

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Andreas K. Buck

**Einfluss systemischer Therapie auf die funktionelle Bildgebung des Multiplen
Myeloms**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Leilah Marie-Luise Omert

aus

Ehrenberg (Rhön)

Würzburg, November 2016

Referent: Professor Dr. med. Andreas K. Buck
Koreferent: Privatdozent Dr. med. Götz U. Grigoleit
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2017

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Multiple Myelom	1
1.2 Epidemiologie	1
1.3 Ätiologie des Multiplen Myeloms	1
1.4 Pathogenese und Klinik des Multiplen Myeloms	2
1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms	3
1.6 Bildgebung des Multiplen Myeloms	4
1.7 Therapie des Multiplen Myeloms	6
1.8 Prognoseparameter	8
1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Laborgeräte	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Kits	14
2.1.5 Antikörper	15
2.1.6 Primer	15
2.1.7 Zelllinien	15
2.1.8 Puffer und Lösungen	16
2.1.8.1 Zellkultur	16
2.1.8.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung	16
2.1.9 Radionuklide	17
2.1.10 Software	17
2.2 Methoden	17
2.2.1 Zellkultur	17
2.2.2 Synthese der eingesetzten Radiotracer	18
2.2.3 Bestimmung der mittleren letalen Konzentration (LC ₅₀) von MLN9708	20
2.2.4 Durchflusszytometrie	20

2.2.5 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.6 Aufnahme der Radiotracer <i>in vitro</i>	25
2.2.7 Statistische Analyse	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Charakteristika verschiedener MM-Zelllinien	27
3.2 Reduktion der Viabilität durch MLN9708	28
3.3 Eignung von ^{11}C -MET zur Bildgebung des Multiplen Myeloms im Vergleich zu ^{18}F -FDG	28
3.3.1 Aufnahmekinetik behandelter Zellen	29
3.3.2 Prozentuale Traceraufnahme behandelter MM-Zellen	29
3.3.3 Eignung der Tracer zur Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten MM-Zellen	30
3.4 Einfluss von MLN9708 auf Charakteristika der Pathogenese des Multiplen Myeloms	32
3.4.1 Proliferation von unbehandelten und mit MLN9708 behandelten Zellen	32
3.4.2 Expression von CXCR4 (SDF-1-Rezeptor) und CD138 (Syndecan-1) an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien	35
3.4.2.1 Expression von CXCR4	35
3.4.2.2 Expression von CD138 an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien	37
3.4.3 Expression intrazellulärer Immunglobulin kappa/lambda-Leichtketten	40
3.4.4 Expression von <i>xbp-1</i> bei behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen	42
4 Diskussion	43
4.1 Ist ^{11}C -MET besser zur Diagnostik des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?	43
4.2 Ist ^{11}C -MET besser zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?	45
4.3 Ist ^{11}C -MET besser zur Stadieneinteilung und Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?	47

4.4 Fazit	51
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis	54
7 Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	63
8 Abkürzungsverzeichnis	64
Danksagung	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die durch die unkontrollierte Proliferation klonaler Plasmazellen charakterisiert ist. Die Proliferation kann sowohl intra- als auch extramedullär stattfinden.

Ein Kennzeichen der Plasmazellen ist die Produktion aberranter Immunglobuline.

Die Erkrankung führt hierdurch zu verschiedensten Schädigungen, insbesondere zu Läsionen der Knochen, sowie Niereninsuffizienz und Immundefizienz (Kyle et al. 2003).

1.2 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 4-6 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr macht das Multiple Myelom ca. 10 % der hämatologischen und ca. 1 % aller Krebserkrankungen aus. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65-70 Jahren (Harousseau et al. 2009). Trotz großer Fortschritte in der Therapie hat die Erkrankung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 48 % eine schlechte Prognose (Howlader et al. 2015).

1.3 Ätiologie des Multiplen Myeloms

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist bis heute weitestgehend unbekannt. Epidemiologische Studien konnten als Risikofaktoren, neben gehobenem Alter und einer genetischen Prädisposition, die Arbeit mit Chemikalien identifizieren, da die Erkrankung bei bestimmten Berufsgruppen häufiger vorkommt. Auch Adipositas, Autoimmunerkrankungen sowie eine Strahlenexposition werden als Risikofaktoren diskutiert (Mahindra et al. 2010, Wallin et al. 2010, Landgren et al. 2006).

