuale Verteilung in den jeweiligen Altersgruppen dargestellt. Die Anzahl von Patienten mit MGUS und die Gesamtanzahl der Patienten werden dargestellt.

Die Verteilung bei den Geschlechtern in den Altersgruppen in **Abbildung 3-4** macht deutlich, dass eine MGUS bei Männern um 1/3 häufiger auftrat als bei Frauen.

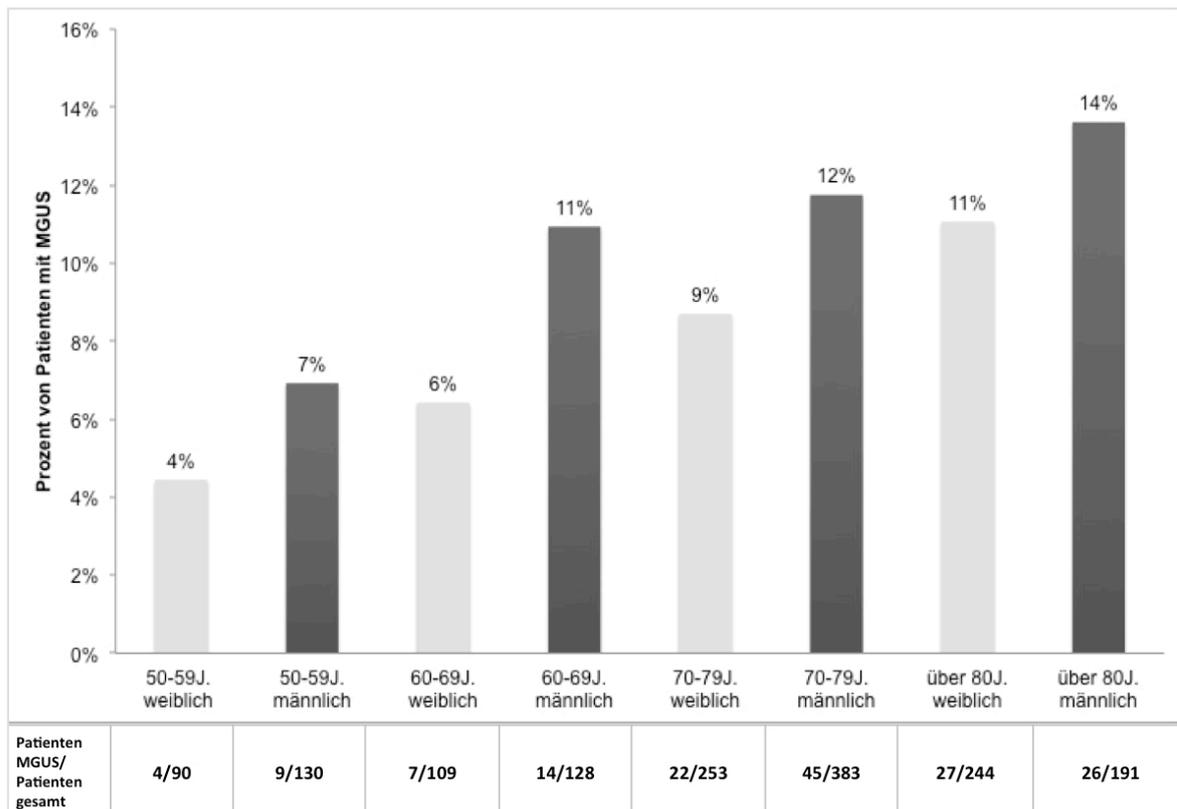


Abbildung 3-4: Geschlechtsspezifische Verteilung von MGUS in den Alterskohorten. Es wird die prozentuale Verteilung in den jeweiligen Alters- und Geschlechtsgruppen dargestellt (helle und dunkle Balken zeigen die Verteilung bei Frauen und Männern). Dargestellt werden die Anzahl von Patienten mit MGUS und die Gesamtanzahl in der untersuchten Kohorte.

3.3.2 FACS-Analyse

Eine Frage der vorliegenden Arbeit war die Prävalenz einer MBL im untersuchten Patientenkollektiv. Die Festlegung einer MBL erfolgte bei jeder EDTA-Probe mittels FACS-Analyse (**Abbildung 3-5**). Dafür wurde das Verhältnis der Kappa/Lambda Leichtketten bestimmt. Lag eine Leichtkettenrestriktion vor (Kappa/Lambda-Ratio $>3:1$ oder $<0,3:1$), wurde von einer MBL bei sonst gesundem Patienten ausgegangen. Im Folgenden wurden 1.657 Patienten auf MBL untersucht. Bei 63 Patienten wurde eine MBL festgestellt. Dies ergab eine Gesamtprävalenz von 3,8 %. Bei 35 von 902 Männern und 28 von 755 Frauen lag die Kappa/Lambda-Ratio über 3,0 bzw. unter 0,3. Die Prävalenz betrug 3,9 % bei Männern und 3,7 % bei Frauen. Das mediane Alter lag bei MBL-Nachweis bei 77 Jahren.

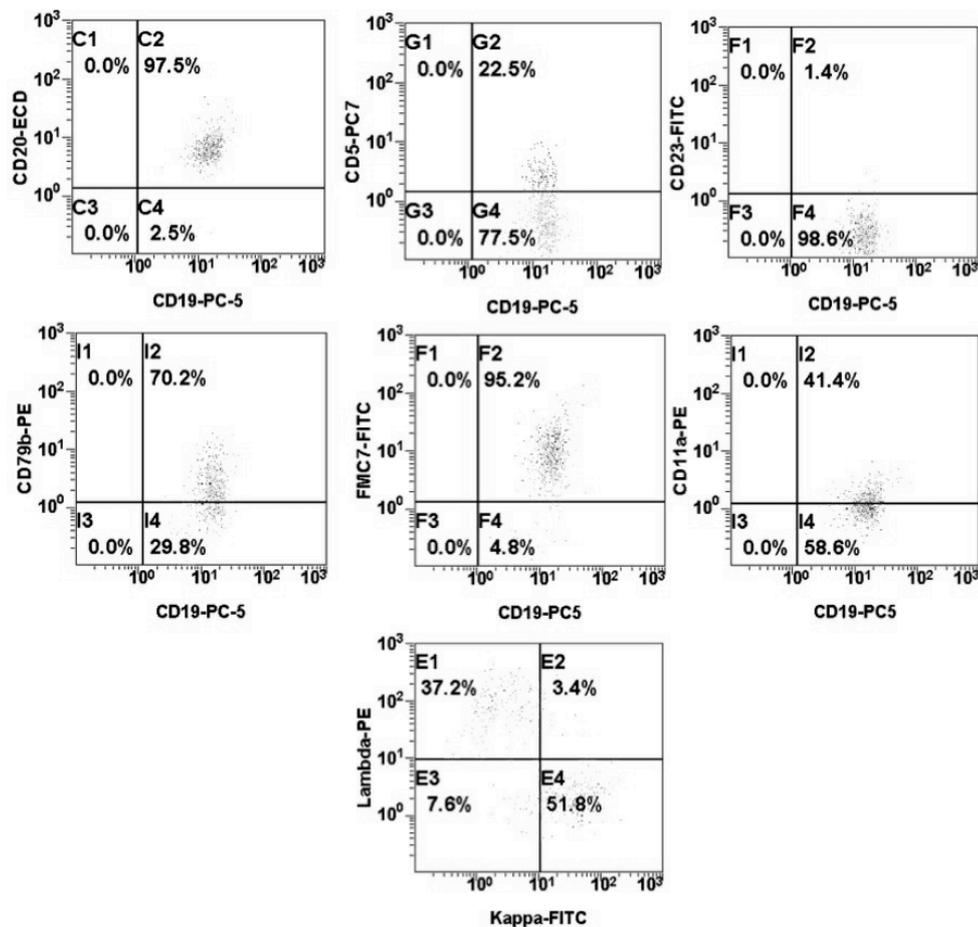


Abbildung 3-5: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse bei einem Patienten mit unauffälligen B-Zellen. Die Verteilung der Antikörper ist wie bei einem Gesunden zu erwarten. Die B-Zellen exprimieren CD20, CD79b, FMC7 und CD11a. Das Verhältnis von Kappa/Lambda Leichtketten liegt bei 1,5.

