

Medizinischen Universitätsklinik Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin III  
Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektionskrankheiten  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Durchflusszytometrische Analysen von CD44v6  
bei  
Monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz  
und beim Multiplen Myelom

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der  
Universität Ulm

vorgelegt von  
Susanne Amrhein

aus  
Illertissen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Mathias Schmid

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Marx

Tag der Promotion: 24.04.2008

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Monoklonale Plasmazellerkrankungen .....	7
1.1.1 Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) .....	7
1.1.1.1 Definition, Klinik und Diagnosekriterien.....	7
1.1.1.2 Inzidenz und Genetik.....	9
1.1.2 Multiples Myelom .....	9
1.1.2.1 Definition.....	9
1.1.2.2 Klinik.....	10
1.1.2.3 Diagnose.....	10
1.1.2.4 Prognostische Faktoren und Therapie.....	12
1.1.2.5 Genetik.....	13
1.2 Das Antigen CD44v6 .....	14
1.2.1 Biologie der Familie der CD44-Proteine.....	14
1.2.1.1 Aufbau.....	14
1.2.1.2 Funktion.....	15
1.2.2 Inzidenz von CD44v6 in gesunden Geweben.....	17
1.2.3 Inzidenz von CD44v6 bei verschiedenen Tumorerkrankungen.....	18
1.3 Antikörpertherapie und Antikörper Bivatuzumab Mertansine.....	20
1.3.1 AK-Therapie bei hämatologischen Tumorerkrankungen.....	21
1.3.2 Antikörper Bivatuzumab Mertansine.....	21
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Patienten.....	23
2.2 Durchflusszytometrie.....	24
2.2.1 Methodik.....	24
2.2.2 Aufarbeitung der Patientenproben.....	25
2.2.3 Markerprofile und Geräteeinstellungen.....	26
2.2.4 Gating.....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3 Stabilität von CD44v6.....	32
2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH).....	32
2.4.1 FISH - Zellpräparation.....	32
2.4.2 FISH- DNA-Sonden und Nick-Translation.....	34
2.4.3 FISH – Hybridisierung.....	35
2.4.4 FISH – Detektion.....	37
2.4.5 FISH - Auswertung.....	39
2.5 Statistik.....	40
2.6 Reagenzien und Antikörper.....	41
3 Ergebnisse.....	43
3.1 Bestimmung des Schwellenwerts für die CD44v6-Positivität auf Plasmazellen.....	43
3.2 Ermittlung der Inzidenz der CD44v6 Expression bei Patienten mit MGUS und MM I.....	44
3.3 Ermittlung der Inzidenz von CD44v6 bei Patienten mit MM II, MM III und PCL.....	46
3.4 Stabilität von CD44v6 .....	48
3.5 Korrelation der CD44v6 Expression mit 13q14-Deletion und anderen Risikofaktoren .....	50
4 Diskussion.....	51
5 Zusammenfassung.....	56
6 Literaturverzeichnis.....	58
7 Anhang.....	68
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	68
7.2 Tabellenverzeichnis.....	69
8 Danksagung.....	70
Lebenslauf.....	71

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
κ	Kappa
λ	Lambda
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
q	Langer Arm eines Chromosoms
13q	Langer Arm von Chromosom 13
13q-	Deletion des langen Arms von Chromosom 13
CD	Cluster of differentiation
CLP	Cartilage link protein
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
DNA	desoxyribonucleid acid
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz aktivated cell sorter
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat = gelbgrüne Fluoreszenz
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FSC	Forward Angle Light Scatter
HA	Hyaluronic
Hb	Hämoglobin
IgG, IgA, IgD, IgM	Immunglobuline der Klasse G, A, D, M
IgH	Immunglobulin-Schwerkette (heavy)
IgL	Immunglobulin-Leichtkette (light)
KLH	keyhole limpet hemocyanin
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
mAB	Monoclonal Antibody
M-Protein	Monoklonales Protein
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MM	Multiples Myelom

## Abkürzungsverzeichnis

---

PC5	Tandemkonjugat aus R-Phycoerythrin und Cyanin = dunkelrote Fluoreszenz
PCL	Plasmazelleukämie
PCLI	Plasma Cell Labeling Index
PE	Phycoerythrin = orange-rote Fluoreszenz
SSC	Side Scatter
TM	Transmembranöse Region
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

## 1.1 Monoklonale Plasmazellerkrankungen

### 1.1.1 Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)

#### 1.1.1.1 Definition, Klinik und Diagnosekriterien

Die MGUS ist die häufigste monoklonale Gammopathie, deren Diagnose meist ein Zufallsbefund ist, ohne dass bei den Patienten klinische Symptome nachzuweisen sind.

Die Diagnose einer MGUS wird gestellt, wenn folgende Kriterien erfüllt sind (International Myeloma Working Group, 2003):

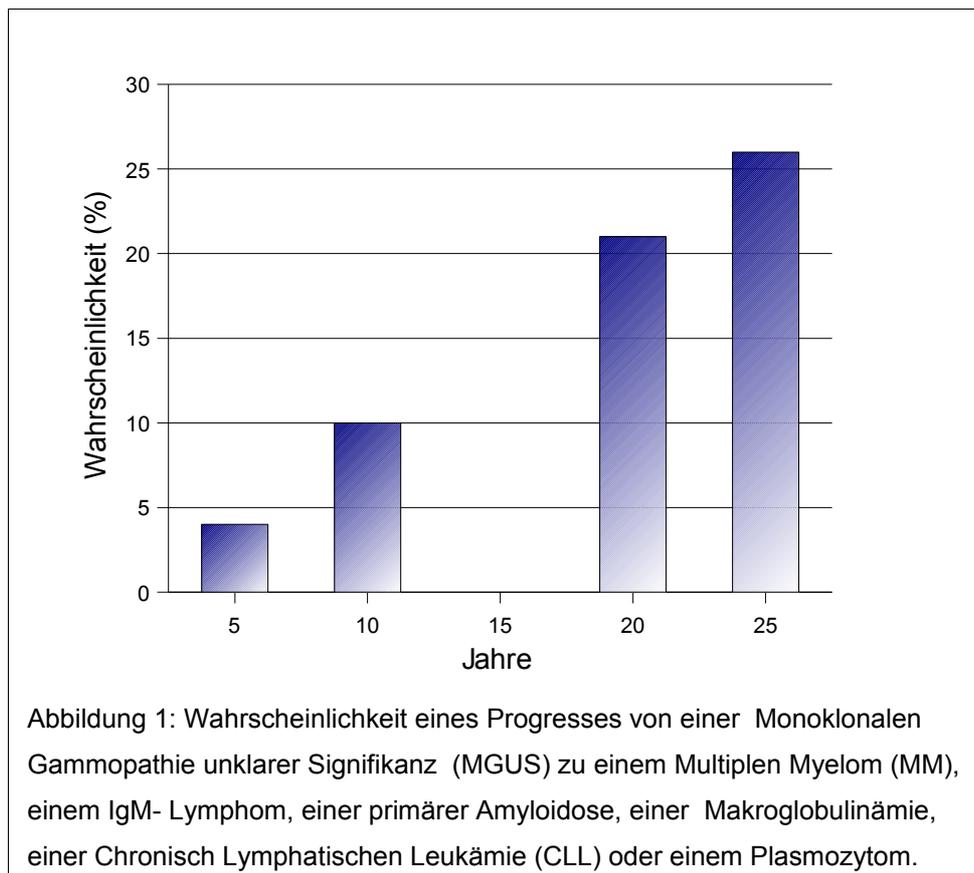
- M-Protein < 30 g/l
- < 10% Plasmazellen im Knochenmark und ein geringer Grad der Plasmazellinfiltration in einer Knochenmarkhistologie
- Kein Hinweis auf andere proliferative B-Zell-Erkrankungen
- Keine wesentlichen Organ- oder Gewebebeeinträchtigungen (keine Endorganschäden, keine Knochenläsionen)

Da viele Patienten bei Diagnosestellung und auch im weiteren Verlauf asymptomatisch sind bzw. bleiben, wird die MGUS oft auch als „benigne monoklonale Gammopathie“ bezeichnet. Dies ist jedoch nur dann zulässig, wenn sich die Gammopathie über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg nicht verändert. Dem gegenüber steht die Einstufung der MGUS als Präkanzerose. Eine Langzeitstudie aus den USA mit 1384 Patienten konnte zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit eines Progresses dieser Erkrankung in Form der Entwicklung eines Multiplen Myeloms, eines Lymphoms, einer Makroglobulinämie, einer primären Amyloidose, einer chronisch lymphatischen Leukämie oder eines Plasmozytoms im Laufe der Erkrankungszeit drastisch ansteigt. Die kumulative

## Einleitung

---

Wahrscheinlichkeit eines Progresses in eine der eben genannten Erkrankungen beträgt nach 10 Jahren ca. 10%, nach 20 Jahren ca. 21% und nach 25 Jahren sogar 26% (Kyle R. A. et al. 2002).



Auf der Suche nach Risikofaktoren für einen Progress erwiesen sich nur die Konzentration und die Art des monoklonalen Proteins als unabhängige Parameter. Dabei hatten Patienten mit einem IgA- oder IgM-Paraprotein ein höheres Risiko ein Multiples Myelom oder eine Plasmazelleleukämie zu entwickeln als Menschen mit mit einem IgG-Paraprotein. Der wichtigste Risikofaktor jedoch ist die Konzentration des monoklonalen Proteins im Serum bei der Diagnosestellung der MGUS: je höher die Konzentration des Proteins, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Progresses.

### **1.1.1.2 Inzidenz und Genetik**

Durch die demographische Entwicklung unserer Bevölkerung und durch die empfindlicher werdenden Nachweismethoden wie z.B. der Immunfixation ist wohl die zunehmende Inzidenz der MGUS zu erklären. Diese betrug 2% bei 50-jährigen oder älteren Menschen und 3% bei über 70-jährigen Personen (Kyle R. A. et al. 2002).

Durch die Möglichkeit genetischer Analysen wurde in den letzten Jahren das Verständnis für die Pathogenese klonaler Plasmazellerkrankungen wesentlich verbessert. Die aktuelle Modellvorstellung unterscheidet primäre und sekundäre IgH-Translokationen. Bei der MGUS ist eine hohe Inzidenz von primären Translokationen zu beobachten, welche deshalb als frühe und entscheidende genetische Voraussetzungen für die Pathogenese der Erkrankung propagiert werden. Sekundäre Translokationen hingegen sind kaum nachzuweisen. So konnten Kuehl und Bergsagel 2002 bei ca. 55% der MGUS-Patienten eine IgH-Translokation nachweisen. Diese zieht eine Dysregulation verschiedener Onkogene nach sich.

## **1.1.2 Multiples Myelom**

### **1.1.2.1 Definition**

Das zu den lymphoproliferativen Erkrankungen gehörende Multiple Myelom (MM) ist nach der WHO-Klassifikation den malignen Lymphomen der B-Zell-Reihe zuzuordnen. Bei dieser B-Zell-Neoplasie kommt es zur malignen Transformation einer Plasmazelle, die sich regulären Apoptose-Mechanismen entzieht und ungehemmt im Knochenmark proliferiert. Es kommt zu diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen. Diese klonalen Plasmazellen produzieren monoklonale Immunglobuline, meist Typ IgG oder IgA,

seltener IgM oder IgD („Paraproteine“) oder Immunglobulin-Leichtketten vom Typ Kappa oder Lambda („Bence Jones-Protein“), welche im Serum und/oder im Urin nachweisbar sind.

In ca. 1% der Fälle liegt ein asekretorisches MM vor, das kein monoklonales Immunglobulin sezerniert. Die Inzidenz des MM steigt im Alter stark an und beträgt in Mitteleuropa altersadjustiert ca. 4/100.000. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 60 und 70 Jahren.

### **1.1.2.2 Klinik**

Die Initialsymptome dieser Erkrankung sind unspezifisch. Die häufigsten Beschwerden sind Knochenschmerzen, unter Umständen auf Grund pathologischer Frakturen, Anämiesymptome und eine erhöhte Infektanfälligkeit. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen etwa 80% der Patienten Knochenveränderungen auf. Ablagerung von Leichtketten-Amyloid („Amyloidose“) können zu Organinsuffizienzen führen. Symptome einer Hyperkalzämie, einer Neuropathie oder eines Hyperviskositätssyndroms finden sich seltener.

### **1.1.2.3 Diagnose**

Die Diagnose eines Multiplen Myeloms gilt als gesichert, wenn die drei folgenden Kriterien erfüllt sind (Abbildung 2 und 3, International Myeloma Working Group, 2003). Das MM wird in ein symptomatisches, behandlungsbedürftiges MM und ein asymptomatisches („indolentes“), nicht behandlungsbedürftiges MM eingeteilt.

## Einleitung

### Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein

1. Nachweis von  $\geq 10\%$  Plasmazellen im Knochenmark  
*und/oder* histologische Sicherung eines Plasmozytoms
2. Nachweis eines monoklonalen Proteins im Serum *und/oder* Urin <sup>a</sup>
3. Nachweis einer/von  
Hyperkalzämie ( $\text{Ca}^{2+} >$  obere Norm) *und/oder*  
Niereninsuffizienz (Kreatinin  $> 173$  mmol/l) *und/oder*  
Anämie (Hb  $< 10,5$  g/dl *oder*  $2$  g/dl  $<$  Norm) *und/oder*  
Knochenveränderungen (Osteolysen, diffuse Osteoporose) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Bei asekretorischem MM: Nachweis von  $\geq 30\%$  Plasmazellen im Knochenmark

*und/oder* histologische Sicherung eines Plasmozytoms

<sup>b</sup> Bei solitärem Plasmozytom oder Osteoporose *ohne* Wirbelkörperfrakturen  $> 30\%$  Plasmazellen im Knochenmark gefordert

Abbildung 2: Diagnosekriterien beim symptomatischen Multiplen Myelom (MM)

### Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein

1. Nachweis monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark
2. Nachweis eines monoklonalen Proteins im Serum *und/oder* Urin
3. Die Kriterien für MGUS, ossäres/extraossäres Plasmozytom *oder* symptomatisches MM sind nicht erfüllt

Abbildung 3: Diagnosekriterien beim asymptomatischen Multiplen Myelom (MM)

Eine MGUS liegt vor bei einem monoklonalen Serumprotein von weniger als 30 g/l, einer Plasmazellkonzentration im Knochenmark von unter 10% und bei Fehlen

typischer Symptome eines MM.

Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms erfolgt nach Durie und Salmon, wobei die Stadien I bis III mit den Zusätzen A (= normale Nierenfunktion) und B (eingeschränkte Nierenfunktion, Kreatinin >173 mmol/l) unterschieden werden.