1.4 Pathogenese und Klinik des Multiplen Myeloms

Fast alle Fälle des Multiplen Myeloms gehen aus einem Vorläuferstadium, der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), hervor. Die MGUS ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark. Die Plasmazellen produzieren aberrante Immunglobuline, was als Paraproteinsynthese bezeichnet wird. Korrelat dieser Paraproteinsynthese in der Serumelektrophorese ist das sogenannte M-Protein. Bei der MGUS liegt der Anteil klonaler Plasmazellen im Knochenmark unter 10 %, das M-Protein im Serum unter 3 g/dl. Die MGUS kann in das asymptomatische Myelom, welches auch als smoldering Myeloma (SMM) bezeichnet wird, übergehen. Dieses ist gekennzeichnet durch einen Anteil klonaler Plasmazellen von mind. 10 % und/oder einem M-Protein im Serum von mind. 3 g/dl oder im Urin von mind. 500 mg/24 h (Rajkumar et al. 2014).

Beim Multiplen Myelom liegt zusätzlich eine Endorgan- bzw. Gewebeschädigung vor, welche zu charakteristischen Symptomen bei den Patienten führt. Diese bezeichnet man als CRAB Kriterien: Hyperkalzämie (**c**alcium elevation), Niereninsuffizienz (**r**enal insufficiency), Anämie (**a**nemia) und osteolytische Knochenläsionen (**b**one lesions).

Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark kommt es zur Anämie, welche sich klinisch in Form von Müdigkeit und Abgeschlagenheit äußert (Kyle et al. 2003).

Die Expansion maligner Plasmazellen im Knochenmark führt außerdem zu einer verstärkten Aktivität von Osteoklasten und einer verminderten Aktivität von Osteoblasten. Dies führt zum verstärkten Abbau sowie zur Destruktion von Knochensubstanz, sodass osteolytische Läsionen entstehen. Infolge dieses Prozesses, der als „myeloma bone disease“ bezeichnet wird, kommt es zu pathologischen Frakturen sowie Knochenschmerzen (Rajkumar et al. 2005).

Des Weiteren tritt im Rahmen der Erkrankung häufig eine Nierenschädigung auf, da die massive Produktion aberranter Immunglobuline zur Okklusion kleiner Gefäße, sowie Tubuli und Glomerula der Niere führt, was als Cast-Nephropatie bezeichnet wird. Die vermehrte Ablagerung des durch den Knochenabbau freigesetzten Kalziums trägt ebenfalls zur Nierenschädigung bei (Dimopoulos et al. 2008).

Durch die massive Produktion von aberranten Immunglobulinen kommt es außerdem zu einem sekundären Mangel an funktionsfähigen Immunglobulinen, sodass die Patienten verstärkt an Infekten leiden (Kyle et al. 2003).

Da sich die Plasmazellen auch außerhalb des Knochenmarks ansiedeln können und dort extramedulläre Läsionen bilden, können je nach befallener Gewebe- bzw. Organstruktur weitere unterschiedliche Symptome vorhanden sein (Mahindra et al. 2010).

1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms

Zur Diagnose des Multiplen Myeloms war bis vor kurzem, neben dem Vorhandensein des M-Proteins und der Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen, der Nachweis einer Endorgan- bzw. Gewebeschädigung (CRAB-Kriterien) obligat. Eine Revision der Kriterien erlaubt nun aber auch eine Diagnosestellung bei Patienten ohne Endorgan- oder Gewebeschädigung, wenn der Anteil konaler Plasmazellen im Knochenmark mind. 60 % beträgt, der Quotient freier Leichtketten im Serum (FLC-Quotient) mind. 100 g/l beträgt oder mind. eine fokale Läsion im MRT detektiert wurde. Hierdurch sollen Patienten, bei denen keine CRAB-Kriterien vorliegen, schneller einer adäquaten Therapie zugeführt werden, um die Entwicklung einer Endorgan- oder Gewebeschädigung zu verhindern (Rajkumar et al. 2014).

Zur Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms existieren mehrere Klassifikationen.

1975 publizierten Salmon und Durie ein System, welches die Anzahl der durch konventionelles Röntgen entdeckten osteolytischen Läsionen, sowie die Menge des Hämoglobins, des Kalziums und des Paraproteins berücksichtigt (Durie et al. 1975).

2003 wurde die Salmon/Durie-Plus-Stadieneinteilung vorgestellt, in der auch neue Bildgebungsverfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) zur Detektion von MM-Läsionen empfohlen wurden, da Studien gezeigt hatten, dass diese Verfahren eine höhere Sensitivität und Spezifität für MM-Läsionen haben als konventionelles Röntgen oder Computertomographie. Im Gegensatz zur Klassifikation von 1975 wird hier als Laborparameter nur die Menge des Kreatinins im Serum berücksichtigt (Kyle et al. 2003, Durie 2006).

Ein weitere Klassifikation ist das International Staging System (ISS) der International Myeloma Working Group, mit der die Patienten anhand der Menge von Serumalbumin und beta2-Mikroglobulin in 3 Subgruppen eingeteilt werden (Greipp et al. 2005).