Mit der Auswertung der FACS-Analysen zeigte sich, dass neben den erwarteten Phänotypgruppen der MBL noch ein weiterer MBL Phänotyp auftrat, der mit dem eines Mantelzell-Lymphoms übereinstimmte (**Abbildung 3-6**). Die einzelnen in der Literatur von der Arbeitsgruppe Nieto et al. zusammengefassten Immunphänotypen der MBL bestehen aus dem Phänotyp der „CLL-like MBL“ (CD5+, CD20(+), CD23+), der „atypischen CLL-like MBL“ (CD5+, CD20++, CD23-) und der „Non-CLL-like MBL“ (CD5-, CD23-) (Nieto et al., 2010a). Die klonalen Zellen des „Mantelzell-Lymphom(MZL)-like MBL“ haben bei völligem Fehlen von CD23 einen Immunphänotyp der CLL (Dunphy and Perkins, 2001; Kilo and Dorfman, 1996).

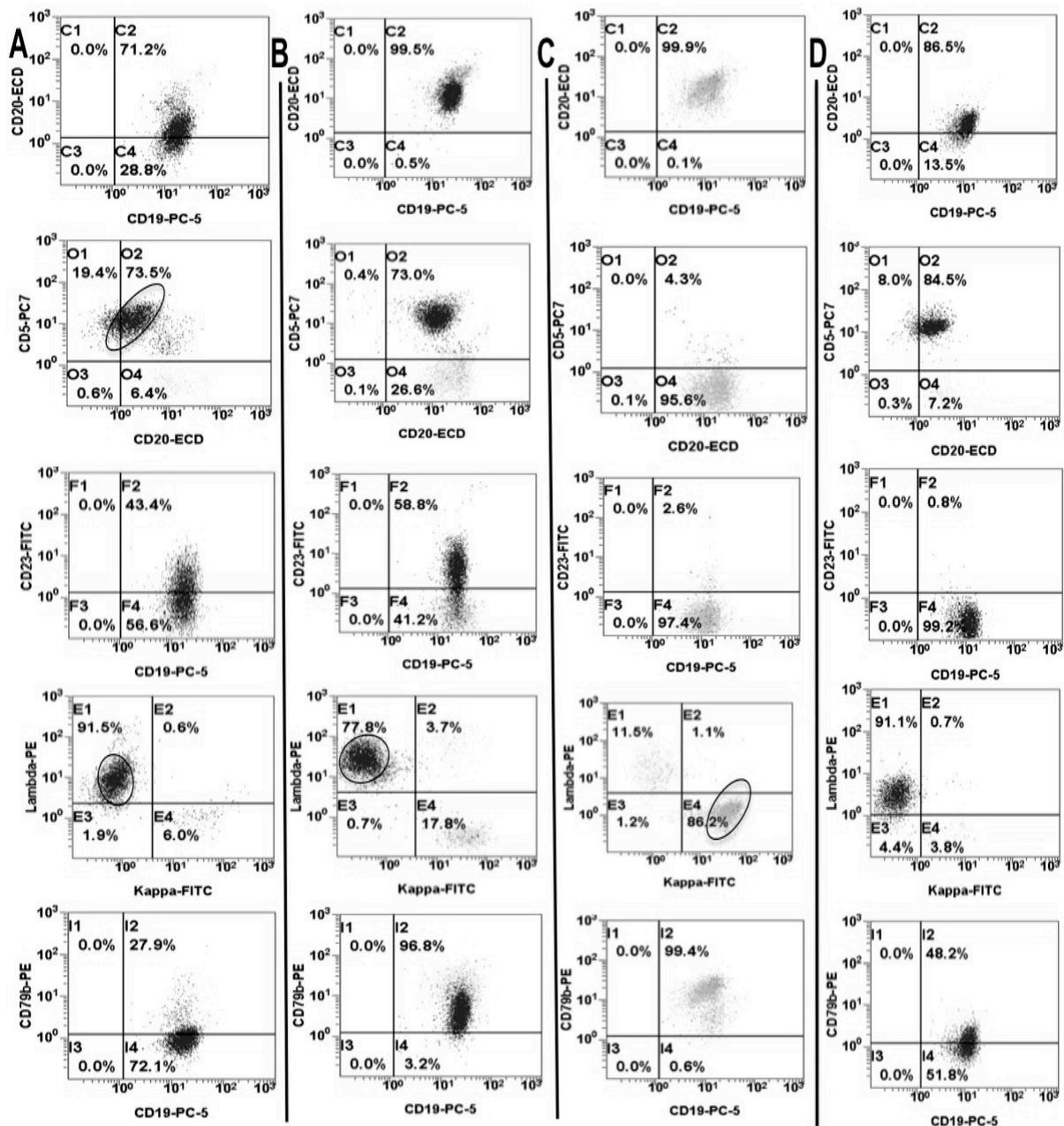


Abbildung 3-6: Darstellung verschiedener Phänotypen von MBL sowie eines Falles einer „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ in der Durchflusszytometrie. A) zeigt den Phänotyp der klassischen „CLL-like MBL“ mit CD20(+), CD5+ (der Kreis markiert den B-Zell-Klon), CD79b- und einer Kappa/Lambda-Leichtketten Ratio von 15:1. B) zeigt den Phänotyp einer „atypischen CLL-like MBL“ mit CD20+, CD5+, CD23(+), CD79b(+) und einer Kappa/Lambda-Leichtketten Ratio von 4:1. C) zeigt den Phänotyp der „Non-CLL-like MBL“ mit der Antikörperverteilung CD20+, CD5-, CD23-, CD79b+ und einer Kappa/Lambda-Leichtketten Ratio von 7,2:1. D) zeigt ein „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ mit der Antikörperverteilung CD20(+), CD5+, CD23-, CD79b-.

Bei zwei Patienten trat eine biklonale MBL auf. Fall Nr.2392 hatte einen Klon mit führender Ausprägung von CD20(+), CD23+, CD5+, FMC7- und CD79b(+). Dieser Klon entsprach somit einer „CLL-like MBL“. Daneben war ein zweiter, schwächerer Klon mit CD20+, CD23-, CD5-, FMC7+, CD79b+ zu sehen, was mit einem „Non-CLL-like MBL“ Phänotyp übereinstimmte.

Fall Nr.1682 wies einen Klon mit dem führenden Immunophänotyp CD20+, CD23-, CD5-, FMC7+, CD79b+ einer „Non-CLL MBL“ auf. Daneben war ein schwächerer Klon vom Phänotyp CD20(+), CD23+, CD5+, FMC7-, CD79b(+), einer „CLL-like MBL“ zu sehen (**Abbildung 3-7**).

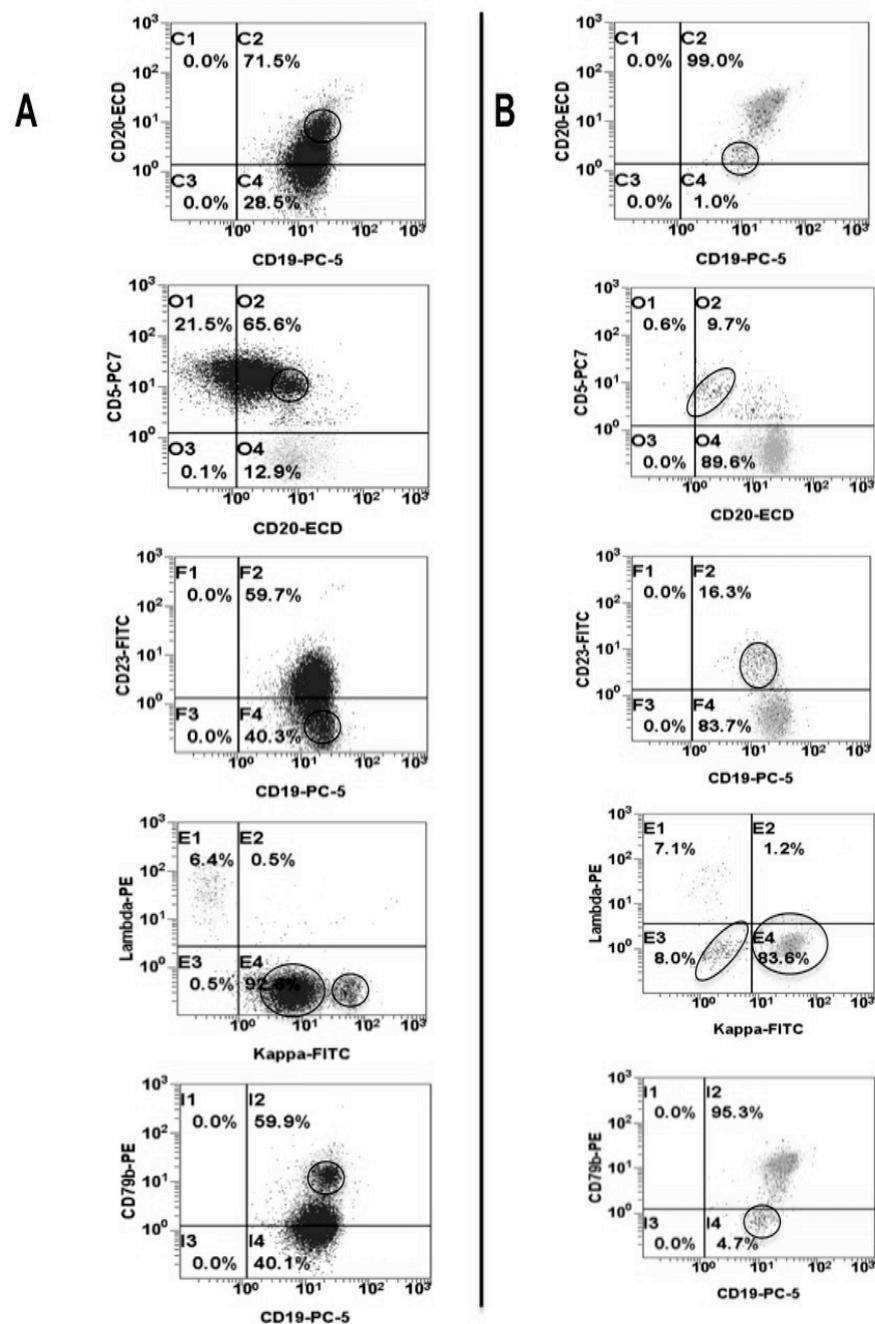


Abbildung 3-7: Fallbeispiele von zwei Patienten mit biklonaler MBL im peripheren Blut. A) zeigt den führenden Klon (großer Kreis bei Kappa/Lambda) mit einem „CLL-like MBL“ Phänotyp. Der zweite, schwächer ausgeprägte Klon (kleiner Kreis) beschreibt den Typ der „Non-CLL-like MBL“. B) zeigt den führenden Klon (großer Kreis bei Kappa/Lambda) vom Phänotyp einer „Non-CLL-like MBL“. Der kleine Kreis umgibt jeweils den zweiten vorhandenen B-Zell Klon einer „CLL-like MBL“.

Bei den Phänotyp-Gruppen „Non-CLL-like“, „atypische CLL-like“, „CLL-like MBL“ und „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ zeigt sich eine überwiegende männliche Dominanz mit einer Männer:Frauen Ratio von 0,6 bis 4,5 (**Abbildung 3-8**).

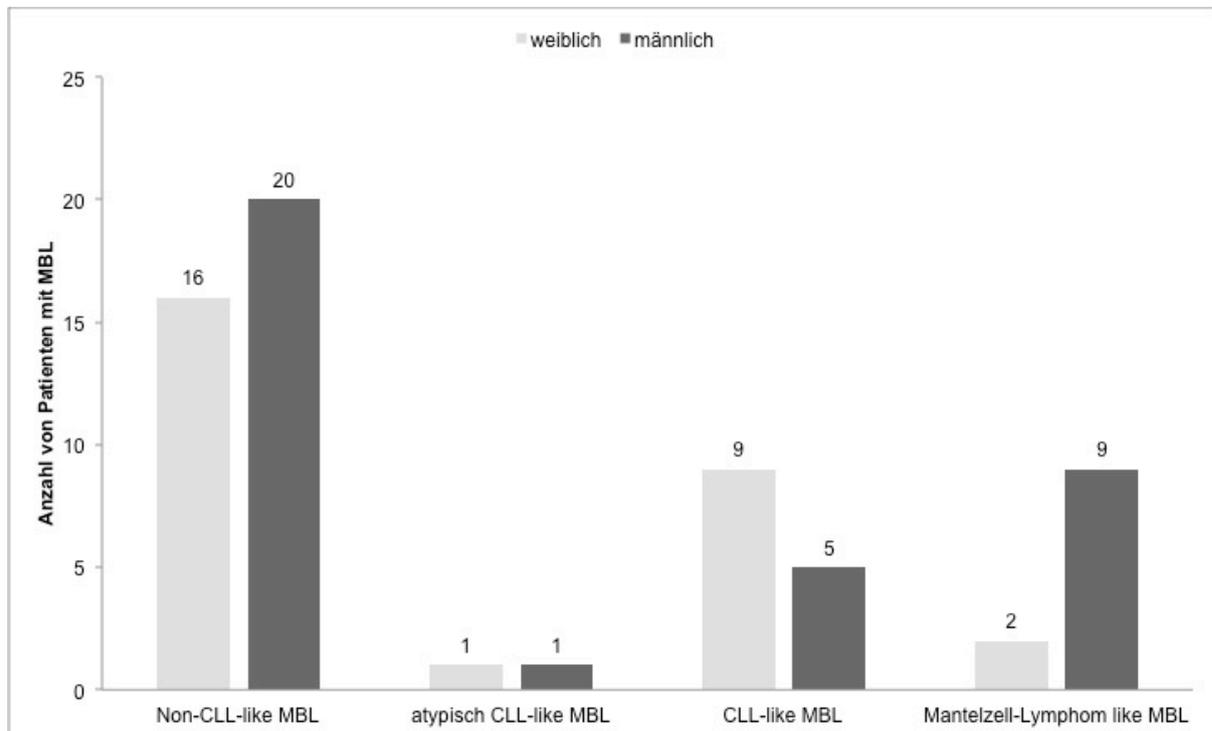


Abbildung 3-8: Geschlechtsspezifische Verteilung in den Phänotyp-Gruppen „Non-CLL-like“, „atypische CLL-like“, „CLL-like MBL“ und „Mantelzell-Lymphom like MBL“.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen zeigte, dass der „Non-CLL-like“ Typ fast dreimal häufiger als der klassische „CLL-like“ Typ vorkam (36 Fälle „Non-CLL-like“ bzw. 14 Fälle „CLL-like“). Die Verteilung der Immunglobulin-Leichtketten zeigte ein häufigeres Auftreten von Immunglobulinen der Kappa Leichtkette (**Tabelle 3-3**).

Tabelle 3-3: Verteilung der MBL Phänotypgruppen im Gesamtkollektiv. Der „Non-CLL-like“ Typ tritt häufiger auf als der klassische „CLL-like“ Typ. Das Verhältnis Männer:Frauen ist bei allen Subtypen sehr ähnlich. Bei den Immunglobulin-Leichtketten dominiert in allen vier Subgruppen Kappa.

Phänotyp der MBL	Anzahl	Alter (Jahre)	Geschlecht (Ratio)	Leichtketten (Ratio)
„CLL-like“	14	70-91	5m, 9w (0,6:1)	12 Kappa, 2 Lambda (6:1)
„atypische CLL-like“	2	71-83	1m, 1w (1:1)	1 Kappa, 1 Lambda (1:1)
„Non-CLL-like“	36	58-92	20m, 16w (1,2:1)	31 Kappa, 5 Lambda (6,2:1)
„Mantelzell- Lymphom-like MBL“	11	61-89	9m, 2w (4,5:1)	7 Kappa, 4 Lambda (1,8:1)

Die Prävalenz von MBL stieg mit zunehmendem Alter im sonst hämatologisch „gesunden“ Patientenkollektiv. So lag sie bei der Gruppe der ≥ 50 -Jährigen bei 0,8 % und bei der Gruppe der ≥ 80 -Jährigen bei 5 %. Das geschlechtsspezifische Auftreten von MBL in den unterschiedlichen Altersgruppen zeigte ab der Gruppe der 60-69 Jährigen eine männliche Dominanz, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist (Rawstron et al., 2002). **Abbildung 3-9** und **Tabelle 3-4** zeigen die Verteilung der MBL innerhalb der verschiedenen Altersgruppen bei Männern und Frauen getrennt:

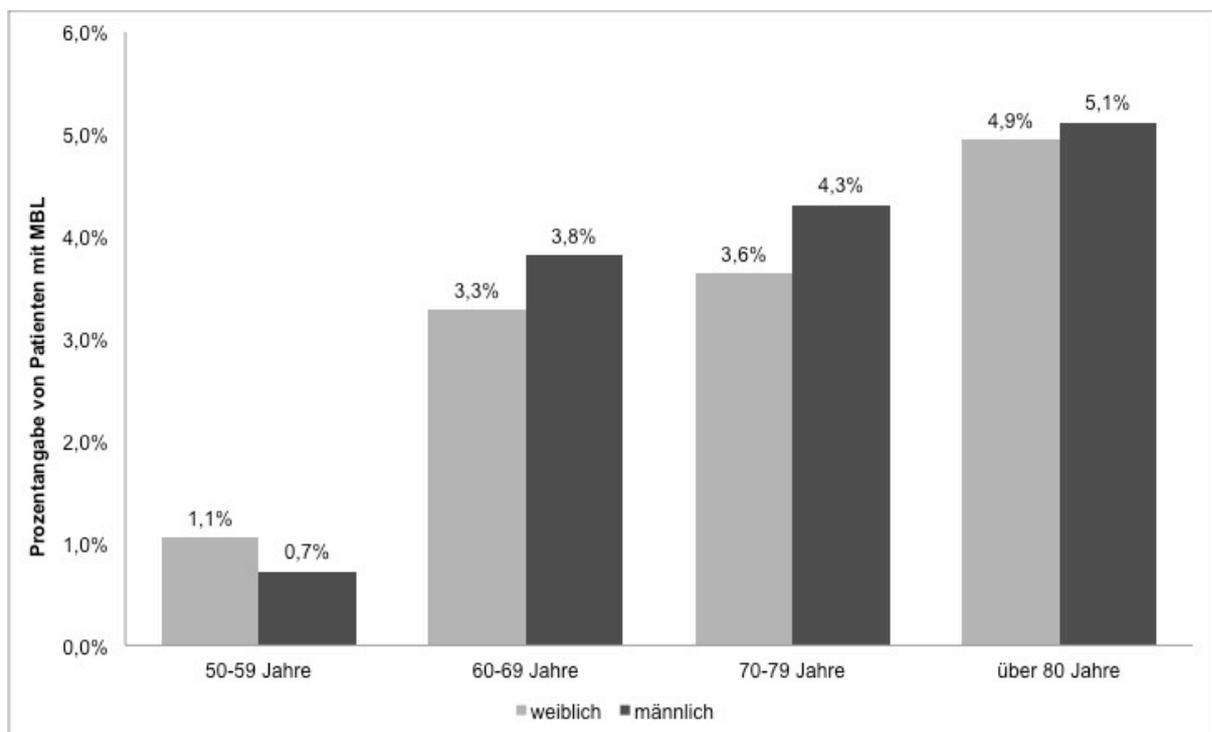


Abbildung 3-9: Prävalenz von MBL in der gesamten untersuchten Kohorte nach Altersgruppen. Es lässt sich ein Anstieg der Prävalenz mit steigendem Alter feststellen. In fast allen Altersgruppen dominieren Männer (Ausnahme: 50-59-Jährige).

Tabelle 3-4: Auftreten (absolut) der unterschiedlichen Immunphänotypen bei Patienten mit Monoklonalität in den einzelnen Alterskohorten. In den einzelnen Alterskohorten dominiert der „Non-CLL-like“ Phänotyp gegenüber dem klassischen „CLL-like“ Phänotyp.

Altersgruppe: 50-59 Jahre			
Phänotyp	Anzahl / Gesamt	Anzahl Männlich / Gesamt	Anzahl Weiblich / Gesamt
„CLL-like MBL“	0		
„atypische CLL-like MBL“	0		
„Non-CLL-like MBL“	2/234	1/139	1/95
„Mantelzell Lymphom like MBL“	0		
60-69 Jahre			
Phänotyp	Anzahl / Gesamt	Anzahl Männlich / Gesamt	Anzahl Weiblich / Gesamt
„CLL-like MBL“	0		
„atypische CLL-like MBL“	0		
„Non-CLL-like MBL“	7/253	3/131	4/122
„Mantelzell Lymphom like MBL“	2/253	2/131	0
70-79 Jahre			
Phänotyp	Anzahl / Gesamt	Anzahl Männlich / Gesamt	Anzahl Weiblich / Gesamt
„CLL-like MBL“	8/693	4/418	4/275
„atypische CLL-like MBL“	1/693	0	1/275
„Non-CLL-like MBL“	12/693	9/418	3/275
„Mantelzell Lymphom like MBL“	7/693	5/418	2/275
über 80 Jahre			
Phänotyp	Anzahl / Gesamt	Anzahl Männlich / Gesamt	Anzahl Weiblich / Gesamt
„CLL-like MBL“	6/477	1/214	5/263
„atypische CLL-like MBL“	1/477	1/214	0
„Non-CLL-like MBL“	15/477	7/214	8/263
„Mantelzell Lymphom like MBL“	2/477	2/214	0

3.4 Resultate des primären Endpunktes

3.4.1 Auswertung der Koprävalenz von MBL und MGUS

Ziel der Arbeit war es, zu analysieren, ob eine MBL und MGUS überzufällig häufig parallel auftreten. Die Auswertung der 1.494 Patienten ergab den Nachweis einer MBL bei 59 (4 %) sowie einer MGUS bei 152 Patienten (10,2 %). Eine MGUS und eine MBL in Koprävalenz wurde bei 6 Patienten vorgefunden. Dies ergab eine Prävalenz von 0,4 % mit einem Korrelationskoeffizient von -0,0006702 ($p=0,9991$). Das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS war somit nicht überzufällig häufig.

Bei den sechs Patienten, welche eine Koprävalenz vorwiesen, war die Männer:Frauen Ratio bei 2:1 und das Alter lag zwischen 69-88 Jahren. Die MBL setzte sich in drei Fällen aus einer „Non-CLL-like MBL“ und in zwei Fällen aus einer „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ zusammen. In einem Fall (Nr. 2392) trat eine biklonale MBL mit einem „Non-CLL-like MBL“ und einem „CLL-like MBL“ Klon auf. In fünf Fällen fand sich eine Kappa-Leichtketten Restriktion. Die Paraproteine der MGUS verteilen sich auf drei Patienten mit IgM, zwei mit IgG und einem mit IgA. Die Leichtketten waren in drei Fällen Kappa und in drei Fällen Lambda (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Verteilung der MBL-Phänotypen und MGUS-Immunglobuline beider Phänomene.

Patient	Geschlecht / Alter (Jahre)	Phänotyp mit Leichtkette/Paraprotein			
		„CLL-like MBL“	„atypische CLL-like MBL“	„Non-CLL-like MBL“	„Mantelzell-Lymphom-like MBL“
Fall Nr. 66	M / 69				Kappa IgG Lambda
Fall Nr. 725	W / 88			Kappa IgG Kappa	
Fall Nr. 934	M / 74				Lambda IgM Lambda
Fall Nr. 948	M / 81				Kappa IgM Kappa
Fall Nr. 2022	M / 74			Kappa IgM Kappa	
Fall Nr. 2392	W / 72	Kappa IgA Lambda		Kappa IgA Lambda	

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse mit Beantwortung der Fragestellung

Im ausgewählten Patientenkollektiv wurden immunphänotypische und immunfixative Untersuchungen durchgeführt. Bei einem Teil der Proben stand nach Durchführung der Routinediagnostik nicht mehr genug Material für eine der beiden Hauptuntersuchungen zur Verfügung und bei der Immunphänotypisierung war teilweise nicht die erforderliche Zellanzahl im Material vorhanden. Dies führte nicht nur zu einer unterschiedlichen Anzahl von Patienten in den beiden Gruppen der Hauptuntersuchungen (FACS-Analyse und Immunfixation), sondern auch zu einer kleineren Anzahl von Patienten in der Gruppe für den primären Endpunkt.

Die in der Einleitung gestellten Fragen können folgendermaßen beantwortet werden:

- **Gibt es ein überzufällig häufiges gemeinsames Auftreten von MBL und MGUS im selben Patienten?**

Von 1.494 untersuchten Patienten trat bei 59 Patienten eine MBL und bei 152 Patienten eine MGUS auf. Von diesen hatten sechs Patienten eine Koprävalenz. Dies ergab eine Koprävalenz von 0,4 % mit einem Korrelationskoeffizient von -0,0006702 ($p=0,9991$). Das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS war somit nicht überzufällig häufig.

- **Wie groß ist die altersabhängige Prävalenz von MBL in dem Patientenkollektiv?**

Die Prävalenz lag bei 3,8 % (63 von 1.657 Individuen) im untersuchten Patientenkollektiv. Das mediane Alter bei MBL-Nachweis lag bei 77 Jahren.

- **Wie groß ist die altersabhängige Prävalenz von MGUS in dem Patientenkollektiv?**

Die Prävalenz lag bei 10,0 % (154 von 1.528 Individuen) im untersuchten Patientenkollektiv. Das mediane Alter lag bei MGUS-Nachweis bei 75 Jahren.

- **Sollte bei einem Nachweis einer positiven Immunfixation die Diagnostik um eine immunphänotypische Analyse im Sinne eines Screenings erweitert werden?**

Da das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS nicht überzufällig häufig war, kann daraus nicht die Empfehlung eines erweiterten Screenings abgeleitet werden.

4 Diskussion

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie der westlichen Welt und gehört wie das Multiple Myelom (MM) zum Formenkreis der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (Hernandez et al., 1995). Die Vorstufen MBL und MGUS weisen bei dem Erkrankungsalter, der Geschlechterverteilung und im Differentialblutbild Ähnlichkeiten auf. Auf Grund dessen, und der Zugehörigkeit zu B-Zell-Erkrankungen könnte ein pathogenetischer Zusammenhang beider Phänomene vermutet werden. Die Hypothese, dass beide Vorstufen in Assoziation stehen, wurde bisher nicht systematisch untersucht.

Die vorliegende Arbeit sollte zum Einen die Auftretenshäufigkeit von MBL und MGUS in dem untersuchten Patientenkollektiv darstellen und zum Anderen klären, ob eine Koprävalenz, und damit eine Assoziation zwischen MBL und MGUS besteht. Dies könnte helfen, die Zusammenhänge zwischen MBL und MGUS besser zu verstehen und eventuelle Risikofaktoren zu identifizieren, welche die Progression in das Vollbild einer Leukämie vorhersagen. Die Identifikation von Risikofaktoren könnte Patienten im Hochrisikobereich durch den Einsatz einer frühzeitigen Therapie helfen (McMaster and Landgren, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten jedoch nicht nachweisen, dass das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS überzufällig häufiger war. Eine Assoziation konnte somit mit den in der Arbeit genutzten Methoden nicht nachgewiesen werden.

In den nachfolgenden Abschnitten werden zuerst die beiden Vorstufen MBL und MGUS mit ihren Ausprägungen im Patientenkollektiv bewertet. Anschließend wird auf die identifizierten Patienten mit einer Koprävalenz von MBL und MGUS eingegangen.

4.1 Prävalenz von MBL und MGUS im Patientenkollektiv

4.1.1 MBL

MBL entspricht einem monoklonalen Vorkommen von B-Lymphozyten im peripheren Blut als Vorstufe einer CLL in sonst gesunden Individuen (Marti et al., 2003). Mit Hilfe einer Durchflusszytometrie wurden Patienten mit einer MBL detektiert. In verschiedenen Studien wurden die Auswahl der Antikörper, welche man zur Bestimmung einer MBL benötigt, beschrieben. Für die vorliegende Arbeit wurde die von Rawstron et al. getroffene Auswahl der Antikörper modifiziert (Nieto et al., 2010a; Rawstron et al., 2002).

Bei 3,8 % (63 von 1.657) der untersuchten Individuen lag eine Leichtkettenrestriktion und einer der MBL-Phänotypen vor. Bei nur 0,8 % (14 von 1.657) der untersuchten Individuen lag in der vorliegenden Arbeit ein „CLL-like MBL“ Phänotyp vor. Hierzu wird in unterschiedlichen Studien eine Prävalenz in der Bevölkerung ab 3,5 % beschrieben (Rawstron, 2009). Der Anteil der Patienten mit „Non-CLL-like MBL“ lag in unserer Untersuchung bei 2,2 % (36 von 1.657) und war somit höher als der von Rawstron et al. beschrieben (Rawstron et al., 2002). Bei 0,7 % (11 von 1.657) der Individuen wurde eine „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ (CD5+, CD23-) nachgewiesen. Werden alle Fälle, welche nicht dem „CLL-like MBL“-Phänotyp entsprechen als „Non-CLL-like MBL“ zusammengefasst, so hatten 2,9 % (49 von 1.657) der hier untersuchten Individuen diesen Phänotyp.

Die Einteilung der Phänotypen ist in den unterschiedlichen Studien nur für die „CLL-like MBL“ mit der Antikörperausprägung CD5+, CD20(+), CD23+ sicher beschrieben. Bei den Phänotypen der „atypischen CLL-like MBL“ und „Non-CLL-like MBL“ wird in den unterschiedlichen Studien kein einheitlicher Ansatz genutzt. Es wird „Non-CLL-like MBL“ beschrieben, die CD5- und CD5+ MBL enthält (Marti et al., 2005) und in weiteren Studien zusätzlich eine „atypische CLL-like MBL“ die hauptsächlich als Antikörperausprägung CD5+, CD20++, CD23+ beinhaltet. Da nicht jede Studie die gleichen Antikörperkombinationen nutzte, wurde jeweils eine etwas unterschiedliche Definition vorgenommen (Nieto et al., 2010a). Ein

Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Studien ist im Hinblick auf die Antikörperkombinationen somit annäherungsweise möglich. Der Vergleich der untersuchten Individuen dieser Arbeit mit anderen Studien wie Rawstron et al. (Rawstron et al., 2002) ist möglich, da ähnliche Einschlusskriterien verwendet wurden.

Nieto et al. fassten in einer Studie nicht nur die „atypischen-“ und „Non-CLL-like MBL“ zusammen, sondern auch die Fälle mit einem MZL-Phänotyp (CD5+, CD23-) und weitere nichtklassifizierbare Phänotypen (Nieto et al., 2010b). Die 2,9% der Individuen mit „Non-CLL-like MBL“ der vorliegenden Arbeit liefern vergleichbare Ergebnissen mit dieser Studie, welche ein vermehrtes Auftreten der „Non-CLL-like MBL“ beschreibt.

Der Grund für die hohe Zahl an „Non-CLL-like MBL“ Fällen liegt möglicherweise am Setting der Arbeit. Fazi et al. postulieren eine mögliche Verbindung von „Non-CLL-like MBL“ mit einem „reaktiven“ Immunsystem (Fazi et al., 2011). Diese „Non-CLL-like MBL“ ist jedoch nicht über einen längeren Zeitraum nachzuweisen. Da Krankenhaus-basierte Populationen unter Umständen ein „hochreguliertes“ Immunsystem besitzen, könnte dies ein Grund für die hier beobachtete Anzahl der „Non-CLL-like MBL“ Fälle sein.

Die bei unserer Untersuchung detektierten Individuen der „Non-CLL-like MBL“ zeigen eine klare Dominanz des männlichen Geschlechts und eine Verteilung zugunsten der Kappa Leichtkette. Bei den Fällen der „CLL-like MBL“ war die Geschlechtsverteilung eher ausgeglichen mit einer Favorisierung des weiblichen Geschlechts. Idealerweise hätte man der Literatur nach eine Dominanz des männlichen Geschlechts erwartet. Bei der Verteilung der Leichtketten dominiert jedoch „literaturkonform“ Kappa (Fazi et al., 2011).

In den Alterskohorten steigt bei allen Phänotypen das Auftreten mit zunehmendem Alter. Für die Gruppe der „Non-CLL-like MBL“ gibt es unterschiedliche Studienergebnisse in der Literatur. Es wird zum Einen eine Zunahme der Fälle mit steigendem Alter beobachtet (Nieto et al., 2010b) und zum Anderen keine Abhängigkeit zum Alter beschrieben (Ghia et al., 2004).

Rawstron et al. beschreiben eine steigende Prävalenz mit höherem Alter von 2,1 % bei 40 – 60 Jährigen bis 8,2 % bei Männern und 7,3 % bei Frauen in der Gruppe der 70 - 79 Jährigen (Rawstron et al., 2002). Daher wurde im Setting in der vorliegenden Arbeit eine höhere Anzahl an Patienten für die älteren Kohorten festgelegt. Die Eingangs geplante Anzahl von untersuchten Patienten in den älteren Kohorten reichte wegen der Ein- und Ausschlusskriterien in der vorliegenden Arbeit nicht aus. In der Gruppe der 70 – 79 Jährigen wurden 275 Frauen und 418 Männer untersucht. In der Gruppe der über 80 Jährigen waren es 263 Frauen und 214 Männer. Geplant waren in jeder Gruppe jeweils 400 Individuen. Daher ist es anzunehmen, dass bei größerer Patientenzahl Äquivalent zu Rawstron et al. eine höhere Prävalenz von MBL in diesen Gruppen erfolgt wäre.

Zu den Stärken bei der vorliegenden Arbeit zählt, dass die Methode der Immunphänotypisierung mit 10 unterschiedlichen Antikörpern und einer Zellzahl von 300.000 Events im Vergleich mit anderen Studien eine hohe Sensitivität besitzt (Nieto et al., 2010a). Für eine noch bessere Darstellung mit 500.000 Events pro Analyse wäre bei jeder Untersuchung eine minimale Menge von 1 ml EDTA Blut nötig gewesen. Dies war nicht bei allen Patienten realisierbar, so dass man mit 300.000 Events einen guten Kompromiss gefunden hat.

4.1.2 MGUS

Eine MGUS wird im Serum durch Identifikation eines monoklonales Immunglobulins nach den Kriterien der Internationalen Myelom-Arbeitsgruppe bestimmt (Myeloma Working Group, 2003). Die als Vorstufe vom Multiplen Myelom (MM) geltende asymptotische Form weist das Vorkommen eines monoklonalen Immunglobulins auf, erfüllt aber nicht die Diagnosekriterien eines MM.

Es konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von MGUS in der vorliegenden Arbeit bei 10 % (154 von 1.528 Individuen) liegt. Die in der Literatur beschriebene

Prävalenz liegt bei 3 % in Populations-basierten Studien (Kyle et al., 2006). Die von McMaster und Landgren 2010 erstellte Zusammenfassung zeigt unter anderem eine Studienübersicht von MGUS-Prävalenzen (McMaster and Landgren, 2010). Es wird gezeigt, dass bei einem Krankenhaus-basierten Studiendesign die Prävalenz von MGUS höher ist als bei einem Populations-basiertem Studiendesign. Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Prävalenz höher als in der allgemeinen Population beschrieben.

In Analogie zur Konklusion der Autoren in der Arbeit von McMaster und Landgren könnte ein Grund hierfür im Studiendesign liegen, da es sich bei Individuen aus dem Krankenhaus um eine selektivere Population handelt. Bei 62,3 % lag ein monoklonales Immunglobulin G (IgG) vor, gefolgt von IgM mit 24 % und IgA mit 13,6 %. Diese Werte sind annähernd entsprechend einer Studie von Eisele et al. (Eisele et al., 2012). Mit dem Unterschied, dass in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis von IgM und IgA nicht gleich ausfiel, denn IgM dominierte. Es zeigte sich ein Anstieg der Prävalenz mit steigendem Alter und Dominanz von männlichen Individuen mit MGUS, was mit bereits beschriebenen Ergebnissen übereinstimmte (Kyle et al., 2006).

Ein Kritikpunkt ist die optische Auswertung der Gele durch einen Untersucher. Eine Möglichkeit zur Quantifizierung und Objektivierung der Daten, wie sie durch das Auslesen der Gele durch einen Elektrophorese-Scanner möglich gewesen wären, bestand nicht. Die analytische Spezifität und Sensitivität ist beim visuellen Verfahren jedoch besser und verschiedene Arbeitsgruppen haben die gleiche Strategie verfolgt (Aarau, 2014; Kyle et al., 2006; Landgren et al., 2009b).

4.2 Koprävalenz von MBL und MGUS im Patientenkollektiv

Ziel der Untersuchung war es, eine überzufällig häufige Koprävalenz zwischen MBL und MGUS aufzudecken. Die Art der beiden B-Zell-Erkrankungen und ihre ähnlichen quantitativen Merkmale ließen die Hypothese eines gemeinsamen pathogenetischen Prinzips von MBL und MGUS zu. Dieser konnte bisher jedoch

nicht nachgewiesen werden. Es gibt vereinzelte Berichte über Patienten, bei welchen eine Koprävalenz nachgewiesen wurde (Matos et al., 2012; Shim et al., 2007). Daten von größeren Kohorten oder prospektive Studien stehen aber noch aus (McMaster and Landgren, 2010). Vogt und Marti haben die hypothetische Beziehung verschiedener B-Zell-Erkrankungen beschrieben, und einen gemeinsamen Kontext zwischen MBL und MGUS auf Ebene der klinischen Symptome und biologischen Merkmalen erörtert (**Abbildung 4-1**) (Vogt and Marti, 2007). Auch McMaster und Caporaso verweisen auf die Wichtigkeit der Identifizierung derjenigen Kohorte, welche das größte Risiko der Progression von MGUS und MBL in eine maligne Erkrankung besitzt (McMaster and Caporaso, 2007). Die Theorie der chronischen Antigen-Stimulation, welche als ein Auslöser einer CLL diskutiert wird, steht ebenso für das MM im Raum (Landgren and Kyle, 2007; Nieto et al., 2010b). Es ist jedoch nicht außer Acht zu lassen, dass aktuelle Studien diese Theorie hinterfragen (Matos et al., 2012). Trotz alledem sind die MBL und MGUS als Vorläufer der CLL bzw. des MM beschrieben (Landgren et al., 2009b; Landgren et al., 2009a) und anerkannt.

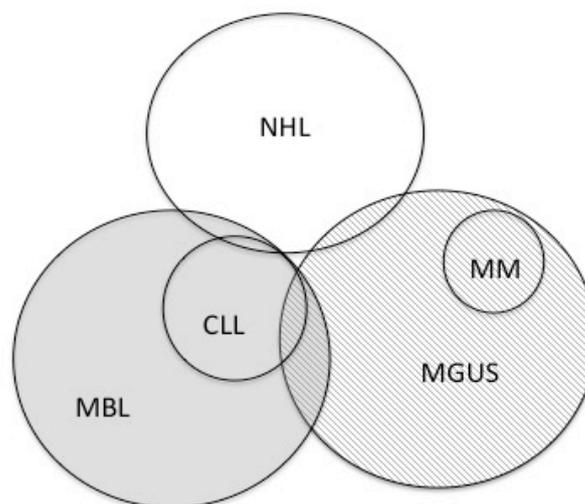


Abbildung 4-1: Hypothetische Beziehung zwischen MBL und MGUS. Abbildung modifiziert nach Vogt and Marti, 2007.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung haben bei 6 von 1.494 Patienten eine Koprävalenz von MBL und MGUS nachgewiesen. Das Ergebnis des primären Endpunktes zeigt mit einer Koprävalenz von 0.4 % mit einem Korrelationskoeffizient von -0.0006702 ($p=0.9991$) trotz des gemeinsamen Kontextes der beiden Vorläufererkrankungen, dass das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS nicht überzufällig häufig war.

Die MGUS verteilte sich hierbei (mit Ausnahme des biklonalen Falles) je zur Hälfte auf die „Non-CLL-like MBL“ und das „Mantelzell-Lymphom-like MBL“ (**Tabelle 3-5**). Nur bei dem biklonalen Fall Nr. 2392 trat auch eine „CLL-like MBL“ auf. Die Paraproteine und Leichtketten der MGUS verteilten sich hingegen heterogen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind differenziert zu betrachten, da das untersuchte Patientenkollektiv durch die Einschlusskriterien einer automatischen Selektion unterliegt, weil sie Krankenhaus-basiert ist. Die Entstehung von teilweise nicht dauerhaften B-Zell-Erkrankungen wird von Autoren verschiedener Studien beschreiben. Eine Hochregulation des Immunsystems wird als mögliche Ursache diskutiert (Hubel and Hallek, 2013; Matos and Falcao, 2011). Bei den nicht dauerhaften B-Zell-Erkrankungen wurde vor allen Dingen die „Non-CLL-like MBL“ beschrieben (Fazi et al., 2011). Im Hinblick auf die Theorie der Stimulation des Immunsystems ist es die Frage, ob eine Krankenhaus-basierte Population die richtige Grundlage zur Beantwortung der Frage der Koprävalenz bildet. Nieto et al. fassten unter dem Begriff der „Non-CLL-like MBL“ alle Fälle zusammen, welche nicht „CLL-like MBL“ sind (Nieto et al., 2010b), also auch den CD5+ Immunphänotyp der „Mantelzell-Lymphom-like MBL“. Diese Beschreibung und die Theorie der vermehrten Stimulation des Immunsystems würde nicht nur das überproportionale Vorkommen von „Non-CLL-like MBL“ im untersuchten Patientenkollektiv erklären, sondern auch das gehäufte Vorkommen bei der Koprävalenz von MBL und MGUS. Es wäre wichtig zu wissen, ob bei erneuter Untersuchung nach einem gewissen Zeitraum weiterhin die Koprävalenz bei den sechs Patienten auftritt. Lediglich der Fall Nr. 2392 besaß eine Koprävalenz bei der „CLL-like MBL“, jedoch durch seine Biklonalität auch eine bei der „Non-CLL-like MBL“. Auch in diesem Fall wäre eine Follow-up-Untersuchung wünschenswert gewesen. Diese war jedoch im Studiendesign nicht vorgesehen. Giha et al. beschreiben in ihrer Studie ein unerwartet hohes Vorkommen von „Non-CLL-like

MBL“ und vermuten bei sensitiverer Immunphänotypisierung einen weiteren Anstieg (Ghia et al., 2004). Dies ist ein weiterer Gesichtspunkt in der Begründung, dass bei 49 von 1.657 Patienten eine „Non-CLL-like MBL“ nachweisbar ist. Trotz alledem schließt er die Möglichkeit der Selektion durch das Studiendesign nicht aus, sondern unterstreicht die Wahrscheinlichkeit, dass andere Krankenhausbasierte Studien mit einem größeren Panel an Antikörpern ähnliche Ergebnisse erzielt hätten.