### 1.1.2.4 Prognostische Faktoren und Therapie

Wie sich in der Vergangenheit zeigte, können maligne Plasmazellerkrankungen einen sehr heterogenen klinischen Verlauf nehmen und je nach Verlauf variiert die individuelle Überlebenszeit erheblich (von Monaten bis Jahre). Verschiedene prognostische Parameter können einen Hinweis auf den möglichen Verlauf der Krankheit geben, ebenso wie sie auch zur Auswahl der Therapiemodalitäten herangezogen werden.

Zur Auswahl der Therapie sind neben Alter und Komorbidität des Patienten folgende Parameter von Bedeutung:

- Klinisches Stadium (*nach Salmon, Durie 1975*) als Indikator der Tumormasse
- erhöhtes CRP (C-reaktives Protein)
- erhöhte LDH (Laktatdehydrogenase)
- erhöhtes  $\beta$ 2-Mikroglobulin (*Facon et al. 2001, Desikan et al. 2000*)
- Monosomie 13 (*Barlogie et al. 1999, Facon et al. 2001, Fonseca et al. 2002*)
- Deletion 13q-
- hypodiploider Chromosomensatz (*Smadja et al. 2001*)

Abbildung 4: Prognostische Parameter beim Multiplen Myelom (MM)

Bei Vorhandensein solcher Parameter konnte in den verschiedenen Arbeiten ein äußerst ungünstiger Krankheitsverlauf nachgewiesen werden.

### 1.1.2.5 Genetik

Auf der Suche nach ursächlichen Faktoren und prognostischen Parametern beim MM wurde u.a. auch nach genetischen Veränderungen gesucht. Es konnte bisher jedoch nur für zwei chromosomale Veränderungen eine unabhängige prognostische Wertigkeit nachgewiesen werden, nämlich für eine Deletion 13q/Monosomie 13 (-13/13q-) und beim Vorliegen einer Hypodiploidität.

Dabei konnte Smadja et al. (2001) zeigen, dass das Vorliegen eines hypodiploiden Karyotyps mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben gegenüber einer Gruppe mit hyperdiploidem Chromosomensatz assoziiert ist (12,6 versus 33,8 Monate).

Bei Patienten mit -13/13q ist sowohl das Gesamtüberleben verkürzt, als auch das Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie oder auch Hochdosistherapie schlechter (Tricot et al. 1995, Tricot et al. 1997). Das mittlere Gesamtüberleben nimmt bei einer Kombination mit einem erhöhten  $\beta$ 2-Mikroglobulin drastisch ab. So wiesen 22 Patienten ohne negative prognostische Faktoren ein mittleres Gesamtüberleben von 111 Monaten auf versus 47,3 Monaten bei 55 Patienten mit einem Faktor (entweder -13/13q- oder erhöhtes  $\beta$ 2-Mikroglobulin) und sogar nur 25,3 Monaten bei 33 Patienten mit einer Kombination beider Faktoren (Facon et al. 2001).

## **1.2 Das Antigen CD44v6**

### **1.2.1 Biologie der Familie der CD44-Proteine**

#### **1.2.1.1 Aufbau**

CD44 bezeichnet eine polymorphe Familie von Oberflächenproteinen, welche von einem einzelnen Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 kodiert werden und 20 Exons umfassen (Seccaton GR et al. 1992; Seccaton GR et al. 1993). Dieser Polymorphismus kommt durch posttranslationale Modifikationen und durch Veränderungen in der primären DNS-Struktur durch Variationen beim Splicing zustande.

Die kleinste Isoform stellt das sogenannte CD44 standard (CD44s) dar, welches aus 341 Aminosäuren besteht. Es wird durch 10 verschiedenen Exons gebildet, wovon sieben den N-terminalen Teil des extrazellulären Teils des Proteins kodieren (248 Aminosäuren), eines den transmembranären Teil (23 Aminosäuren) und zwei den kleinen zytoplasmatischen Teil (70 Aminosäuren). Durch ausgedehnte posttranslationale Glykolysation erreicht das CD44s ein Gewicht von 85-95 kDa (Naor D et al. 1997).

Durch unterschiedliches Splicing der „variant exons“ (v1-v10) kommen die verschiedenen anderen - größeren - CD44v-Antigene zustande, die einen vergrößerten extrazellulären Anteil aufweisen. Theoretisch wären auf diese Art und Weise über 700 verschiedenen Isoformen des CD44 möglich (Van Weering DH et al. 1993). Tatsächlich konnten bis heute nur ca. 20 Antigene in verschiedenen Zelllinien oder Geweben nachgewiesen werden. Die „variant exons“ fehlen bei der CD44-Standardform vollständig.

Die Beseitigung von verschiedenen Kombinationen der 10 Exons (v1-v10) durch den Vorgang des Splicings führt zu verschiedenen mRNAs. Durch Translation entstehen dann verschiedene CD44-Isoformen, welche sich nur in ihrer variablen Region, des extrazellulären Anteils des Moleküls, unterscheiden.

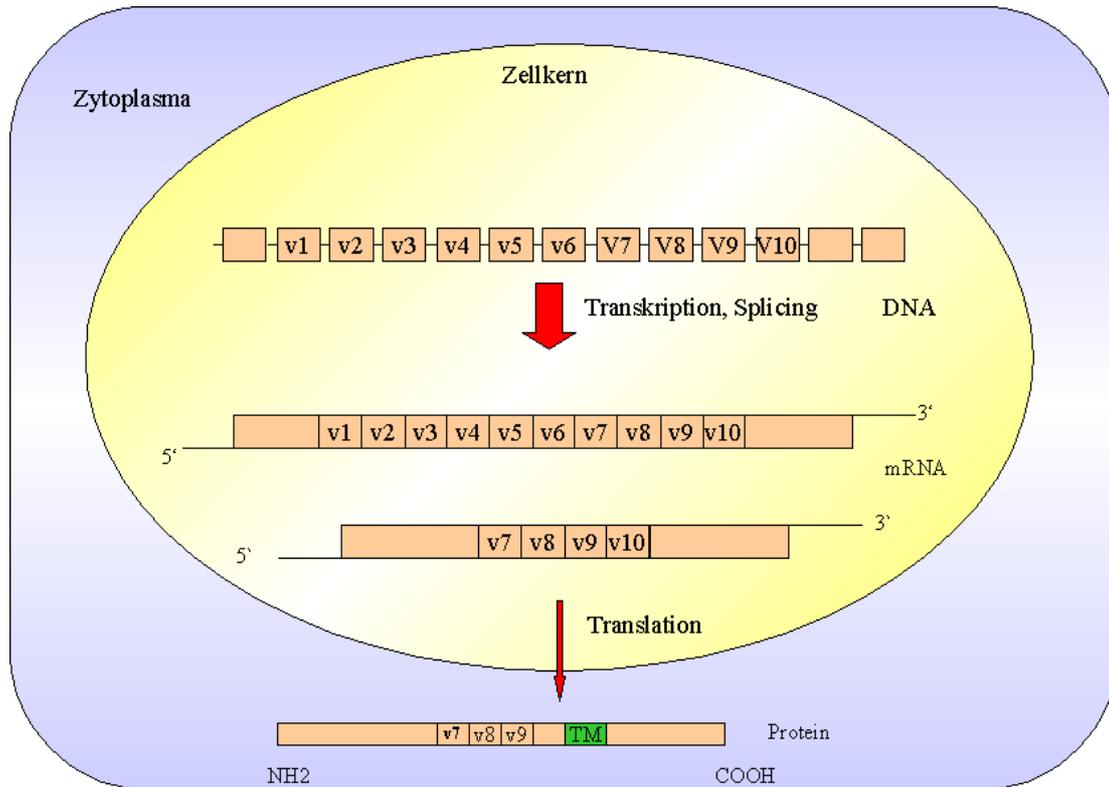


Abbildung 5: Schematische Darstellung des CD44-Genes und individueller Splicevarianten. TM= transmembranöse Region (K. - H. Heider et al, European Journal of Cancer Vol. 31A, 1995, modifiziert)

## 1.2.1.2 Funktion

### *Zelladhäsion und Signalübertragung*

Die wohl am besten untersuchte Funktion von CD44 ist seine Fähigkeit, Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden. Durch seinen extrazellulären Anteil ist CD44 in der Lage, Hyaluron zu binden. Hyaluron stellt eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix von vielen Geweben und das Fundament vieler Membranen dar. Es interagiert mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix und ist in die Regulation des Zell-Zell-Kontaktes, der Zellmotilität, der Proliferation, der Regulation von Immunfunktionen bei Entzündungsprozessen und der Differenzierung eingeschlossen (Laurent TC et al. 1996).

Es handelt sich hierbei um ein großes Polysaccharid mit einer Molekularmasse von einigen Millionen Daltons. Es ist zusammengesetzt aus sich wiederholenden

Einheiten von Glucuronsäure- $\beta$ 1-3N-Acetylglukosamin  $\beta$ 1-4 (Borland et al. 1998). Dieses riesige Glykosaminoglykanmolekül beinhaltet viele Bindungsstellen für eine Interaktion mit CD44. Eine effektive Interaktion kann nur durch viele dicht aneinander gereihete CD44-Rezeptoren erreicht werden (Lesley J et al. 2000). Dabei spielt nicht nur der Rezeptortyp (CD44-Variante) eine wichtige Rolle, sondern auch die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Beide Komponenten bestimmen die Ausdehnung und Festigkeit der Bindung zur extrazellulären Matrix.

Hyaluron ist bekannt dafür, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren, darunter mehrere Tyrosin- und Serin/Threoninkinasen in verschiedenen Zelltypen des hämatologischen und immunologischen Systems. Dieser Vorgang benötigt offensichtlich die Interaktion mit hyaluronbindenden Proteinen (Hyaladherine), welche die transmembranöse Signalgebung vermitteln. Über zwei Hyaladherine, CD44 und RHAMM (CD168), wurde berichtet, dass sie an der Transduktion von Hyaluronase-assoziierten Signalen beteiligt sind (Zhang S et al. 1998). Die zytoplasmatische Komponente von CD44 hat das Potential, onkogene Signalmoleküle zu binden, einschließlich Src- und p185HER2-Kinasen.

Die molekularen Details von CD44-vermittelten Signaltransduktionsprozessen, vor allem in Tumorzellen, sind momentan aber nur wenig verstanden.

### *Wachstumsfaktoren und Zytokine*

Lösliche Wachstumsfaktoren und Zytokine in der Umgebung von Tumoren regulieren eine Vielzahl von verschiedenen Tumorzelleigenschaften, wie z.B. die Proliferation, Migration und Gewebsinvasion ( Hamada J et al. 1998). Ein Model für CD44-vermittelte Wachstumsfaktorpräsentation während Tumorwachstum wurde vorgestellt (Ponta H et al. 1998). Wachstumsfaktoren, welche Heparin binden, z.B. epidermale Wachstumsfaktoren, binden ebenfalls Heparan. Auf diese Weise können CD44v-Proteine, exprimiert auf Tumorzellen, auch heparinbindende Wachstumsfaktoren binden und präsentieren sie anderen hochaffinen Rezeptoren auf ihrer eigenen Oberfläche oder benachbarten Tumor- und Gewebezellen. Dabei können günstige Bedingungen für ein Tumorwachstum

geschaffen werden. Diese Art von Präsentation von Wachstumsfaktoren wurde vorher bei Hautkeratinozyten beschrieben (Bennet KL et al. 1995).

### *Tumorausbreitung*

Eine Subfamilie von CD44-Varianten einschließlich der Variante CD44v6 ist in das Metastasierungspotential von Tumoren involviert (Rudy W et al. 1993; Zöller M et al. 1995). Im Tierversuch wurde festgestellt, dass CD44-Isoformen, die die Form CD44v6 beinhalten, Metastasierungspotential auf nichtmetastasierende Tumorzelllinien übertragen (Gunthert et al. 1991). Bei einigen anderen Studien konnte bestätigt werden, dass eine hohe Expression von CD44v6 bei Primärtumoren als Prädiktor für eine Metastasierung u.a. beim Colonicarcinom angesehen werden kann (Wielenga et al. 1993 und 1998, Nguyen et al. 2000). Zudem scheinen CD44v-Isoformen, und hier v.a. das CD44v6, in Kombination mit anderen Mediatoren in die Migration, Invasion und das Überleben von Plasmazellen beim Multiplen Myelom involviert zu sein (Caers et al. 2006).

Antikörper gegen metastasierende Zellen führten zu einer verzögerten oder sogar kompletten Blockade der Metastasierung in vivo (Seiter S et al. 1993).

### **1.2.2 Inzidenz von CD44v6 in gesunden Geweben**

Im Gegensatz zur Standardform des CD44, die in normalen gesunden Geweben beinahe überall vorkommt, ist die Inzidenz von CD44v6 auf einen kleinen Teil epithelialer Gewebe beschränkt. Dies sind v.a. Haut, Cervix, Mundschleimhaut, Ösophagus, Prostata, Pneumozyten Typ II der Lunge und Bronchialschleimhaut. Die höchste Intensität wurde in Keratinozyten der Haut und anderen Plattenepithelien festgestellt.

Bei hämatopoetischen Zellen einschließlich Knochenmarkzellen (Stamm- und Progenitorzellen) konnte keine oder nur eine geringe Expression von CD44v6

nachgewiesen werden ( Heider KH et al. 2004).

### **1.2.3 Inzidenz von CD44v6 bei verschiedenen Tumorerkrankungen**

Das Thema CD44 und Zelladhäsion beschäftigte im letzten Jahrzehnt schon einige Forschergruppen. Es gibt eine Vielzahl veröffentlichter Arbeiten zum Thema der Inzidenz von CD44v6 bei Tumorerkrankungen, denen zumindest stark differierende Ergebnisse gemein sind. In der Mehrzahl der Studien wurde die CD44v6-Expression mittels Immunhistochemie dargestellt, wobei in Formalin fixierte und mit Paraffin beschichtete Gewebeproben verwendet wurden, die nach Standardprotokollen behandelt wurden. Bei den meisten Untersuchungen wurde der Schwellenwert für ein positives Ergebnis bei 10% festgelegt, d.h., wenn mindestens 10% der Tumorzellen eines Untersuchungsobjektes CD44v6 exprimieren, wurde es als positiv bewertet. Das Problem bei den verschiedenen Studien ist, dass verschieden monoklonale Antikörper, die für CD44v6 spezifisch sind, auf dem Markt angeboten werden: VFF4, VFF7, VFF18, U36, 2F10, V6B3, HB-256 und Var 3.1. Bei den Forschungsarbeiten der verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper VFF7 eine geringere Affinität zu CD44v6 hat als andere Antikörper wie z.B. VFF4, VFF18 oder 2F10 (Heider KH et al. 1996).

Aus diesem Grund wird in den folgenden Tabellen auf die Darstellung der Ergebnisse, die auf Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper VFF7 beruhen, verzichtet. Sie versuchen einen Überblick über das Vorhandensein von CD44v6 in primär epithelialen und nicht-epithelialen Tumoren zu geben. Ebenfalls gibt es Untersuchungen zum Vorhandensein von CD44v6 in Metastasen von epithelialen Tumoren.

## Einleitung

Tabelle 1: Inzidenz von CD44v6 bei Primärtumoren und deren Metastasen

<b>Primärtumor</b>	<b>CD44v6-positiv (%)</b>	<b>Metastase</b>	<b>CD44v6-positiv (%)</b>
<b>Plattenepithelcarcinome</b>			
Kopf- und Halsbereich	61-100	Lymphknoten	29-99
		Leber	100
Ösophagus	95-97	-	-
Lunge	52-100	Lymphknoten	95-96
Haut	100	-	-
Cervix	32-73	-	-
<b>Adenocarcinome</b>			
Brust	65-88	Lymphknoten	91-100
		Leber	100
Lunge	10-95	-	-
Kolon/Rektum	86-100	Leber	50
		Lymphknoten	41
		Gehirn	100

Tabelle 2: Inzidenz von CD44v6 bei Leukämien und malignen Lymphomen

<b>Leukämien und maligne Lymphome</b>	<b>CD44v6-positiv (%)</b>
AML	6-73
Hodgkin Lymphom	28
Non-Hodgkin Lymphom	57
B-Zell-Lymphom	16-31
Multipl. Myelom	22 (mAb: VFF7)

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, des Ösophagus, der Haut, der Lunge und ihre Metastasen zeigen die höchste Expression von CD44v6 unter den Plattenepithelcarcinomen. Die meisten Autoren berichten hierbei von ca. 90% (z.B. Van Hal et al. 1999). Dadurch wären diese Erkrankungen für eine CD44v6-spezifische Antikörpertherapie ganz besonders interessant.

Bezüglich der Adenocarcinome kann man zusammenfassend sagen, dass bei allen Tumortypen CD44v6 positive Tumorzellen gefunden wurden. Allerdings variierte die Höhe der Expression von CD44v6 sowohl zwischen verschiedenen Studien über den gleichen Tumortyp, als auch im Vergleich zu den

Plattenepithelcarcinomen stark. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des gleichen Tumortyps sind zum einen der Verwendung verschiedener Antikörper zuzuschreiben und zum anderen auch von der unterschiedlichen Aufbereitung des Tumormaterials abhängig. Durch die hohe Positivität von CD44v6 beim Mammacarcinom von ca. 80% (z.B. Foekens et al. 1999) und zusätzlich auch seiner Lymphknotenmetastasen von ca. 100% (Dall et al. 1995) erscheint das Adenocarcinom eine attraktive Indikation für eine CD44v6-spezifische Antikörpertherapie zu sein.

Bei den Ergebnissen der akuten myeloischen Leukämie ist festzuhalten, dass lediglich das Forschungsteam unter Legras (1998) zu so einem hoch positiven Ergebnis von 73% kam. Alle anderen erreichten lediglich Werte von 7-16% (Bendall et al. 2000; Khaldoyanidi et al. 1996). Die Untersuchung anderer nicht-epithelialer Tumoren ergab entweder keine oder nur eine geringgradige Expression von CD44v6. Insgesamt betrachtet kann man sagen, dass bei den nicht-epithelialen Tumoren eine CD44v6-spezifische Therapie eher nicht zu verfolgen ist.

### **1.3 Antikörpertherapie und Antikörper Bivatuzumab**

#### **Mertansine**

Um die Eignung von CD44v6-spezifischen Antikörpern bei Tumorpatienten zu eruieren wurden viele Studien initiiert. Bei allen wurden radiomarkierte Antikörper verwendet.

#### **1.3.1 AK-Therapie bei hämatologischen Tumorerkrankungen**

Bei verschiedenen hämatologischen Tumorerkrankungen wie z.B. den Lymphomen wurden bereits antikörperbasierende Behandlungsstrategien erfolgreich eingesetzt, z.B. gegen CD20 gerichtete monoklonale Antikörper wie Rituximab. Therapeutische monoklonale Antikörper, die speziell Myelomzellen detektieren, sind momentan nicht verfügbar.

### **1.3.2 Antikörper Bivatuzumab Mertansine**

Bivatuzumab mertansine (Boehringer Ingelheim Pharma) ist ein Präparat, hergestellt ausgehend von mertansine, einem zytotoxischen Arzneimittel von der Familie der maytansines, und bivatuzumab. Es handelt sich hierbei um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, der speziell CD44v6 erkennt.

### **1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Trotz einer Vielzahl von Bemühungen hinsichtlich der Therapie des Multiplen Myeloms handelt es sich in der Mehrzahl der Fälle um eine nicht heilbare Erkrankung.

Beim Multiplen Myelom werden auch andere Isoformen des CD44 außer CD44v6 exprimiert, wie z.B. CD44v9. Auf dem Markt sind momentan aber keine Antikörper verfügbar, welche speziell an CD44v9 oder anderen Isoformen angreifen würden, außer Bivatuzumab mertansine. Bivatuzumab mertansine ist ein neues zytotoxisches Immunkonjugat, welches speziell Zellen mit CD44v6 detektieren und zerstören kann. Es wird bereits erfolgreich bei Tumoren des Oropharynx eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit drei Fragen:

1. Wie hoch ist die Inzidenz von CD44v6 beim Multiplen Myelom?
2. Besteht eine Korrelation zwischen CD44v6+ und anderen prognostischen Parametern beim Multiplen Myelom?
3. Könnte man beim Multiplen Myelom eine CD44v6-spezifische Antikörpertherapie in Erwägung ziehen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 57 Patienten untersucht, wovon 16 an einer MGUS, 38 Patienten an einem multiplem Myelom und 3 Patienten an einer Plasmazelleukämie erkrankt waren, die sich in der Medizinischen Klinik der Universität Ulm in dem Zeitraum von Dezember 2002 bis Dezember 2003 vorstellten. Der Großteil (51) der Patienten war zum Zeitpunkt der Analyse neu diagnostiziert worden und deshalb nicht vorbehandelt. Zwei MGUS-Patienten waren auf Grund eines Sjögren-Syndroms (n=1) und einer systemischen Amyloidose (n=1) mit Kortikosteroiden, vier Patienten mit MM zu einem früheren Zeitpunkt mit einer zytostatischen Therapie behandelt worden, zeigten aber zum Untersuchungszeitpunkt eine nachweisbare Tumorlast. Von 55 Patienten wurde Knochenmark und von 2 Patienten mit Plasmazelleukämie peripheres Blut untersucht. Der Zeitraum zwischen Probenentnahme und Aufarbeitung betrug zwischen ein und vier Stunden. 24 Patienten waren Frauen (42%), 33 (58%) Männer. Das mittlere Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Analyse bei 56 Jahren (33-82 Jahren). Die 38 MM-Patienten befanden sich gemäss der Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (Salmon, Durie, Cancer 1975) in folgenden Krankheitsstadien:

MM I=6 (16%), MM II=4 (11%), MM III=28 (73%).

3 Patienten litten an einer PCL (5%).

Zur Bestimmung eines Schwellenwertes für die CD44v6-Positivität wurde Knochenmark von 6 gesunden Probanden und 7 Patienten ohne eine monoklonale Gammopathie untersucht.

## 2.2 Durchflusszytometrie

### 2.2.1 Methodik

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem gleichzeitig physikalische und biochemische Eigenschaften von Einzelzellen in Zellsuspensionen gemessen werden können. Durchflusszytometer messen verschiedene optische Signale wie Lichtstreuung und Fluoreszenz, die beim Kontakt einer Zelle mit dem Lichtstrahl entstehen. Beim Messvorgang wird die Zellsuspension durch eine Mikrokapillare in den Durchflusszytometer (FACS = fluorescence activating cell sorter) geleitet. Hierbei wird durch einen Beschleunigungsvorgang erreicht, dass die Zellen einzeln hintereinander in einen Argonlaserstrahl geleitet werden. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle kommt es zur Streuung des Lichts entsprechend der physikalischen Eigenschaften der Zelle. Die Lichtstreuung wird als Vorwärtsstreulicht („Forward Angle Light Scatter“ = FSC) und orthogonal dazu als Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“ = SSC) erfasst, wobei das FSC die Zellgröße und das SSC die Granularität, Membranfaltung und die äußere Form erfasst. Mit Hilfe dieser beiden Lichtstreuparameter lassen sich die wichtigsten Leukozytensubgruppen wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten voneinander unterscheiden.

Neben der Lichtstreuung werden gleichzeitig auch an Zellen gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe der einzelnen Zellen bestimmt. Dies kommt dadurch zustande, dass bei der Probenaufbereitung mit Fluorochromen markierte Antikörper zugegeben werden, welche dann entsprechend der spezifischen Oberflächenstruktur der Zelle (z.B. CD138) binden. Durch die Anregung mit monochromatischem Licht spezifischer Wellenlänge kommt es zur Emission eines Fluoreszenzspektrums. In dieser Arbeit wurde ein Argonlaser mit einer Lichtwellenemission bei 488 nm gewählt. Die jeweiligen Fluorochrome unterscheiden sich durch ihre charakteristische Fluoreszenzfärbung. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind FITC (= Fluoreszeinisothiozyanat = gelbgrüne Fluoreszenz), PE (= Phycoerythrin = orange-rote Fluoreszenz) und PC5 (=

Tandemkonjugat bestehend aus R-Phycoerythrin und Cyanin = dunkelrote Fluoreszenz).

Die vom Durchflusszytometer (Epics XL flow cytometer, Firma Coulter) gemessenen Daten wurden von einem Computer erfasst, gespeichert und mit Hilfe eines speziellen Auswertungsprogramms (Expo 32<sup>®</sup>) analysiert.

Um die Leukozyten von restlichen Erythrozyten und Zelltrümmern abzugrenzen, muss man einen Schwellenwert („cut-off“) definieren, der den Ausschluss bestimmter Zellen abhängig von ihrer Größe erlaubt.

Durch das Setzen bestimmter Auswertungsfenster (sog. „Gates“) ist es somit möglich, Zellen mit spezifischen Eigenschaften zu separieren.

### **2.2.2 Aufarbeitung der Patientenproben**

Um die bei der Knochenmarkaspiration gewonnen größeren Gewebebestandteile (Spongiosa / retikuläre Fasern) im Untersuchungsmaterial zu zerkleinern, wurden diese Proben zuerst durch eine Kanüle in ein 25ml Plastikröhrchen (90x25 PP, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gespritzt. Von dieser Suspension wurde 1ml in ein 50ml Falcon-Röhrchen (Fa. Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) pipettiert. Um die mononukleären Zellen zu separieren, bzw. die Erythrozyten zu lysieren, wurde dem Knochenmarkspirat 20ml Lyse-Suspension zugesetzt, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde 10 Minuten bei 2.000 U/min. zentrifugiert (Labofuge GL, Fa. Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart-Fellbach, BRD). Der Überstand wurde abgesaugt (Membran-Vakuumpumpe, Fa. VACCUBRAND GmbH & Co, Wertheim, BRD) und das Zell-Pellet zweimal in 0,1%-igem PBS-BSA gewaschen und abzentrifugiert (2 Min. bei 3000 U/min. Dade Serocent, Fa. DADE Diagnostika GmbH, Unterschleißheim, BRD).

Je nach Leukozytenzahl erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 1ml (<20.000 Zellen/ $\mu$ l) oder 2ml (20.000-40.000 Zellen/ $\mu$ l) 0,1%-igem PBS-BSA, so dass eine Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml entstand. Um Ergebnisse der Durchflusszytometrie

vergleichen zu können, sollten standardisierte Bedingungen vorherrschen wie identische Zell- oder Antikörperkonzentration und Messvolumina. Um möglichst spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen zu erreichen und unspezifische Kreuzreaktionen zu vermeiden, sollte die Konzentration der Antikörper nicht zu hoch gewählt werden. Deshalb werden Färbevolumen von 50-100µl und Zellkonzentrationen von  $10^6$  –  $10^7$ /ml empfohlen (G. Schmitz, G. Rothe; „Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik“).

### 2.2.3 Markerprofile und Geräteeinstellungen

Jeweils 100µl Zellsuspension und 50µl PBP wurden in vier 5ml Plastikröhrchen pipettiert und die folgenden Anikörpern zugegeben (Schüttelgerät, Heidolph REAX 2000, Fa. VWR, Brüssel):

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Oberflächenmarkierung (FACS)

Röhrchen	Antikörperzusatz
1	+ 10µl Kontrolle (Maus IgG -FITC/-PE)
2	+ 10µl CD44v6-FITC + 10µl CD38-PE
3	+ 10µl CD44v6-FITC (Clone VFF-18) + 10µ CD138-PE
4	+ 10µl Kontrolle (Maus IgG-FITC/-PE) + 10µl CD138-PE

Zur Definition der Negativkontrolle wurde das Reagenz „Simultest Control m1/2a“ (IgG1 FITC/1gG2a-PE) verwendet. Es enthält FITC- und PE-markierte monoklonale Maus-Antikörper, die mit KLH (keyhole limpet hemocyanin) der Lochschnecke spezifisch reagieren. Es handelt sich hierbei um ein Antigen, welches humane Leukozyten nicht exprimieren, so dass es zu keiner spezifischen Bindung kommt. Durch den Nachweis dieser unspezifischen Bindung des Antikörpers auf humanen Zellen wird mit dem Kontrollreagenz die Grenze

## Material und Methoden

---

zwischen positiv und negativ fluoreszierenden Zellen bestimmt und somit falsch-positive Ergebnisse vermieden.

Bei dem CD44v6- und CD138-Antikörpern handelte es sich um monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes IgG1. Als monoklonaler Antikörper gegen CD44v6 wurde Klon VFF-18 (BMS125FI) verwendet.

Das jeweilige Gemisch wurde 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit 0,1%-igem PBS-BSA gewaschen und zentrifugiert (1 Minute, 3000 U/min.). Anschließend wurde das Pellet in 1ml 0,1%-igem PBS-BSA resuspendiert.

Pro Röhrchen wurden 100.000 Zellen im FACS analysiert, bzw. bei geringer Zellzahl nach einer maximalen Messzeit von 300 Sekunden abgebrochen.

Die Geräteeinstellung war wie folgt:

1. Discriminator: FS: 70  
SS: Off

2. Standard Detectors:

Tabelle 4: Geräteeinstellung: Standard Detectors

	<b>Name</b>	<b>Volts</b>	<b>Gain</b>
FS	FS	250	2
SS	SS	0	10
FL1	FITC	630	1
FL2	PE	700	1

### 2.2.4 Gating

Aus der Vielzahl der möglichen Darstellungsmethoden der gemessenen Werte wurde die der Zweiparameter-Punktehistogramm (dotplot)-Darstellung gewählt. Dies ermöglicht die Darstellung der Beziehung zweier Eigenschaften einer Zelle zueinander, z.B. die Korrelation von Größe und Granularität oder die der Grün- und Rotfluoreszenz. Jeder Punkt im Histogramm steht also für eine Zelle mit ihren beiden Eigenschaften.

Im Lichtstreudiagramm sind Zellen enthalten, die für die interessierende Fragestellung irrelevant sind. Deshalb gilt es, relevante Zellen abzugrenzen. Dabei ist die Parameterkombination Größe gegen Granularität hilfreich. Apoptotische Zellen beispielsweise weisen ein geringeres Vorwärtsstreulicht (FSC) auf als lebende.

Die vermutete Zellpopulation kann in einem Auswertungsprogramm eingegrenzt werden. Dieser Vorgang wird als „Gating“ bezeichnet, das gesetzte Fenster als „Gate“. Bei der weiteren Auswertung finden nur Ereignisse, respektive Zellen, innerhalb dieses Gates Berücksichtigung. Zur Gate-Kontrolle werden monoklonale Antikörper gegen für die Zellpopulation typische Antigene zugegeben, in diesem Fall CD138, welches Plasmazellen charakterisiert. So kann anhand der Immunfluoreszenz auf ein optimales Gate im Streulicht zurück geschlossen werden.

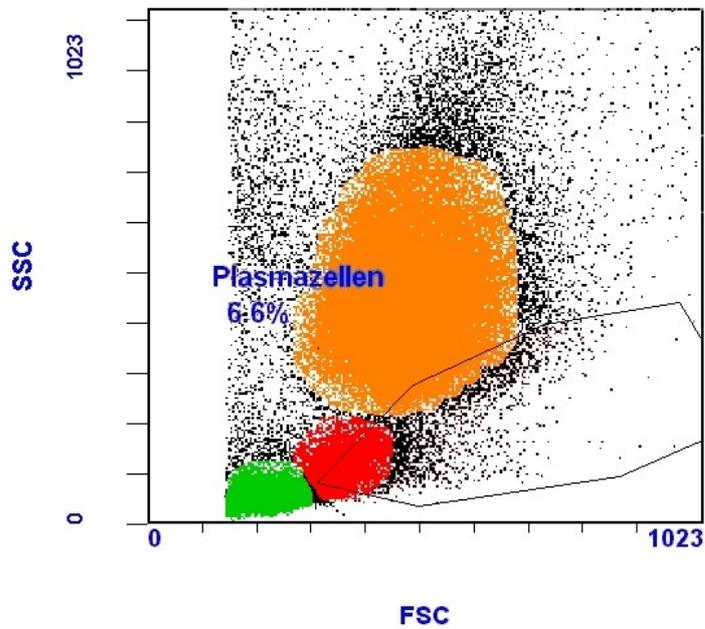


Abbildung 6: Scatterbild der Durchflußzytometrie eines gesunden Probanden.

Das Plasmazellgate ist schwarz eingerahmt. Farbig unterlegt sind folgende Aufenthaltsbereiche:

grün = Lymphozyten, rot = Monozyten, orange = Granulozyten.

SSC = Seitwärtsstreulicht (Side Scatter), FSC = Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter).

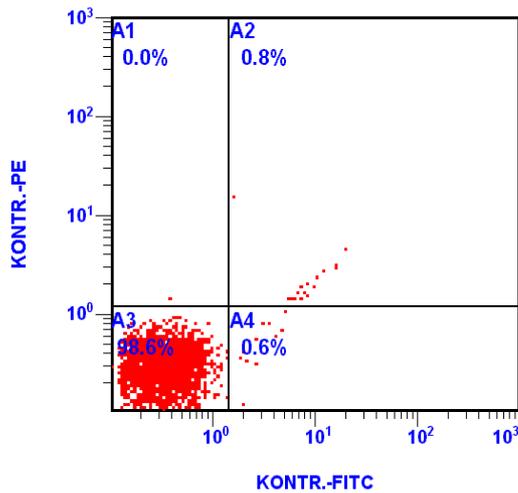


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Kontrolluntersuchung bei einem gesunden Probanden.

Fluoreszenzfarbstoffe sind PE = Phycoerythrin (orange-rot) und FITC = Fluoreszeinisothiozyanat (gelb-grün). A1-A4 definiert die jeweiligen Auswertungsquadranten mit der darin gelegenen Zellanzahl in Prozent.. In diesem Beispiel gibt es 0,0% unspezifische PE-Markierungen, 0,8% unspezifische FITC-/PE-Doppelmarkierungen und 0,6% unspezifische FITC-Markierungen. Einheit der x-und y-Achse: log-Intensität..

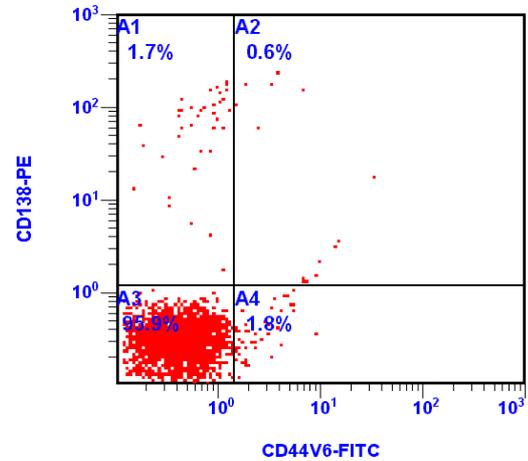


Abbildung 8: Durchflusszytometrische CD44v6/CD138-Markierung bei einem gesunden Probanden.

Fluoreszenzfarbstoffe sind PE = Phycoerythrin (orange-rot) und FITC = Fluoreszeinisothiozyanat (gelb-grün). A1-A4 definiert die jeweiligen Auswertungsquadranten mit der darin gelegenen Zellanzahl in Prozent. In dem ausgewählten Beispiel gibt es insgesamt 2,3% Plasmazellen, wovon aber nur 0,6% eine FITC-/PE-Doppelmarkierung besitzen. 1,8% besitzen eine isolierte FITC-Markierung. Einheit der x-und y-Achse: log-Intensität..

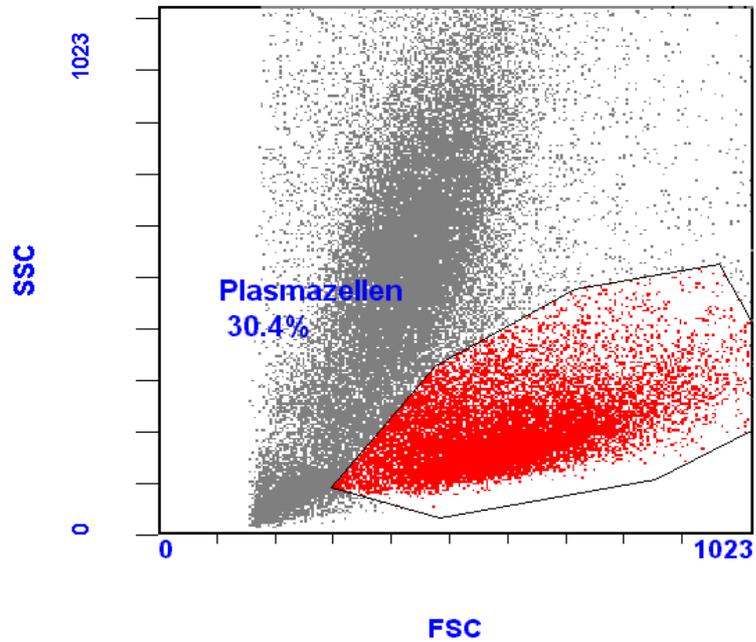


Abbildung 9: Scatterbild der Durchflußzytometrie eines Patienten mit Multiplem Myelom (MM).

Darstellung und Markierung des Plasmazellgates (rot unterlegt). Im Vergleich zum Plasmazellgate bei einem gesunden Probanden finden sich hier deutlich mehr Plasmazellen im gateden Bereich (30,4%). SSC = Side Scatter = Seitwärtsstreulicht, FSC = Vorwärtsstreulicht = Forward Angle Light Scatter.

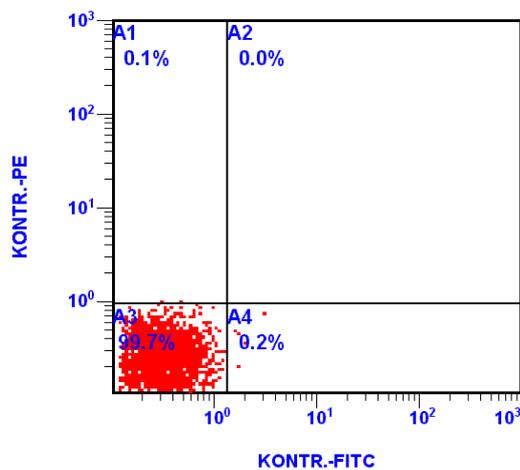


Abbildung 10: Kontrolluntersuchung bei einem Patienten mit Multiplem Myelom (MM).

Fluoreszenzfarbstoffe sind PE = Phycoerythrin (orange-rot) und FITC = Fluoreszeinisothiozyanat (gelb-grün). A1-A4 definiert die jeweiligen Auswertungsquadranten mit der darin gelegenen Zellanzahl in Prozent. In diesem Beispiel gibt es 0,1% unspezifische PE-Markierungen, 0,0% unspezifische FITC-/PE-Doppelmarkierungen und 0,2% unspezifische FITC-Markierungen. Einheit der x-und y-Achse: log-Intensität..

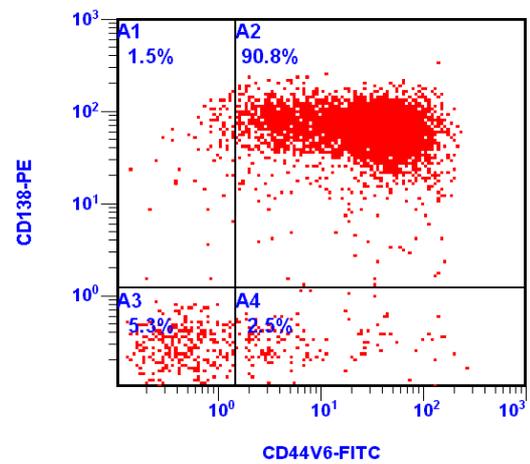


Abbildung 11: CD44v6/CD138-Markierung bei einem Patienten mit Multiplem Myelom (MM).

Fluoreszenzfarbstoffe sind PE = Phycoerythrin (orange-rot) und FITC = Fluoreszeinisothiozyanat (gelb-grün). A1-A4 definiert die jeweiligen Auswertungsquadranten mit der darin gelegenen Zellanzahl in Prozent. In dem ausgewählten Beispiel gibt es im Vergleich zum gesunden Probanden in dem gewählten Gate insgesamt 92,3% Plasmazellen, wovon 90,8% eine FITC-/PE-Doppelmarkierung besitzen. 2,5% besitzen eine isolierte FITC-Markierung. Einheit der x-und y-Achse: log-Intensität..

## **2.3 Stabilität von CD44v6**

Da es sich bei der Immuntypisierung um ein aufwendiges Analyseverfahren handelt, kann es nur in speziellen Labors durchgeführt werden. Deshalb stellt sich immer wieder die Frage, ob es möglich ist, Blut- oder KM-Proben den jeweiligen Zentren zukommen zu lassen, denen diese Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen. Dies ist wesentlich von der Stabilität des zu bestimmenden Oberflächen-Antigens abhängig.

Deshalb fertigten wir in der vorliegenden Arbeit bei vier Proben, die bei der ersten Messung deutlich CD44v6 positiv waren, serielle Untersuchungen über drei Tage an. Dabei wurde das jeweilige Patientenmaterial im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und zu folgenden Zeitpunkten gemessen: Stunde 0, 24, 48. Die Aufarbeitung, Markierung und Messung erfolgte wie oben beschrieben.

## **2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)**

### **2.4.1 FISH - Zellpräparation**

Um die mononukleären Zellen bei der FISH unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, muss man diese zunächst einmal isolieren. Die Zellpräparation wird in zwei Arbeitsschritte unterteilt:

- A) Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Knochenmark und Anreicherung der Plasmazellen
- B) Zytospinpräparation der angereicherten Zellen mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge

Knochenmark wurde mit Natrium-Heparin im Verhältnis 1:10 vermischt und zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion mit RPMI 1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 20ml versetzt. 20ml Separationsmedium (Ficoll Separating

Solution) wurden in ein 50ml Falcon-Röhrchen (Fa. Becton Dickinson and Company, Franklin-Lakes, USA) pipettiert und vorsichtig mit 20ml verdünnter Knochenmark überschichtet. Diese Röhrchen wurden dann für 20 Minuten bei 2.800 U/Min. ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Zentrifuge Model Minifuge T, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland). Danach konnten die mononukleären Zellen mit einer sterilen Pipette aus der sogenannten Interphase abgenommen werden. Die Interphase stellt die Grenzschicht zwischen Separationsmedium und dem sich darüber befindenden Plasma dar. Die so gewonnenen Zellen wurden in ein 50 ml Plastikröhrchen gegeben, zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und anschließend abzentrifugiert (10 Min. bei 1.200 U/Min.).

Anschließend wurden jeweils  $0,5 - 1 \times 10^5$  Zellen auf zwei Objektträger (Superfrost color, G. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig, Deutschland) aufzentrifugiert (5 Min. bei 400 U/Min., langsame Beschleunigung). Mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Axioskop, Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Präparate sowohl auf Zelldichte als auch auf Zellqualität untersucht. Das Ziel war eine gleichmäßige Zellverteilung ohne Überlagerungen von Zellen. Gleichzeitig wurde auf Grund der Morphologie der Zellen eine orientierende Bestimmung des Anteils von Plasmazellen vorgenommen.

Bei einem Plasmazellanteil von unter 10% erfolgte eine Positivselektion der Plasmazellen. Hierfür wurde für je  $4 \times 10^7$  Zellen 20µl CD138-spezifische Microbeads (MACS R CD138 Microbeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) und 180µl eines sogenannten Running Buffer (MiniMacs-Puffer, 1xPBS + 2 mM EDTA + 0,5%BSA, pH 7,2) angesetzt und bei 4 Grad Celsius für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe in 1-2 ml eines Waschpuffers (Rinsing Solution, 1 x PBS + 2 mM EDTA) gewaschen und danach zentrifugiert (2 Min. bei 5.000 U/Min.). Das Pellet wurde dann in 1ml Running Buffer aufgenommen. Daraufhin erfolgte die automatisierte Zellseparation (AutoMACS®, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) durch positive Zellselektion.

Pro Objektträger wurden  $0,5-1 \times 10^5$  Zellen aus den angereicherten Proben mittels Zytospinzentrifuge aufzentrifugiert. Auf diese Weise wurden 24 bis 36 Zellpräparate pro Patient hergestellt. Die Präparate wurden über Nacht luftgetrocknet, danach in einer Alkoholreihe von aufsteigender Konzentration

(70%, 90%, 100% Ethanol, jeweils 3 Minuten) dehydriert. Anschließend wurden sie luftdicht in Plastikfolie verschweißt und bei -20 Grad Celsius gelagert.

### **2.4.2 FISH- DNA-Sonden und Nick-Translation**

Für den Nachweis genomischer Imbalancen in der Region 13q14 wurde der PAC-272/3-DNA-Klon verwendet.

Zur Identifikation der Plasmazellen wurde die typische Morphologie und eine Immunzytologie angewendet. Für die Immunzytologie wurde ein Antikörper gegen den tumorspezifischen Leichtkettentyp Lambda oder Kappa verwendet, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMCA (7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Essigsäure) markiert ist.

Zur spezifischen Markierung von Sonden-DNA kam die Methode der Nick-Translation zum Einsatz. Dabei werden chemisch modifizierte Desoxyribonukleosid-Triphosphate in die Sonden-DNA eingebaut. Nach der Hybridisierung wird die so veränderte DNA durch Fluoreszenz-Antikörper im Interphasekern nachweisbar gemacht. Werden der DNA niedrige Konzentrationen von DNase I zugegeben, so entstehen Einzelstrangbruchstücke (engl. „nicks“). Diese „nicks“ können durch das Enzym DNA-Polymerase I, welches aus E. coli gewonnen wird, wieder geschlossen werden, wobei den Basen des intakten DNA-Stranges unter Abspaltung von Pyrophosphat komplementäre Desoxyribonukleosid-Triphosphate in das Molekül eingebaut werden. Neben dATP, dCTP und dGTP können der DNA-Polymerase auch veränderte Nukleotide zur Verfügung gestellt werden, wie z.B. digoxigeniertes oder biotinyliertes 16-dUTP. Auf diese Art und Weise können diese Reportermoleküle an den statistisch verteilten Stellen in der DNA eingebaut werden (Langer et al. 1981, Heiles et al. 1988). Durch die DNase wird die Sonden-DNA in kurze Fragmente geschnitten. Die Länge sollte zwischen 200 und 500 Basenpaare betragen. Dieser Teilverdau erleichtert der DNA die Penetration durch die Kernmembran.

Der Reaktionsansatz für die Nick-Translation von 3µg DNA beinhaltete folgende Stoffe: 3µg Sonden-DNA, 10µl 10x konzentrierter Puffer, 10µl Biotin-16-UTP + ACG-Mix oder Digoxigenin-16-UTP + ACG-Mix, 10µl β-Mercaptoethanol, 1,5µl DNase-I-Stammlösung (1:500 verdünnt) und 3µl DNA-Polymerase I aus *E. coli* 10<sup>4</sup> Units/ml and 100µl Aqua distillata.

Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 15°C in einem 1,5ml-Plastikröhrchen (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD) inkubiert. Daraufhin wurde die DNA-Fragmentlänge geprüft, indem ein Aliquot des Reaktionsansatzes mit 1 µl Bromphenol-Xylencyanol (1:1) vermischt wurden. Dieses Gemisch wurde auf ein Agarose-Gel neben einem 1 Kilobasen-Größenmarker (1 Kb DNA Ladder) aufgetragen und bei 160 Volt für 45 Minuten im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid für 15 Minuten. Danach konnten die DNA-Fragmente mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 2µl 0,5M EDTA und 1µl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat) angehalten, wenn die DNA-Fragmente die geforderte Länge erreicht hatten. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 65°C auf einen Heizblock gegeben. Danach wurde der Ansatz von überschüssigen Nukleotiden gereinigt, indem es über 1ml Sephadex G 50-Säulen abzentrifugiert wurde. Danach wurde das Eluat bei -20°C gelagert.

### **2.4.3 FISH – Hybridisierung**

In dieser Arbeit wurde die Chromosomale-In-Situ-Suppressions (CISS)-Hybridisierung angewendet (Cremer et al. 1988, Lichter et al. 1988), welche den Gebrauch von Sonden-DNA erlaubt, die hochrepetitive Sequenzen enthält. Um unspezifische Bindungen der DNA-Sonden zu verhindern, muss diesen hochrepetitiven Sequenzen humane Cot-1 DNA aus Plazentagewebe, die selbst hochrepetitive Sequenzen enthält, hinzugefügt werden.

Der nächste Schritt des Versuchs wird als Preannealing bezeichnet. Hierbei wird der denaturierten Cot-1 DNA die Möglichkeit gegeben, sich an die hochrepetitiven

Sequenzen der Sonden-DNA zu binden, welche ebenfalls in einzelsträngiger Form vorliegt. Nach wenigen Minuten ist das Preannealing abgeschlossen und die Sonden-DNA wird auf den Objektträger gegeben. Dieser Ansatz wird für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieses Vorgangs binden die komplexen Einzelsequenzen an ihre komplementäre Zielsequenz.

Zur Vorbereitung der Patienten-DNA wurde das bei -20°C aufbewahrte Zytospinpräparat vorsichtig aufgetaut und erwärmt (jeweils 30 Minuten bei 4°C, Raumtemperatur, 37°C und 60°C). Nachfolgend wurde der Objektträger für 3 Minuten mit Pepsin behandelt (2ml Pepsin (mg/ml) in 98ml 0,01N HCl bei 37°C). Diese Behandlung ist notwendig, um den Zellkern und das Zytoplasma der Plasmazellen für die DNA-Sonden durchlässiger zu machen. Anschließend erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur ein Waschgang mit 1xPBS (Phosphate buffered saline), woran sich ein Fixierungsvorgang mit 1%iger Paraformaldehydlösung anschloss, ebenfalls bei Raumtemperatur. Nach einem wiederholten Waschschrift (1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur) erfolgte die Vorbereitung des Objektträgers zur Denaturierung. Hierfür wurde dieser in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Prozentzahl (70%, 90%, 100%) bei Raumtemperatur gegeben und anschließend in einem Ofen für 10 Minuten bei 60°C erwärmt. Die eigentliche Denaturierung erfolgte für genau 4 Minuten bei 72°C in deionisiertem Formamid (70%ig in 2xSSC/pH 7,0). Daraufhin wurde der Objektträger wieder in einer Alkoholreihe dehydriert und anschließend 1 Minute auf einem 37°C erwärmten Heizblock getrocknet.

Die parallel dazu erfolgende Vorbereitung der Sonden-DNA ging folgendermaßen vor sich:

in einem 1,5ml Plastikbehälter (Firma Eppendorf) wurden jeweils 10µg Cot-1 DNA, 1µg Lachssperma-DNA als Träger sowie 200µg einer digoxigenierten und einer biotinylierten DNA-Sonde vermischt. Diesem Ansatz wurde 3 M Natriumacetat/pH 5,2 (1/20 des DNA-Volumens) und 100%iges Ethanol (2,5faches des DNA-Volumens) zugesetzt und das Gemisch für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (Biofuge fresca, Firma Heraeus

Osterode, BRD) für 15 Minuten mit 13.000 U/Min. bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 400µl 70%igem Ethanol, welches 4°C kalt sein musste, für 15 Minuten mit 13.000 U/Min. gewaschen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Hicksvill, USA) getrocknet. Daraufhin wurde dem getrockneten Pellet 5µl deionisiertes Formamid zugegeben und es wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Des weiteren wurde dann zur weiteren Resuspendierung des Pellets 5µl Hybridisierungspuffer [4xSSC (saline & sodium citrat), 20% Dextransulfat] hinzu gegeben und erneut 15 Minuten geschüttelt. Letztendlich wurde auf einem Heizblock die DNA denaturiert (6 Minuten bei 75°C). Anschließend wurde sie für 8 Minuten auf einem 37°C warmen Heizblock zum Preannealing belassen.

Zur folgenden Hybridisierung wurde die Sonden-DNA luftblasenfrei auf das Hybridisierungsareal des Objektträgers aufgetragen und mit einem Deckglas (18x18 mm) bedeckt. Zur Abdichtung wurde entlang der Ränder des Deckglases Klebstoff (Fixogum Rubber Cement) gegeben. Das Präparat wurde daraufhin bei 37°C über Nacht, mindestens 12 Stunden, in einer feuchten Hybridisierungskammer belassen.

### **2.4.4 FISH – Detektion**

Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte mittels eines Pipettier-Roboters (Tecan RSP Genesis mit Gemini Pipettier-Software, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim), wofür die Objektträger mit Abstandshalter und Deckglas in das Gerät eingespannt wurden.

Nach den durchgeführten Waschschritten mit Formamid (50%ig in 2xSSC/pH 7,0; 200µl 3x5 Min. bei Raumtemperatur) und 0,5xSSC (200µl 3x5 Min. bei Raumtemperatur) erfolgte dann das sog. „Blocking“. Hierfür wird zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der DNA-Sonden an Proteine der Objektträger mit 200µl 3%igem Bovinem Serumalbumin (BSA) in 4xSSC (saline & sodium citrat) für

30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wird der Objektträger ebenfalls für 30 Min. bei Raumtemperatur mit verdünnten antikörpergekoppelten Fluorochromen (6µl Anti-Digoxigenin-Fluorescein bzw. 1µl Streptavidin-Cy3 in 200µl 1,5%igem BSA/4xSSC) überschichtet. Durch einen erneuten Waschvorgang mit 200µl 4xSSC/0,1% Tween 20 (3x5 Min. bei Raumtemperatur) wurde der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff vom Präparat abgewaschen. Danach erfolgte ein kurzer Waschgang mit 200µl 1xPBS.

Für den immunzytologischen Nachweis von Plasmazellen wurde ein Antikörper gegen den tumorspezifischen Leichtkettentyp Kappa oder Lambda, welcher an den Fluoreszenzfarbstoff AMCA (7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Essigsäure) gekoppelt ist, verwendet. Hierfür wurde auf das Hybridisierungsareal 10µl verdünnte Lösung mit AMCA-Antikörper pipettiert und mit einem 18x18 mm Deckglas bedeckt, welches mit Klebstoff umrandet wurde. Die Inkubationszeit betrug mindestens 5 Stunden. Danach wurde der Objektträger in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde 15µl Vectashield™ mounting medium auf den Objektträger gegeben und mit einem 24x50 mm Deckglas bedeckt. Diese Lösung schützt die Fluorochrome vor dem Ausbleichen.

Trisomie 9q (Sonde: PAC 40-A-07 – rote Hybridisierungssignale) und Normalbefund von Chromosom 13q (Sonde: PAC 272/3#1 – grüne Hybridisierungssignale) bei einem Multiplen Myelom Typ IgG Kappa.

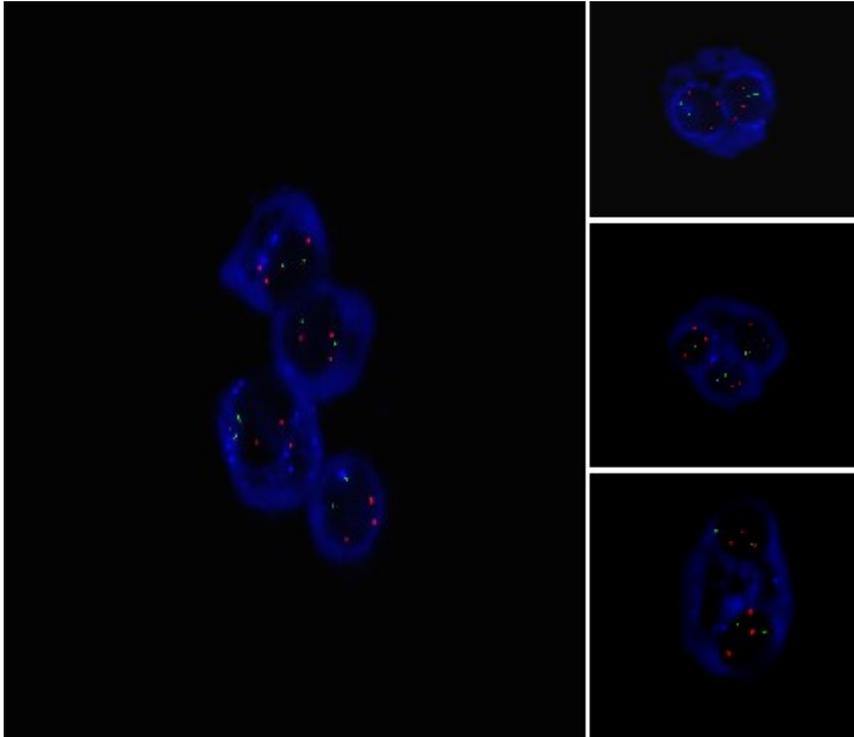


Abbildung 12: FISH - Detektion

Trisomie 9q (Sonde: PAC 40-A-07 – rote Hybridisierungssignale) und Normalbefund von Chromosom 13q (Sonde: PAC 272/3#1 – grüne Hybridisierungssignale) bei einem Multiplen Myelom Typ IgG Kappa.

Linkes Bild : Vier mononukleäre Myelomzellen.

Rechte Bilder: Doppel-/Mehrkernige Tumorzellen. Immunzytologie mit AMCA-gekoppeltem Antikörper gegen Kappa-Leichtkette.

### 2.4.5 FISH - Auswertung

Die Präparateauswertung erfolgte an einem Mikroskop vom Typ Axioskop (Fa. Zeiss, Jena, BRD). Es wurden Filter für DAPI, Rhodamin und FITC verwendet und die Photodokumentation erfolgte über eine CCD (Charge Coupled Device)-Kamera vom Typ Xillix. Die Bearbeitung der Bilder wurde mit Hilfe von ISIS Metasystem (Fa. Metasystem, Altlußheim, BRD) und Adobe Photoshop™, Version 6,0 (Fa. Adobe) durchgeführt. Mittels morphologischer Kriterien einer Plasmazelle wie z.B. der exzentrischen Lage des Zellkerns einerseits und der Immunzytologie

andererseits erfolgte die Identifikation von Plasmazellen. Pro Patient wurden mindestens 100 AMCA-positive Plasmazellen ausgewertet.

Im Hybridisierungsexperiment wurden immer zwei DNA-Sonden kombiniert angewendet. Davon durfte höchstens eine Sonde eine Deletion zeigen, d.h. es durfte sich nur ein Hybridisierungssignal pro Zelle darstellen.