1.6 Bildgebung des Multiplen Myeloms

Bildgebende Verfahren werden sowohl zur Diagnostik, als auch zum Staging und zur Kontrolle des Therapieansprechens des Multiplen Myeloms verwendet. Lange Zeit wurde das konventionelle Röntgen (whole body X-ray; WBXR) als Standardverfahren verwendet. Hiermit können osteolytische Läsionen, welche ein wichtiger Risikofaktor für Mortalität und Morbidität sind, dargestellt werden. Allerdings hat das konventionelle Röntgen einige Nachteile. So können osteolytische Läsionen erst entdeckt werden, wenn bereits mehr als 70 % des Knochens entmineralisiert sind, außerdem ist eine Unterscheidung metabolisch aktiver von inaktiven Läsionen nicht möglich (Cascini et al. 2010). Manche Stellen des Skeletts können mit konventionellem Röntgen nicht dargestellt werden, da es z.B. im Bereich des Schädels zu Überlagerungsartefakten kommt. Außerdem kann die Untersuchung sehr lange dauern und die mehrmalige Umlagerung des Patienten erfordern, was besonders bei osteolytischen Läsionen sehr schmerzhaft sein kann. Deshalb werden immer häufiger neuere bildgebende Verfahren verwendet, da sie eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweisen. Jedoch gibt es bis jetzt kein Verfahren, das alle Vorteile der einzelnen Verfahren in sich vereint.

Die Computertomographie (CT) hat den Vorteil, dass durch ihr hohes räumliches Auflösungsvermögen auch sehr kleine osteolytische Läsionen entdeckt werden können. Außerdem sind auch extramedulläre Läsionen sichtbar, welche bei Bedarf sofort zielgenau biopsiert werden können. Ein weiterer Vorteil der CT ist die kurze Untersuchungsdauer. Ein großer Nachteil der CT-Untersuchung ist die im Vergleich zum konventionellen Röntgen 1,3 bis 3-fach höhere Strahlenexposition. Außerdem können mit der CT keine metabolischen, sondern nur strukturelle Veränderungen sichtbar gemacht werden, sodass sie sich nur sehr eingeschränkt zum Monitoring des Therapieansprechens eignet.

Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) steht ein strahlenfreies Verfahren zur Verfügung, das ermöglicht, eine Infiltration des Knochenmarks mit MM-Zellen zu entdecken, bevor eine Läsion im konventionellen Röntgen sichtbar wird. Überdies kann eine Kompression des Rückenmarks oder einer Nervenwurzel mit der MRT sicher festgestellt werden. Außerdem besitzt die MRT eine hohe Sensitivität für extramedulläre Läsionen und kann zwischen benignen und malignen Kompressionsfrakturen unterscheiden (Dimopoulos et al. 2009).

Ein Nachteil der MRT ist die im Vergleich zur CT lange Dauer der Untersuchung, während der die Patienten zur Vermeidung von Bewegungsartefakten ihre Lage nicht verändern dürfen, was insbesondere bei Patienten mit osteolytischen Läsionen sehr schmerzhaft sein kann. Außerdem ist die Untersuchung bei Patienten, die magnetisierbares Fremdmaterial in sich tragen, wie z.B. Implantate oder Herzschrittmacher, kontraindiziert.

Neben der MRT wurde 2003 die 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose-PET (¹⁸F-FDG-PET) in die Durie/Salmon-Plus-Stadieneinteilung aufgenommen, da sie metabolisch aktive von inaktiven Läsionen im ganzen Körper unterscheiden kann (Durie et al. 2006). Die Sensitivität der PET zur Entdeckung von Myelom-Läsionen beträgt ca. 85 %, die Spezifität liegt bei 92 % (Cascini et al. 2010).

In der PET dargestellte Veränderungen der ¹⁸F-FDG-Aufnahme im Verlauf können wichtige Hinweise auf Therapieansprechen und Prognose liefern. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Anzahl ¹⁸F-FDG-avidere Läsionen mit der Prognose korreliert (Lapa et al. 2014). Ein weiterer Vorteil der ¹⁸F-FDG-PET ist die bessere Detektion extramedullärer Läsionen im Vergleich zur MRT. Allerdings kann eine diffuse Infiltration des Knochenmarks durch andere Bildgebungsverfahren wie z.B. die MRT besser erkannt werden. Auch Läsionen der Rippen und des Schädels können mit einer ¹⁸F-FDG-PET übersehen werden, da diese durch eine physiologische FDG-Aufnahme umliegender Gewebe wie Gehirn und Leber überlagert werden können oder durch andere Strukturen verdeckt werden. