

Martina Simon  
Dr. med.

## **Expression des Oberflächenmarkers CD37 auf klonotypischen Zellen bei Patienten mit Multiplem Myelom nach Hochdosistherapie und peripherer Blutstammzelltransplantation**

Geboren am 10.01.1975 in Ellwangen  
Staatsexamen am 16.04.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Goldschmidt

Ein Großteil der Patienten mit MM erleidet nach HDT und PBSCT im weiteren Verlauf einen Krankheitsrückfall nach anfänglich krankheitsfreiem Intervall [Pilarski und Belch 1994]. Als Ursache hierfür wird die zirkulierende Progenitor-B-Zelle diskutiert, da sie gegenüber Chemotherapie [Pilarski und Belch 1994, Bergsagel et al. 1995] und Hochdosischemotherapie [Kiel et al. 1999, Cremer et al. 2001] resistent zu sein scheint. Um auch diese Zellen effektiv aus dem PB zu eliminieren, wird aktuell von verschiedenen Forschungsgruppen der Einsatz von Antikörpern getestet. Langzeitergebnisse hierzu stehen bislang jedoch noch aus.

Neben CD19 und CD20, deren Expression auf peripheren B-Zellen von Patienten mit MM bereits untersucht wurde [Kiel et al. 1999, Rottenburger et al. 1999], gilt auch CD37 als Oberflächenmarker von B-Zellen, der eine hohe Koexpression zu CD19 und CD20 aufweist, im Gegensatz zu diesen jedoch erst auf reifen, peripheren B-Zellen exprimiert wird [Moldenhauer 2000]. Während die Myelomzelle selbst als CD37<sup>+</sup> [Peters et al. 1994 und Schwartz-Albiez et al. 1988] bzw. nur bei 10% der Patienten als schwach CD37<sup>+</sup> beschrieben wird [Jackson et al. 1988], gibt es bislang keine Untersuchungen zur Expression von CD37 auf peripheren Zellen. In unserer Studie untersuchten wir daher die Anzahl an klonotypischen CD37<sup>+</sup> und CD37<sup>-</sup> Zellen im PB von zehn Patienten mit MM nach HDT und PBSCT. Zwei der Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung in kompletter Remission, vier weitere in partieller Remission, einer in minimaler Remission, zwei im Krankheitsprogress und einer im Rezidiv.

Aus heparinisiertem Patientenblut wurden über Dichtezentrifugation die mononukleären Zellen gewonnen. Nach Inkubation mit CD37-FITC-Antikörpern und Anti-FITC-Microbeads wurden die CD37<sup>+</sup> und CD37<sup>-</sup> Zellfraktionen mittels magnetischer Zellsortierung aufgereinigt, deren Reinheiten daraufhin über Durchflusszytometrie bestimmt wurde.

Hierbei konnten Reinheiten an CD37<sup>+</sup> Zellen zwischen 79,1% – 98,6% (Median 91,4%) erzielt werden, bzw. ein Anteil an CD37<sup>+</sup> Lymphozyten von 75,6% – 98,3% (Median 86,1%), während in der CD37<sup>-</sup> Zellfraktion noch 0,2% – 43,2% (Median 3,1%) CD37<sup>+</sup> Zellen, bzw. 0,1% – 3,4% (Median 0,4%) CD37<sup>+</sup> Lymphozyten verblieben waren.

Zur Bestimmung der Tumorlast innerhalb der CD37<sup>+</sup> und CD37<sup>-</sup> Zellfraktionen wurde die DNA aus den Zellen freigesetzt und anschließend nach dem Prinzip der Limiting dilutions eine quantitative ASO-PCR durchgeführt, um dann den Anteil an klonotypischen Zellen innerhalb der Zellfraktionen über  $\chi^2$ -Schätzung zu ermitteln.

Dieser Anteil wurde abschließend umgerechnet in die absolute Anzahl an klonotypischen CD37<sup>+</sup> und CD37<sup>-</sup> Zellen pro ml PB.

Die Tumorlast für die CD37<sup>+</sup> Zellfraktion betrug dabei zwischen  $1,7 \cdot 10^{-4}\%$  und  $2,3 \cdot 10^{-3}\%$  (Median  $4,2 \cdot 10^{-4}\%$ ), was einer absoluten Tumorzellzahl von 0,3 bis 14 (Median 2) pro ml PB entspricht.

Für die CD37<sup>-</sup> Zellfraktion hingegen betrug die Tumorlast zwischen  $4,1 \cdot 10^{-5}\%$  und  $1,6 \cdot 10^{-2}\%$  (Median  $1,7 \cdot 10^{-3}\%$ ), was einer absoluten Tumorzellzahl von 0,3 bis 297 (Median 31) pro ml PB entspricht.

Damit lag die Anzahl klonotypischer CD37<sup>+</sup> Zellen mit im Median 2 pro ml PB signifikant niedriger als die Anzahl klonotypischer CD37<sup>-</sup> Zellen mit im Median 31 pro ml PB (Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben:  $p = 0,028$ ). Ob es tatsächlich auch zu einem Anstieg klonotypischer CD37<sup>+</sup> Zellen von der Remission zum Krankheitsrückfall kommt, konnte aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungsbreite nicht gezeigt werden.

Insgesamt ist die Tumorlast im PB mit 0,7 bis 298 (Median 38) klonotypischen Zellen/ml PB jedoch sehr niedrig.

Ob eine Antikörpertherapie mit einem CD37-Antikörper bei Patienten mit MM nach HDT und PBSCT sinnvoll ist, können wir anhand dieser Studie nicht zeigen. Insgesamt jedoch ist der Anteil an klonotypischen Zellen im PB im Vergleich zur Tumorlast im Knochenmark sehr gering, so dass eine Antikörpertherapie auch gegen ein Epitop wie CD19 oder CD20 wenn überhaupt, dann nur in Kombination mit einer (Hochdosis-) Chemotherapie oder konsolidierend im Anschluss an eine (Hochdosis-) Chemotherapie, wenn die Haupttumorlast minimal ist, Sinn macht.