## 2.5 Statistik

Um zu ermitteln, ob zwischen der CD44v6-Positivität und der 13q-Deletion bei Patienten im Stadium II, III und solchen mit einer PCL eine signifikante Korrelation besteht, wurde *Fisher's Exact Test* durchgeführt. Dieser Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit der Variablen und liefert auch bei einer kleinen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate, weshalb er in dieser Arbeit verwendet wurde.

Ein Test ist signifikant, wenn der errechnete p-Wert bei  $p \leq 0,05$  (Signifikanzniveau) liegt und hochsignifikant, wenn der p-Wert bei  $p \leq 0,01$  liegt.

## 2.6 Reagenzien und Antikörper

Die nachfolgend aufgeführten Reagenzien und Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 5: Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien und Antikörper

Agarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
AMCA-Antikörper	Fa. Vector, Burlingame, USA
Anti-CD38-PE	Fa. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-CD38-PC5	Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-CD44var(v6) BMS125FI-FITC Clone: VFF-18	Fa. Bender MedSystems, Wien, Österreich
Anti-CD138-PE	Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-Kappa Light chains-PE	Fa. DakoCytomaion, Glostrup, Dänemark
Anti-Digoxigenin-Fluorescein	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
Anti-Lambda Light chains-PE	Fa. DakoCytomaion, Glostrup, Dänemark
Aqua bidest	Fa. Braun, Melsungen, BRD
Bovines Serumalbumin (Rinderalbumin, BSA)	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics GmbH, Neckargmünd, BRD
10 x Blue Juice TM Gel Loading Buffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
1 kb DNA Größenmarker (1 kb DNA Ladder)	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
DNA-Polymerase I (E. coli)	Fa. New-England-Biolabs, Beverly, USA
DNase I	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Fa. Roth, Karlsruhe, BRD
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haën, Seelze, BRD
Ethidiumbromid	Fa. Eurobio, Les Uilles, Frankreich
Ficoll Separating Solution (Density 1,077)	Fa. Biochrom KG, Berlin, BRD
Fixogum Rubber Cement	Fa. Marabu, Tamm, BRD
Formamid	Fa. T.J. Baker, Deventer, Holland

## Material und Methoden

---

HCl (Salzsäure)	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Humane COT-1 DNA	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
IntraPrep™ Permeabilization Reagent 2	Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich
IntraPrep Fixation Reagent 1	
IOTest 3 Lysing solution 10 x concentrated	Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich
Lachs-DNA	Fa. Sigma, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Microbeads CD138	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Crailsheim, BRD
Methanol	Fa. Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Natrium-Heparin	Fa. Braun, Melsungen, BRD
Nukleotide:	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
a) dATP, dCTP, dGTP, dTTP	
b) Biotin-16-dUTP	
c) Digoxigenin-11-dUTP	
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck, Darmstadt, BRD
PBS	Fa. Gibco, Scotland, UK
10x PBS Puffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Pepsin	Fa. Böhringer, Mannheim, BRD
Pferdeserum	Fa. Biochrom AG, Berlin, BRD
RPMI 1640 Waschmedium	Fa. Biochrom AG, Berlin, BRD
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Sephadex G 50	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Simultest Control γ1/γ2a (IgG1 FITC(IgG2a PE) Reagenz	Fa. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Streptavidin-Cy3	Fa. Dianova, Hamburg, BRD
Tris-HCl (Tris-Puffer)	Fa. Roth, Karlsruhe, BRD
Tween 20	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Vectashield™ mounting medium	Fa. Vector, Burlingame, USA

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung des Schwellenwerts für die CD44v6-Positivität auf Plasmazellen

Um bei Patienten mittels Durchflusszytometrie die CD44v6-Positivität definieren zu können, war es notwendig, einen Schwellenwert für CD44v6 und CD138 positive (CD44v6+/CD138+)Plasmazellen bei gesunden Menschen zu bestimmen. Dafür erfolgte die Untersuchung von 13 Kontrollproben, wovon 6 gesunde Probanden und 7 hämatologische Patienten ohne monoklonale Gammopathie waren. Der Prozentsatz der CD44v6/CD138-Positivität variierte zwischen 0% und 4%. Der Schwellenwert wurde als Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung aus den Prozentwerten der Kontrollproben auf +/-5% berechnet.

Folgende Tabelle beschreibt die Ergebnisse der FACS-Analyse. Es handelt sich dabei um 6 gesunde Personen und um 7 hämatologische Patienten ohne monoklonale Gammopathie.

Tabelle 6: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung des Schwellenwerts der CD44v6-Positivität

<b>Proband No.</b>	<b>Gated cells (%)</b>	<b>CD44v6+/ CD38+ (%)</b>	<b>CD44v6+/ CD138+ (%)</b>
1	10	9	4
2	6	7	0
3	7	4	2
4	7	3	1
5	12	4	1
6	10	6	0
7	6	3	0
8	7	8	0
9	9	3	1
10	10	11	0
11	7	8	0
12	9	4	0
13	5	1	1

### 3.2 Ermittlung der Inzidenz der CD44v6 Expression bei Patienten mit MGUS und MM I

Zur Bestimmung der Inzidenz der CD44v6 Expression bei Patienten mit MGUS und MM im Stadium I wurden 22 Patienten mit diesen Erkrankungen untersucht. Da das Oberflächenantigen CD138 spezifischer für Plasmazellen ist als das CD38, wurden die Gates bei der Untersuchung der Knochenmarkaspirate nach der Positivität für CD138 gesetzt. Die so charakterisierten Plasmazellen in diesem Gate wurden nun auf eine Koexpression mit CD44v6 untersucht. Die Ergebnisse sind der Tabelle 8 zusammengefasst. Daraus kann man erkennen, dass nur ein Patient mit MGUS und ein Patient mit MM I CD138 und CD44v6 positiv war (rot unterlegt), was einer Inzidenz von 9,1% entspricht. Die restlichen Patienten zeigten keine positive CD138/CD44v6 Koexpression.

In der Tabelle 7 erfolgt eine Zusammenfassung der Inzidenz bei der MGUS und beim MM I.

Tabelle 7: Inzidenz von CD44v6 bei MGUS und Multiplem Myelom Stadium I

Krankheitsstadium	Patientenanzahl	Inzidenz (CD44v6)
MGUS	n=1/16	6,25%
MM I	n=1/6	16,7%



### 3.3 Ermittlung der Inzidenz von CD44v6 bei Patienten mit MM II, MM III und PCL

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die CD44v6 positiven Fälle signifikant mit dem Tumorstadium korrelieren ( $p=0.02$ ; Fisher's exact test). Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Daraus ist ersichtlich, dass drei von vier Patienten im Stadium IIA CD44v6/CD138 positiv waren, was einer Inzidenz von 75% entspricht. Bei den Patienten im Stadium III nach Salmon und Durie waren 9 von 25 CD44v6/CD138 positiv, entsprechend einer Inzidenz von 36%. Bei den Plasmazelleukämien waren zwei von drei Patienten CD44v6 positiv, was einer Inzidenz von 67% gleichkommt. Tabelle 9 fasst diese Ergebnisse nochmals zusammen.

In der Gruppe der CD44v6 positiven Patienten schwankte der Prozentsatz der CD44v6 positiven Plasmazellen zwischen 6 und 82 (Median: 28%). Die Dichte der CD44v6-Expression in der Durchflusszytometrie wurde als „niedrig“ und „hoch“ klassifiziert. Dabei zeigte sich in 11 Fällen eine niedrige und in 6 Fällen eine hohe Dichte des Epitops CD44v6 auf Plasmazellen.

**Tabelle 9: Inzidenz von CD44v6 der Krankheitsstadien II und III beim Multiplen Myelom und bei Plasmazelleukämie.**

Krankheitsstadium	Patientenanzahl	Inzidenz (CD44v6)
MM II	n=3/4	75%
MM III	n=9/25	36%
PCL	n=2/3	66,6%

## Ergebnisse

Tabelle 10: Übersicht über klinische Daten und die durchflusszytometrischen Ergebnisse bei MM II-, MM III- und PCL-Patienten.

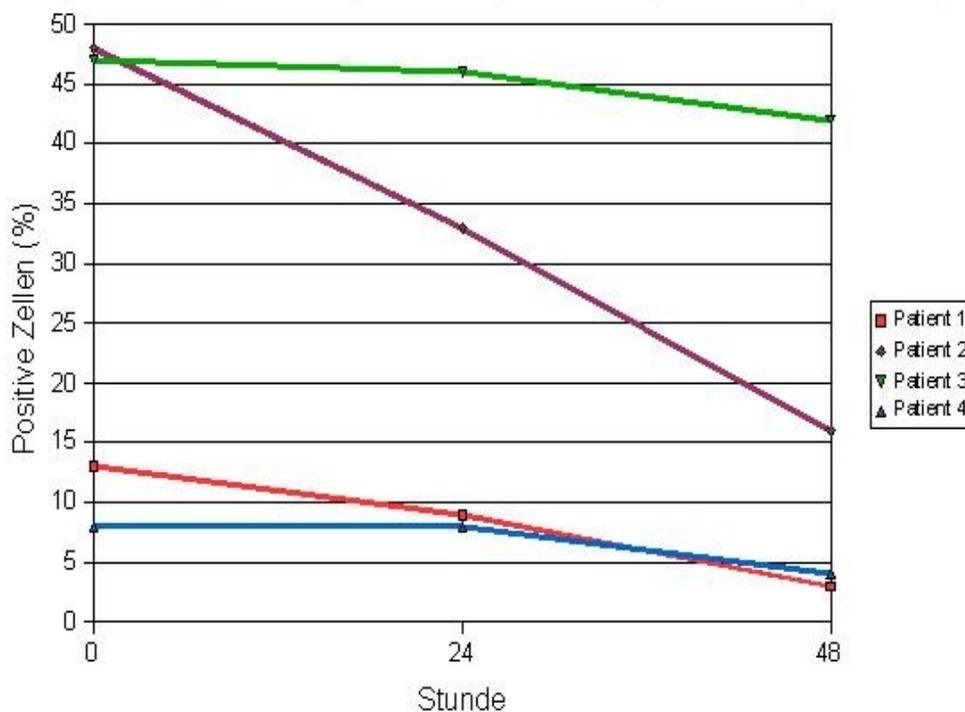
Patientennummer	Alter (Jahre)	Stadium (Durie und Salmon)	Vortherapie	Isootyp	Hb (g/dl)	LDH (U/l - bis 240)	Kreatinin (µmol/l)	Kalzium (mmol/l - bis 2,65)	Gesamteiweiß (g/l - bis 83)	β2-MG (mg/l)	CD44v6- / CD138+ (%)	CD44v6+ / CD138+ (%)	13q14	17p13
23	64	II A	N	IgG L	11,2	298	86	2,31	114	4,37	5	55	del	di
24	62	II A	J	IgA L	11,9	113	399	2,12	62	14,8	10	25	di	di
25	53	II A	J	IgG K	10,2	114	103	2,22	103	2,88		0	di	di
26	65	II A	N	BJ K	8,7	218	76	2,41	72	4,48		0	del	X
27	68	III A	N	IgG K	12,0	206	132	2,62	84	2,89		2	del	del
28	33	III A	N	IgA K	11,5	203	98	2,21	74	2,07	8	20	del	di
29	53	III A	N	IgG K	10,0	112	76	2,05	78	1,88	4	6	del	di
30	64	III A	J	IgA L	12,2	108	102	2,36	72	2,42	41	11	del	di
31	74	III A	N	IgG L	14,3	210	78	2,32	68	2,80	13	82	del	di
32	49	III A	N	IgG L	10,6	67	140	2,27	86	6,9	38	43	del	di
33	68	III A	N	IgG L	12,4	92	142	2,18	117	3,9		4	tetra	tetra
34	64	III A	J	IgG L	9,7	130	175	2,49	110	14,7		2	del	di
35	63	III A	J	IgG K	11,8	96	106	2,42	100	3,65		2	di	di
36	57	III A	N	IgG L	8,6	100	101	2,35	>120	2,21		0	di	X
37	45	III A	N	IgG K	8,8	84	122	2,25	115	4,14	34	36	di	di
38	58	III A	J	BJ K	9,6	195	85	2,37	71	2,33		1	del	X
39	53	III A	N	BJ K	13,0	152	105	2,25	78	2,07		5	di	di
40	54	III A	N	IgG K	10,0	93	101	2,37	155	3,56		2	di	di
41	81	III A	N	BJ K	9,7	168	241	2,48	77	8,12		1	di	di
42	47	III A	N	IgG K	11,4	184	100	2,02	109	1,65		4	di	di
43	61	III A	N	IgG L	14,1	136	90	2,15	80	2,38	6	13	del	di
44	57	III A	N	IgG K	10,9	146	96	2,23	111	2,92		1	del	di
45	54	III A	N	IgG K	10,1	168	112	2,64	119	8,08		4	del	X
46	60	III A	N	IgG K	11,6	169	105	2,22	109	3,21	66	8	del	X
47	52	III A	N	IgG K	10,3	162	91	2,21	118	2,44	33	10	del	X
48	41	III A	J	IgG K	11,8	118	69	2,16	80	1,84		1	del	di
49	52	III A	N	IgA K	13,7	101	120	2,35	99	3,13		0	di	X
50	45	III B	N	IgG K	7,2	259	256	3,09	90	8,75	1	82	del	di
51	61	III B	N	BJ K	10,6	209	307	2,40	72	10,9		0	di	di
52	56	III B	N	BJ K	13,5	168	183	1,87	63	5,67		2	di	di
53	69	III B	N	IgG K	8,9	147	257	3,10	66	8,79	84	6	del	di
54	42	III B	J	BJ K	11,2	216	620	2,88	77	n.d.		1	di	X
55	55	PCL	J	(IgG) L	8,0	245	81	2,19	72	3,04		1	di	di
56	75	PCL	N	IgG L	12,4	732	145	N	101	n.d.	60	28	di	di
57	50	PCL	N	(IgG) K	9,7	184	58	2,50	63	4,34	20	47	del	del

### 3.4 Stabilität von CD44v6

Wie zu Beginn in der Einleitung bereits erwähnt stellte sich die Frage danach, wie stabil das Epitop CD44v6 beim Transport ist. Um diese Frage beantworten zu können, wurden CD44v6 positive Proben von vier Patienten an drei aufeinander folgenden Tagen untersucht. Die graphische Darstellung des Ergebnisses ist der Abbildung 13 zu entnehmen. Daraus ist ersichtlich, dass die Expression von CD44v6 nach 24 Stunden im Durchschnitt um 16% und nach 48 Stunden um weitere 44% abgenommen hat. Insgesamt ergab sich bei diesen vier Patienten ein Epitopverlust von 51% in zwei Tagen.

Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Empfindlichkeit des CD44v6-Antigens, wobei der größte Verlust in dem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden gemessen wurde. Aus diesem Grund ist eine unverzügliche Aufarbeitung der gewonnenen Patientenproben anzustreben, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Abbildung 13: Zeitkinetik der CD44v6-Positivität. Es zeigt sich ein deutlicher Verlust des Epitops.



### 3.5 Korrelation der CD44v6 Expression mit 13q14-Deletion und anderen Risikofaktoren

Sowohl für die Prognose, als auch für eine Therapieplanung sind beim MM bestimmte Risikofaktoren von Bedeutung. Hierzu gehört - wie in der Einleitung bereits erwähnt -  $\beta$ 2-Mikroglobulin als Indikator für die Tumorlast und das Vorhandensein einer 13q14-Deletion. In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten ebenfalls auf diese klinischen Parameter hin untersucht. Eine Übersicht der Ergebnisse ist den Tabellen 8 und 10 zu entnehmen.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der CD44v6-Positivität und 13q14-Deletion ( $p=0,01$ ; Fisher's exact test). Im Gegensatz dazu konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von CD44v6 und einem erhöhten  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen werden ( $p=1,0$ ; Fisher's exact test).

Tabelle 11: Korrelation von CD44v6 und der 13q14-Deletion.

$p=0,01$  (Fisher's exact test)

	<b>13q-Deletion</b> n=24	<b>Keine 13q-Deletion</b> n=33
<b>CD44v6+</b> n=17	n=12 <b>70,6%</b>	n=5 29,4%
<b>CD44v6-</b> n=40	n=13 32,5%	n=27 67,5%

## 4 Diskussion

In immunhistochemischen Studien wurde eine beinahe ubiquitäre Expression von CD44v6 bei verschiedenen Typen von Plattenepithel- und Adenocarcinomen festgestellt (10-100%), wohingegen dieses Epitop nur in einer Subgruppe von Patienten mit MM detektiert werden konnte (22%) (Heider et al. 2004). Nachdem nun Antikörper, welche speziell CD44v6 detektieren können, entwickelt wurden und zudem erfolgreich in der Therapie bestimmter Tumorerkrankungen eingesetzt werden, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit nun mit der Fragestellung, wie hoch die Inzidenz dieses Epitops bei klonalen Plasmazellerkrankungen ist, und ob sich daraus eventuell ein neuer therapeutischer Ansatz bei diesen bisher zumeist unheilbar verlaufenden Krankheiten ergeben könnte. Dazu wurden 57 Patienten, wovon 16 an einer MGUS, 38 an einem MM und 3 an einer PCL erkrankt waren, mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Zusätzlich wurden 13 gesunde Probanden bzw. Patienten untersucht, welche nicht an einer monoklonalen Gammopathie erkrankt waren, um einen Schwellenwert für die CD44v6-Positivität bestimmen zu können.

In der Vergangenheit wurden Daten publiziert, welche zeigten, dass es zwischen der Expression von CD44v6 bei malignen Plasmazellen bei Patienten mit MM und der bei gesunden Menschen keinen Unterschied gibt (van Driel et al. 1998). Dies scheint aus verschiedenen Gründen im Kontrast zu den hier vorliegenden Ergebnissen zu stehen. Hier konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Menschen bzw. bei Patienten ohne monoklonale Gammopathie die CD44v6/CD138-Koexpression nur in einem geringen Prozentsatz vorhanden ist (0-4%). Die Untersuchungsergebnisse dieses Probanden-/Patientenkollektives wurden zur Bestimmung eines Schwellenwertes für die CD44v6-Positivität herangezogen und als Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung auf 5% festgelegt.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Patienten mit einer MGUS und einem MM I zeigte sich eine signifikant niedrigere Koexpression von

CD138/CD44v6 (9,1 %) als bei Patienten, welche sich in einem höheren Tumorstadium befanden, bzw. an einer PCL erkrankt waren. Werden die Ergebnisse auf die verschiedenen Stadien des MM zugeordnet, so zeigt sich eine Inzidenz von CD44v6 mit 36-75 % bei symptomatischen Tumoren der Stadien II und III beim MM und bei der Plasmazelleukämie. Diese Werte liegen deutlich höher als dies in früheren Studien der Fall war (6-33%) (Khaldoyanidi et al. 1996; Eisterer et al. 2001; Stauder et al. 1996; Van Driel et al. 1998).

Die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse könnten u.a. in der Auswahl des Patientenkollektives liegen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden in über 90% der Fälle (51/57) unbehandelte, neu diagnostizierte Patienten, untersucht. Ein kleiner Teil (4/57) war in der Vergangenheit mit einer zytostatischen Therapie behandelt worden, zeigte aber zum Zeitpunkt der Analyse eine deutliche Tumorlast. Bei den zuvor genannten Studien wurden zumeist sich in Behandlung befindende Patienten untersucht. Zudem wurden unterschiedliche Arten von Untersuchungsmaterial verwendet, u.a. peripheres Blut, Knochenmark oder Gewebeschnitte.

Auf Grund einer vermuteten Instabilität des gesuchten Epitops wurden in der hier durchgeführten Untersuchung die Knochenmarkpunktate innerhalb von spätestens 4 Stunden aufbereitet und durchflusszytometrisch gemessen. In den vorangegangenen Studien wurde auf den Zeitfaktor nicht näher eingegangen. Bei deutlich CD44v6-positiven Proben wurden im zeitlichen Verlauf nochmals 2 durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, welche einen Epitopverlust von 51% in zwei Tagen darlegten. Dies könnte bedeuten, dass die Inzidenz von CD44v6 bei früheren Untersuchungen hätte deutlich höher liegen können, falls die Messungen bzw. die Verarbeitung des Untersuchungsmaterials zwischen 24 und 48 Stunden gedauert hat. Ebenfalls könnte dieses empfindliche Epitop aber auch durch die jeweiligen Medikamente bei vorbehandelten Patienten zerstört worden und somit nicht mehr nachweisbar sein.

In den bis jetzt durchgeführten Studien wurden unterschiedliche auf dem Markt verfügbare Antikörper eingesetzt. In der Vergangenheit konnte jedoch festgestellt

werden, dass der monoklonale Antikörper VFF7 eine geringere Affinität zu CD44v6 hat als andere Antikörper wie z. B. VFF4 und VFF18 (Heider KH et al. 1996). VFF7 zeigte in dieser Untersuchung im Vergleich zu den anderen untersuchten Antikörpern eine um den Faktor 5 niedrigere Dissoziationsrate. VFF18 wies die höchste Bindungsaffinität auf und wurde deshalb auch in der vorliegenden Studie verwendet.

Unterschiedliches Vorgehen beim Gating kann ebenfalls zu verschiedenen Ergebnissen führen (CD38 versus CD138). In früheren Untersuchungen wurden Plasmazellen teilweise nach Auftreten von CD38 separiert (Stauder et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Antigen CD138 zur Identifizierung von Plasmazellen herangezogen. Die Expression von CD138 ist für Plasmazellen typisch und es ist eine weit verbreitete, zuverlässige und signifikante Methode, die Identifikation nach diesem Epitop vorzunehmen (Zhan et al. 2003). Dieses Vorgehen unterscheidet jedoch nicht zwischen gesunden und malignen Plasmazellen (Fonseca et al. 2004).

Ein weiterer Grund könnte in der Methodik liegen, da die Durchflusszytometrie sensitiver ist als die immunhistochemische Färbung.

Zusätzlich stellten wir in dieser Untersuchung fest, dass die Expression von CD44v6 bei monoklonalen Gammopathien sehr unterschiedlich ist, sowohl im Hinblick auf die Oberflächendichte diese Epitops als auch den Anteil der Tumorzellen, welche dieses Glykoprotein tragen (6 – 82%, median 28%). Die Einteilung der Rezeptordichte erfolgte in die drei Teilbereiche: niedrig, mittel und hoch. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen hoher Rezeptordichte und hoher CD138/CD44v6-Koexpression festgestellt werden. Eine effektive Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und CD44v6 kann vermutlich nur durch viele dicht aneinander geordnete CD44-Rezeptoren erreicht werden (Lesley J et al. 2000). Sowohl der Rezeptortyp als auch die Rezeptordichte bestimmen die Ausdehnung und Festigkeit der Bindung zur extrazellulären Matrix. Um dieses Ergebnis weiter interpretieren zu können, wäre eine klinische Beobachtung der Patienten sowie erneute Messungen mittels FACS und FISH über einen längeren Zeitraum notwendig.

Die Tatsache, dass die Inzidenz von CD44v6 bei MGUS und indolentem MM signifikant niedriger ist als bei MM höherer Stadien und der Plasmazelleukämie legt den Verdacht nahe, dass dieses Epitop mit dem Progress der Erkrankung verbunden ist. In der vorliegenden Studie wurde zusätzlich eine zytogenetische Untersuchung einer wohl definierten Population von MM-Patienten angefertigt, während frühere Untersuchungen diese Information nicht aufweisen.

Es gibt nur sehr spärliche Daten über die prognostische Signifikanz von CD44-Isoformen beim MM. Ebenso gibt es nur sehr wenige Daten, die eine Korrelation zwischen CD44-Isoformen und chromosomalen Aberrationen beim MM untersuchten. In zwei Studien war die Isoform CD44v9 mit einem fortgeschrittenen Stadium des MM nach Salmon und Durie und mit einem Progress der Erkrankung assoziiert, aber nicht das CD44v6 (Eisterer et al. 2001; Stauder et al. 1996). Die Autoren schlussfolgerten aus diesen Untersuchungen, dass es sich bei CD44v9 um einen neuen prognostischen Parameter beim MM handeln könnte.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste Untersuchung, welche eine signifikante positive Korrelation zwischen CD44v6-Expression und dem Verlust des Chromosomenarms 13q darlegt. Dies deutet auf eine ungünstige Prognose bei CD44v6-positiven Tumoren und schlussfolgernd daraus auf eine potentielle pathogenetische Verbindung zwischen der genomischen Veränderung und der CD44v6-Expression beim MM hin. Im Gegensatz dazu war CD44v6 jedoch nicht mit einem erhöhten  $\beta$ 2-Mikroglobulin assoziiert. Erhöhtes  $\beta$ 2-Mikroglobulin ist verbunden mit einer hohen Tumormasse, aber nicht mit deutlichen (typischen) biologischen Merkmalen der malignen Zelle. Da wir glauben, dass die CD44v6-Expression vielmehr mit den malignen Eigenschaften von hoch aggressiven Plasmazellen verbunden ist als mit der Tumormasse, ist es nicht verwunderlich, dass diese Parameter nicht miteinander korrelieren.

In der jüngsten Vergangenheit wurden verschiedene neue Substanzen zur Behandlung des MM eingeführt (Hideshima et al. 2002; Barlogie et al. 2004), aber keine von diesen detektiert direkt die malignen Zellen. Basierend auf unseren

Daten könnte ein therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen CD44v6 eine erste Annäherung in Richtung einer gezielten Therapie bei CD44v6-positivem MM sein. Klinische Studien, welche bivatuzumab mertansine oder „186Relabeled bivatuzumab“ bei epithelialen Tumoren verwendeten, zeigten eine exzellente Tumorthherapie (Bayes et al. 2004; Borjesson et al. 2003). Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da gezeigt werden konnte, dass CD44v6 ebenso auf normalen gesunden Epithelien exprimiert wird. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass das Medikament in effektiven Dosen gut vertragen wurde und nur wenige Nebenwirkungen – hauptsächlich die Haut betreffend – auftraten (Sauter et al. 2007). Dies macht es für eine neue Anwendung wie z. B. beim MM besonders nützlich. In neueren Untersuchungen konnte bei Patientinnen mit metastasiertem Mammacarcinom, welche bereits mit verschiedenen Chemotherapeutika vorbehandelt waren, durch eine Therapie mit bivatuzumab mertansine eine Stabilisierung des Krankheitszustandes erreicht werden (Rupp et al. 2007).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durchflusszytometrisch bei den Plasmazellen beim MGUS und asymptomatischen MM nur sehr wenig CD44v6 detektiert werden konnte, wohingegen beim symptomatischen MM und bei der PCL dieses Epitop sehr häufig vorkommt. Zudem korrelierte dieses hohe Auftreten von CD44v6 beim symptomatischen MM und bei der PCL mit einer 13q-Deletion. Deshalb sollte der Anwendungsbereich von Immunkonjugaten wie z.B. bivatuzumab mertansine, welche CD44v6 detektieren können und gegenwärtig zur Therapie von verschiedenen soliden Tumoren verwendet werden, überprüft werden, ob eine eventueller Einsatz im Bereich von fortgeschrittenen malignen Plasmazellerkrankungen wie z.B. bei Hochrisikopatienten mit MM in Betracht gezogen werden könnte.

## 5 Zusammenfassung

Trotz großer Bemühungen in der Vergangenheit ist es in der Therapie des Multiplen Myeloms in der Mehrzahl der Fälle bisher zu keiner Heilung gekommen. Die meisten Patienten erleiden nach der initialen Therapie einen Rückfall und benötigen dann weitere Behandlungsmaßnahmen. Für diese Patienten stehen zwar neue Medikamente zur Verfügung, welche aber nicht in allen Fällen effektiv sind. Deshalb sind neue innovative Therapieansätze erforderlich, wie zum Beispiel (z.B.) die der Antikörpertherapie. Diese Art der Therapie wird bereits erfolgreich in einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt, z.B. im Bereich der Lymphomtherapie. Therapeutische monoklonale Antikörper, welche speziell maligne Plasmazellen beim Multiplen Myelom (MM) detektieren, sind momentan nicht verfügbar. Bivatuzumab mertansine ist eine neue Substanz, bestehend aus einem monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch Zellen mit Oberflächenantigenen des Cluster of differentiation 44v6 (CD44v6) erkennen kann, gekoppelt an ein Zytotoxin aus der Familie der Maytansine. Dieses Immunkonjugat ist somit in der Lage, CD44v6-positive Zellen gezielt zu detektieren und zu zerstören. Die Expression von CD44v6 ist bei Plattenepithelcinomen sehr hoch. Es gibt bis jetzt aber sehr wenige Daten über das Vorhandensein von CD44v6 bei klonalen Plasmazellerkrankungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Inzidenz von CD44v6 bei Patienten mit MM und Monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) mittels Durchflusszytometrie zu ermitteln. Gleichzeitig wurde nach einer Korrelation zwischen CD44v6 und einem anderen prognostischen Parameter beim MM, der 13q14-Deletion, mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) gesucht, um einen weiteren unabhängigen prognostischen Faktor zu ermitteln.