Die durch vorherige Studien prognostizierte Verteilungen bei Alter und Geschlecht hatten im Studiendesign zu höheren Patientenzahlen in den älteren Kohorten geführt. Dieser Ansatz konnte aus Mangel an Proben nicht wie gewünscht verfolgt werden und stellt eine Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Arbeit dar. Im Nachhinein wäre bei gleicher Größe der Untersuchung ein Verzicht auf die Kohorte der 50-59 Jährigen nicht von Nachteil gewesen. Er hätte bei gleicher Gesamtprobenzahl eine konsequentere Auswahl der älteren Kohorten und somit die Wahrscheinlichkeit einer anderen Prävalenz zur Folge gehabt.

Die Gemeinsamkeiten der Vorläufer von B-Zell-Erkrankungen ließen eine Koprävalenz von MBL und MGUS vermuten. Jedoch zeigt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Studien und Fallberichten, dass bei den Vorläufererkrankungen MBL und MGUS eine höhere Diversität im Hinblick auf Biklonalität, Immunphänotypen und das Auftreten weiterer klonalen Erkrankungen besteht (Nieto et al., 2010b; Sandes et al., 2012).

4.3 Ausblick

Bislang ist keine Studie zur Koprävalenz zwischen MBL und MGUS publiziert worden. Diese Lücke wurde mit der vorliegenden Arbeit geschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass man über die Koprävalenz keinen Rückschluss auf potentielle pathogenetische Verbindungen zwischen MBL und MGUS ziehen kann. Dennoch ergeben sich weitere Ansatzpunkte für Folgearbeiten, um Informationen auf klinischer und biologischer Ebene zu möglichen Verbindungen zwischen MBL und MGUS zu erlangen.

Beim Setting einer Folgearbeit wäre ein prospektiver Studienansatz wünschenswert, da eine Verbindung der Risikofaktoren zwischen MBL und MGUS von Relevanz im Hinblick auf Mechanismen der Tumorentwicklung sein kann (McMaster and Landgren, 2010). Ein Merkmal der Risikofaktoren im Rahmen einer solchen Arbeit kann die Konstellation des Immunsystems bei den einzelnen Vorstufen sein (Pessoa de Magalhaes et al., 2013). Dies setzt jedoch die vorherige Identifikation der Patienten voraus, bei welchen eine Koprävalenz vorliegt.

Hierfür wäre es nach den vorliegenden Daten am geeignetsten, Patienten mit MGUS zu identifizieren und diese mit einer multiparametrischen Immunphänotypisierung zu untersuchen. Um potentielle, zusätzliche Defekte des Immunsystems zu detektieren, sollten hier nicht nur die Immunphänotypen der B-Zellen, sondern auch von T-Zellen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen einbezogen werden. Eine zusätzliche genetische Bestimmung der Proben auf typische genetische Abnormalitäten von B-Zell Neoplasien und im Besonderen auf die der CLL und MM, würde die Möglichkeit eröffnen, eine eventuelle zusammenhängende Entstehung der Vorerkrankungen von B-Zellen auf molekularer Ebene zu zeigen.

Der prospektive Verlauf einer solchen Studie würde die Möglichkeit bieten, noch nicht bekannte Risikofaktoren von MBL und MGUS zu finden und eine eventuelle Weiterentwicklung der Vorläufererkrankungen in maligne B-Zell-Erkrankungen aufzeigen. Es würde mit einem solchen Studiendesign auch die Frage geklärt werden, ob analog zur Studie von Fazi et al. die „Non-CLL-like MBL“ Fälle über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind (Fazi et al., 2011). Wegen des

geringen Übergangsrisikos von einer CLL bzw. MM mit 1 % pro Lebensjahr und den besser werdenden Therapiemaßnahmen von CLL und MM, ist ein Routinescreening der gesunden Bevölkerung auf MBL und MGUS weiterhin nicht zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Die beiden B-Zell-Neoplasien MBL und MGUS gelten als jeweilige Vorstufen der chronisch lymphatische Leukämie und des Multiple Myeloms aus Formenkreis der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Es stellt sich die Frage, ob eine Zusammenhang zwischen MBL und MGUS besteht, da beide Gemeinsamkeiten auf klinischer und biologischer Ebene haben.

Der primäre Endpunkt der Arbeit war die überzufällige Koprävalenz von MBL und MGUS im untersuchten Patientenkollektiv, basierend auf der Annahme einer Assoziation beider Vorstufen. Sekundärer Endpunkt war die jeweilige Prävalenz von MBL und MGUS.

Bei 1.913 Individuen ohne bekannte hämatologische Erkrankung, wurde das Vorhandensein einer MBL und einer MGUS untersucht. Die Blutproben stammten aus der Routinediagnostik von Patienten, welche innerhalb des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, jedoch außerhalb eines onkologischen Zentrums behandelt wurden. Die Untersuchungen erfolgten anhand der multiparametrischen Durchflusszytometrie zur Detektion einer MBL und der Immunfixation aus dem peripheren Blut zur Detektion einer MGUS.

Die Prävalenz von MBL lag bei 3,8 %, die von MGUS bei 10 % im untersuchten Patientenkollektiv. Eine Koprävalenz beider Vorstufen fand sich bei 0,4 % bei 1.494 gemeinsam analysierten Patienten. Das gemeinsame Auftreten von MBL und MGUS war somit nicht signifikant überzufällig häufig.

Das Ergebnis zeigte, dass eine Assoziation von MBL und MGUS nicht durch eine Untersuchung der Koprävalenz aufgedeckt werden konnte. Ein erweitertes Screening von Patienten bei MGUS-Nachweis auf MBL kann daher weiterhin nicht empfohlen werden. Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass bei MBL und MGUS eine größere Diversität als bisher beschrieben im Hinblick auf Biklonalität, Immunphänotypen und das Auftreten weiterer klonaler Erkrankungen besteht. Die Erforschung dieser Diversität und ihr Ursprung sollten Aufgabe von Folgearbeiten sein. Die genauen Zusammenhänge zwischen den beiden Vorstufen bleiben weiterhin unklar.

6 Abkürzungen

CD	Cluster of Differentiation
MHC	Major histocompatibility complex
MBL	Monoklonale B-Zell Lymphozytose
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
VCS	Volumen Conductivität Streulichtmessung
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
ALC	Absolut Leukocyte Count
NHL	Non Hodgkin Lymphom
Ig	Immunglobulin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FSC	Forward Scatter
SSC	Sideward Scatter
MZL	Mantelzell Lymphom

7 Literaturverzeichnis

Avet-Loiseau, H. et al. (1998) High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res*, 58, 5640-5645.

Coulter, B. COULTER® 3-D VCS TECHNOLOGY.

Coulter, B. (2009) Coulter LH 700 Series Easy Reference Guide.

Behring & Kitasato (1965) [On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals]. *Dtsch Med Wochenschr*, 90, 2183.

Bene, M.C. et al. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9, 1783-1786.

Clemens M. Wendtner, P.D., Michael Gregor, Richard Greil, Wolfgang Knauf, Johannes Schetelig, Michael Steurer, Stephan Stilgenbauer (2012) Leitlinie Chronisch Lymphatische Leukämie.

Crawford, J., Eye, M.K. & Cohen, H.J. (1987) Evaluation of monoclonal gammopathies in the "well" elderly. *Am J Med*, 82, 39-45.