Bei den Patienten, die an einer MGUS oder an einem MM Stadium I erkrankt waren, lag die Inzidenz von CD44v6 bei 6,25%, bzw. bei 16,7%. Bei Patienten in den Krankheitsstadien MM II und MM III, bzw. solche, die an einer Plasmazelleukämie erkrankt waren, lag die Inzidenz hingegen bei 36-75%. Ebenfalls konnte eine signifikante Korrelation zwischen CD44v6-Positivität und

13q14-Deletion nachgewiesen werden ( $p=0,01$ ; Fisher's exact test).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen kann folgendes geschlossen werden:

1. Die Inzidenz von CD44v6 auf Plasmazellen ist bei der MGUS und bei MM I im Vergleich zu normalen Plasmazellen nicht erhöht, steigt aber in den Stadien MM II, MM III und bei Plasmazelleukämien signifikant an.
2. Es besteht eine Korrelation zwischen CD44v6-Positivität und 13q14-Deletion. Dies könnte auf eine potentielle pathogenetische Verbindung zwischen der genomischen Veränderung und der CD44v6-Expression hindeuten. Unklar ist bislang, ob CD44v6 ein unabhängiger Risikofaktor ist.
3. Immunkonjugate, welche CD44v6 detektieren und gezielt zerstören können wie z.B. Bivatuzumab mertansine, könnten bei Hochrisikopatienten mit MM zur Therapie geeignet sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Bayes M, Rabasseda X, Prous JR:

**Gateways to clinical trials.**

Methods Find Exp Clin Pharmacol. 26:211-244 (2004)

Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, Mattox S, Vesole D, Siegel D, Tricot G, Munshi N, Fassas A, Singhal S, Mehta J, Anaissie E, Dhodapkar D, Naucke S, Cromer J, Sawyer J, Epstein J, Spoon D, Ayers D, Cheson B, Crowley J:

**Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma.**

Blood. 93:55-65 (1999)

Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, Jacobson J, Zangari M, Anaissie E, Walker R, Crowley J:

**Treatment of multiple myeloma.**

Blood. 103:20-32 (2004)

Bendall LJ, Bradstock KF, Gottlieb DJ:

**Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells.**

Leukemia. 14:1239-1246 (2000)

Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamencovic I, Plowman G, Aruffo A:

**CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor.**

J Cell Biol. 128:687-698 (1995)

Borjesson PK, Postema EJ, Roos JC, Colnot DR, Marres HA, van Schie MH, Stehle G, de Bree R, Snow GB, Oyen WJ, van Dongen GA:

**Phase I therapy study with <sup>186</sup>Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma.**

Clin Cancer Res. 3961S-3972S (2003)

Borland G, Ross J. A., Guy K:

**Forms and functions of CD44.**

Immunology. 93:139-148 (1998)

Caers J, Günthert U, De Raeve H, Van Valckenborgh E, Menu E, Van Camp B, Vanderkerken K:

**The involvement of osteopontin and its receptors in multiple myeloma cell survival, migration and invasion in the murine 5T33MM model.**

Br J Haematol. 132:469-477 (2006)

Dall P, Heider KH, Sinn HP, Skroch-Angel P, Adolf G, Kaufmann M, Herrlich P, Ponta H:

**Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR für detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer.**

Int J Cancer. 60:471-477 (1995)

Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers, D, Tricot G, Badros A, Zangari M, Munshi NC, Anaissie E, Spoon D, Siegel D, Jagannath S, Vesole D, Epstein J, Shaughnessy J, Fassas A, Lim S, Robertson P, Crowley J:

**Results of high-dose therapy for 100 patients with multiple myeloma: durable complete remission and superior survival in the absence of chromoosome 13 abnormalities.**

Blood. 95:4008-4010 (2000)

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P:

**Genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukemia.**

N Engl J Med. 343:1910-1916 (2001)

Durie BG, Salmon SE:

**A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.**

Cancer. 36:842-845 (1975)

Eisterer W, Bechter O, Hilbe W, van Driel M, Lokhorst HM, Thaler J, Bloem AC, Gunthert U, Stander R:

**CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma.**

Leuk Res. 25:1051-1057 (2001)

Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, Lai JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Batallie R, Mary JY; Intergroupe Francophone du Myelome:

**Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta$ 2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy.**

Blood. 97:1566-1571 (2001)

Foekens JA, Dall P, Klijn JGM, Skroch-Angel P, Claassen CJ, Look MP, Ponta H, van Putten WL, Herrlich P, Henzen-Logmans SC:

**Prognostic value of CD44 variant expression on primary breast cancer.**

Int J Cancer. 84:209-215 (1999)

Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, van Ness B, Greipp PR: **Biological and prognostic significance interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities ( $\Delta$  13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study.**

Cancer Res. 62:715-720 (2002)

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minivielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr., Stewart AK, Avet-Loiseau H:

**Genetica and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report.**

Cancer Res. 64:1546-1558 (2004)

Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wnzel A, Ponta H, Herrlich P:

**A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells.**

Cell. 65:13-24 (1991)

Hamada J, Sawamura Y, van Meir EG:

**CD44 Expression and growth factors.**

Front Biosci. 3:657-664 (1998)

Heider KH, Kuthan H, Stehle G, Munzert G:

**CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy.**

Cancer Immunology, Immunotherapy. 53:567-579 (2004)

Heider KH, Sproll M, Susani S, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann E, Ahorn H Adolf R:

**Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas.**

Cancer immunology, Immunotherapy. 43:245-253 (1996)

Heider KH, Mulder JWR, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals ST, Adolf GR:  
**Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of humans and Cynomolgus monkeys.**

Eur J Cancer. 31A:2385-2391(1995)

Hideshima T, Anderson KC:

**Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma.**

Nat Rev Cancer. 2:927-937 (2002)

Khaldoyanidi S, Achtnich M, Hehlmann R, Zöller M:

**Expression of CD44 variant isoforms in peripheral blood leukocytes in malignant lymphoma and leukemia: inverse correlation between expression and tumour progression.**

Leukemia Res. 20:839-851 (1996)

Kuehl WM, Bergsagel PL:

**Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions.**

Nat Rev Cancer. 2:175-187 (2002)

Kyle RA, Therneau TM, Raykumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd:

**A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance.**

N Engl J Med. 346:564-569 (2002)

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR:

**The structure and function of hyaluronan: an overview.**

Immunol Cell Biol. 74:A1-7 (1996)

Legras S, Gunthert U, Stauder R, Curt F, Oliferenko S, Kluin-Nelemans HC, Marie JP, Proctor S, Jasmin C, Smadja-Joffe F:

**A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid Leukemia.**

Blood. 91:3401-3413 (1998)

Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R:

**Hyaluronan binding by cell surface CD44.**

J Biol Chem. 275:26967-26975 (2000)

Naor D, Sionov RV, Ish-Sahlom D:

**CD44: structure, function, and association with the malignant process.**

Adv Cancer Res. 71:241-319 (1997)

Nguyen VN, Mirejovsky T, Melinova L, Mandys V:

**CD44 and its v6 spliced variant in lung carcinomas: Relation to NCAM, CEA, EMA and UP1 and prognostic significance.**

Neoplasma. 47:400-408 (2000)

Ponta H, Wainwright D, Herrlich P:

**The CD44 protein family.**

Int J Biochem Cell Biol. 30:299-305 (1998)

Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, Zoller M, Heider KH, Ponta H, Herrlich P:

**The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumour cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior.**

Cancer Res. 53:1262-1268 (1993)

Rupp U, Schoendorf-Holland E, Eichbaum M, Schuetz F, Lauschner I, Schmidt P, Staab A, Hanft G, Huober J, Sinn HP, Sohn C, Schneeweiss A:

**Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study.**

Anticancer Drugs.18:477-485 (2007)

Sauter A, Kloft C, Gronau S, Bogeschdorfer F, Erhardt T, Golze W, Schroen C, Staab A, Riechelmann H, Hoermann K:

**Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.**

Int J Oncol.30:927-935 (2007)

Secreton GB, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI:

**Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 89:12160-12164 (1992)

Secreton GB, Bell MV, Bell JI, Jackson DG:

**The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat.**

J Biol Chem. 268:12235-12238 (1993)

Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M:

**Prevention of tumour metastasis formation by anti-variant CD44.**

J Exp Med. 177:443-455 (1993)

Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fuchart C:

**Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma.**

Blood. 98:2229-2238 (2001)

Stauder R, Van Driel M, Schwarzler C, Thaler J, Lokhorst HM, Kreuser ED, Bloem AC, Gunthert U, Eisterer W:

**Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma.**

Blood. 88:3101-3108 (1996)

The International Myeloma Working Group:

**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 (2003)

Tricot G, Barlogi B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR:

**Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosom 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities.**

Blood. 86:4250-4256 (1995)

Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Naucke S, Mattox S, Bracy D, Munshi n, Barlogie B:

**Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants.**

J Clin Oncol. 15:2659-2666 (1997)

Van Driel M, Gunthert U, Stauder R, Joling P, Lokhorst HM, Bloem AC:

**CD44 isoforms distinguish between bone marrow plasma cells from normal individuals and patients with multiple myeloma at different stages of disease.**

Leukemia. 12:1821-1828 (1998)

Van Hal NL, van Dogen GA, Stigter-van Walsum M, Snow GB, Brakenhoff RH:

**Charakterization of CD44v6 isoforms in head-an-neck squamous-cell carcinoma.**

Int J Cancer. 82:837-845 (1999)

Van Weering DH, Baas PD, Bos JL:

**A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products.**

PCR Methods Appl. 3:100-106 (1993)

Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST:

**Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression.**

Cancer Res. 53:4754-4756 (1993)

Wielenga VJ, van der Voort R, Mulder JW, Kruyt PM, Weidema WF, Oosting J, Seldenrijk CA, van Krimpen C, Offerhaus GJ, Pals ST:

**CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer.**

Scand J Gastroenterol. 33:82-87 (1998)

Zhan F, Tian E, Bumm K, Smith R, Barlogie B, Shaughnessy J Jr:

**Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development.**

Blood. 101:1128-1140 (2003)

Zhang S, Chang MCY, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA:  
**The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase.**  
J Biol Chem. 273:11342-11348 (1998)

Zöller M:  
**CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation.**  
J Mol Med. 73:425-438 (1995)

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wahrscheinlichkeit eines Progresses von einer Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) zu einem Multiplen Myelom (MM), einem IgM- Lymphom, einer primärer Amyloidose, einer Makroglobulinämie, einer Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) oder einem Plasmozytom.....	8
Abbildung 2: Diagnosekriterien beim symptomatischen MM.....	11
Abbildung 3: Diagnosekriterien beim asymptomatischen Multiplen Myelom (MM)	11
Abbildung 4: Prognostische Parameter beim MM.....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des CD44-Genes und individueller Splicevarianten. ....	15
Abbildung 6: Scatterbild der Durchflußzytometrie eines gesunden Probanden.....	28
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Kontrolluntersuchung bei einem gesunden Probanden.....	29
Abbildung 8: Durchflusszytometrische CD44v6/CD138-Markierung bei einem gesunden Probanden.....	29
Abbildung 9: Scatterbild der Durchflußzytometrie eines Patienten mit Multiplem Myelom (MM).....	30
Abbildung 10: Kontrolluntersuchung bei einem Patienten mit Multiplem Myelom (MM).....	31
Abbildung 11: CD44v6/CD138-Markierung bei einem Patienten mit Multiplem Myelom (MM).....	31
Abbildung 12: FISH - Detektion.....	39
Abbildung 13: Zeitkinetik der CD44v6-Positivität. Es zeigt sich ein deutlicher Verlust des Epitops.....	49

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz von CD44v6 bei Primärtumoren und deren Metastasen.....	19
Tabelle 2: Inzidenz von CD44v6 bei Leukämien und malignen Lymphomen.....	19
Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Oberflächenmarkierung (FACS).....	26
Tabelle 4: Geräteeinstellung: Standard Detectors.....	27
Tabelle 5: Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien und Antikörper.....	42
Tabelle 6: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung des Schwellenwerts der CD44v6-Positivität.....	44
Tabelle 7: Inzidenz von CD44v6 bei MGUS und Multiplem Myelom Stadium I.....	45
Tabelle 8: Übersicht über klinische Daten und die durchflusszytometrischen Ergebnisse bei MGUS- und MM IA.....	46
Tabelle 9: Inzidenz von CD44v6 der Krankheitsstadien II und III beim Multiplen Myelom und bei Plasmazelleukämie.....	47
Tabelle 10: Übersicht über klinische Daten und die durchflusszytometrischen Ergebnisse bei MM II-, MM III- und PCL-Patienten.....	48
Tabelle 11: Korrelation von CD44v6 und der 13q14-Deletion. ....	51

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf vielfältige Art und Weise während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. H. Döhner, dem ärztlichen Direktor der Abteilung Innere Medizin III (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektiologie) am Universitätsklinikum Ulm, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung wissenschaftlich arbeiten zu dürfen, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Mathias Schmid für die Überlassung dieses interessanten Themas und die vielen hilfreichen Anregungen. Während der gesamten Arbeit konnte ich mich stets auf seine Unterstützung sowie exzellente Betreuung verlassen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Peter Liebisch bedanken, der durch sein großes klinisches Engagement und seine zahlreichen Ideen und Anregungen wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Katrin Lehmann sowie Christine Schöpflin bedanken, die stets mit großem Engagement an den Laborprojekten mitgearbeitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke Frau Sibylle Janczik für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der FISH-Analysen.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labores, die mir in den letzten Jahren mit Wort, Tat und Geduld zur Seite standen.

## Lebenslauf

### Personalien

Name	Amrhein, geb. Eppinger
Vorname	Susanne
Geburtsdatum	19. Februar 1978
Geburtsort	Illertissen
Familienstand	verheiratet
Mutter	Ulrike Eppinger, geb. März
Vater	Otto Eppinger

### Schulischer Bildungsweg

1984 – 1988	Grundschule in Illertissen
1988 – 1990	Hauptschule in Illertissen
1990 – 1993	Staatliche Realschule in Vöhringen
1993 – 1997	Kolleg der Schulbrüder in Illertissen, Gymnasium

### Universitärer Bildungsweg

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm
April 2001	Ärztliche Vorprüfung
April 2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni – Dezember 2003	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Döhner
September 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **Berufliche Tätigkeit**

Seit Januar 2006                      Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik der  
Universität Ulm, Abteilung Innere Medizin II,  
Kardiologie, Angiologie, Nephrologie,  
Pneumologie

## **Publikation**

April 2005                              Liebisch P, Eppinger S, Schöpflin C, Stehle G,  
Munzert G, Döhner H, Schmid M.  
CD44v6, a target for novel antibody treatment  
approaches, is frequently expressed in multiple  
myeloma an associated with deletion of  
chromosome arm 13q.  
Haematologica 2005; 90:489-493.