Dighiero, G. & Hamblin, T.J. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 371, 1017-1029.

Döhner, H. et al. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1910-1916.

Dunphy, C.H. & Perkins, S.L. (2001) Large cell variants of CD5+, CD23- B-cell lymphoma/leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, 125, 513-518.

Eisele, L. et al. (2012) Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany. *Ann Hematol*, 91, 243-248.

Krebsregister, e. (2004) The EURO CARE-4 database on cancer survival in Europe .

Fazi, C. et al. (2011) General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*, 118, 6618-6625.

Ghia, P. et al. (2004) Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*, 103, 2337-2342.

Goldin, L.R. et al. (2010) Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol*, 151, 152-158.

Gribben, J.G. & O'Brien, S. (2011) Update on therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 29, 544-550.

Hans D. Bruhn, U.R.F. (2008) *LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik.* Schattauer,

Hawley, T.S. & Hawley, R.G. Flow Cytometry Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 263,

Hernandez, J.A., Land, K.J. & McKenna, R.W. (1995) Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer*, 75, 381-394.

Hubel, K. & Hallek, M. (2013) [Monoclonal gammopathy of undetermined significance and monoclonal B-lymphocytosis]. *Internist (Berl)*, 54, 709-714.

Jaffe, E.S. (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523-531.

Jerne, N.K. (1985) The generative grammar of the immune system. *Science*, 229, 1057-1059.

Aarau, K. (2014) Laborhandbuch Monoklonale Gammopathie.

Kilo, M.N. & Dorfman, D.M. (1996) The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 105, 451-457.

Kyle, R.A. (1978) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*, 64, 814-826.

Kyle, R.A. et al. (2006) Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354, 1362-1369.

Kyle, R.A. et al. (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 346, 564-569.

Landgren, O. et al. (2009a) B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 360, 659-667.

Landgren, O. & Kyle, R.A. (2007) Multiple myeloma, chronic lymphocytic leukaemia and associated precursor diseases. *Br J Haematol*, 139, 717-723.

Landgren, O. et al. (2009b) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113, 5412-5417.

Marti, G.E. et al. (2003) B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 52, 1-12.

Marti, G.E. et al. (2005) Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*, 130, 325-332.

Matos, D.M. et al. (2012) Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL, CD4+/CD8 weak T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL leukemia) and monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS): molecular and flow cytometry characterization of three concomitant hematological disorders. *Med Oncol*, 29, 3557-3560.

Matos, D.M. & Falcao, R.P. (2011) Monoclonal B-cell lymphocytosis: a brief review for general clinicians. *Sao Paulo Med J*, 129, 171-175.

McMaster, M.L. & Caporaso, N. (2007) Waldenstrom macroglobulinaemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance: emerging understanding of a potential precursor condition. *Br J Haematol*, 139, 663-671.

McMaster, M.L. & Landgren, O. (2010) Prevalence, clinical aspects, and natural history of IgM MGUS. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, S91-S97.

Mikhael, J.R. et al. (2013) Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*, 88, 360-376.

Milstein, C. (1986) From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science*, 231, 1261-1268.

Mitsiades, C.S. et al. (2004) Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell*, 6, 439-444.

Myeloma Working Group, (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, 121, 749-757.

Nieto, W.G. et al. (2010a) Commentary: Comparison of current flow cytometry methods for monoclonal B cell lymphocytosis detection. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, S4-S9.

Nieto, W.G. et al. (2010b) Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, S24-S34.

Pessoa de Magalhaes, R.J. et al. (2013) Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*, 98, 79-86.

Porter, R.R. (1972) STRUCTURAL STUDIES OF IMMUNOGLOBULINS.

Raab, M.S. et al. (2009) Multiple myeloma. *Lancet*, 374, 324-339.

Rajkumar, S.V. (2011) Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 86, 57-65.

Rawstron, A.C. (2009) Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 430-439.

Rawstron, A.C. et al. (2008) Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 359, 575-583.

Rawstron, A.C. et al. (2002) Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*, 100, 635-639.

Sandes, A.F. et al. (2012) Association of myelodysplastic syndrome with CD5+, CD23+ monoclonal B-cell lymphocytosis. *Clinics (Sao Paulo)*, 67, 1487-1491.

Shapiro, N.I. et al. (1998) Absolute lymphocyte count as a predictor of CD4 count. *Ann Emerg Med*, 32, 323-328.

Shim, Y.K. et al. (2007) Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom*, 72, 344-353.

Tian, E. et al. (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*, 349, 2483-2494.

Valentine, R.C. & Green, N.M. (1967) Electron microscopy of an antibody-hapten complex. *J Mol Biol*, 27, 615-617.

Vogt, R.F. & Marti, G.E. (2007) Overview of monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Br J Haematol*, 139, 687-689.

www.hmrn.org/statistics/disorders/24 (2004) Statistic Myeloma. Stand 8/2014

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ Entrez Gene. Stand 8/2014

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: SSC/FSC Dot-Plot Darstellung von gesundem Vollblut	22
Abbildung 2-2: Gating von B-Zellen.....	22
Abbildung 2-3: Darstellung der B-Zellen eines gesunden Individuums in der multiparametrischen Durchflusszytometrie.....	23
Abbildung 2-4: Immunfixationsgel mit neun Analysen	25
Abbildung 3-1: Immunfixation bei einem Gesunden und einem Patienten mit MGUS IgG Kappa.....	32
Abbildung 3-2: Verteilung der verschiedenen Immunglobuline mit monoklonalen Banden in der Immunfixation.....	33
Abbildung 3-3: MGUS Verteilung in den Alterskohorten.....	34
Abbildung 3-4: Geschlechtsspezifische Verteilung von MGUS in den Alterskohorten.....	35
Abbildung 3-5: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse bei einem Patienten mit unauffälligen B-Zellen	36
Abbildung 3-6: Darstellung verschiedener Phänotypen von MBL	37
Abbildung 3-7: Fallbeispiele von zwei Patienten mit biklonaler MBL im peripheren Blut	39
Abbildung 3-8: Geschlechtsspezifische Verteilung in den Phänotyp-Gruppen „Non-CLL-like“, „atypische CLL-like“, „CLL-like MBL“ und „Mantelzell-Lymphom like MBL“.....	40
Abbildung 3-9: Prävalenz von MBL in der gesamten untersuchten Kohorte nach Altersgruppen	42
Abbildung 4-1: Hypothetische Beziehung zwischen MBL und MGUS.....	52

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Kriterien zur Diagnose einer monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL) nach Marti et al	9
Tabelle 1-2: Kriterien zur Diagnose eines MGUS von der Internationalen Myelom Arbeitsgruppe	11
Tabelle 2-1: Ein- und Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Untersuchung	18
Tabelle 2-2: Reagenzien zur Herstellung einer Erythrozytenpufferlösung.....	19
Tabelle 2-3: Kombination genutzter Antikörper.....	22
Tabelle 3-1: Geschlechtsspezifische Referenzwerte des Blutbilds.....	30
Tabelle 3-2: Referenzbereiche für Serumproteine in der Kapillar-Elektrophorese	31
Tabelle 3-3: Verteilung der MBL Phänotypgruppen im Gesamtkollektiv.....	41
Tabelle 3-4: Auftreten (absolut) der unterschiedlichen Immunophänotypen bei Patienten mit Monokonalität in den einzelnen Alterskohorten	43
Tabelle 3-5: Verteilung der MBL-Phänotypen und MGUS-Immunglobuline beider Phänomene.	44

10 Danksagung

Dankeschön an alle, die mich unterstützt und zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Martin Trepel für die Unterstützung und Hilfe bei großen und kleinen Sorgen.

Bei Frau Prof. Ulrike Bacher, Herrn PD Dr. Thomas Streichert und Herrn Dr. Roman Jung für die großartige Betreuung, stete Erreichbarkeit und Geduld sowie der Korrektur meiner Arbeit.

Dem Laborteam Christiane Horn, Katrin Kluge, Elke Rühlmann, sowie Elke Lehmann und Cindy Lehmann. Ohne eure Unterstützung wäre diese Doktorarbeit niemals zustande gekommen!

Lukas Vogler ohne dessen Datenbank und Auswertung alle Ergebnisse in einem heillosen Durcheinander geendet wären.

Meiner Familie für den steten Rückhalt und Aufmunterung. Ein ebenso großer Dank an Henrike Jacubeit und Frederike Waldeck.

Også mange tak for godt naboskab i Uldgade med sponsorering af kaffe og kage.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: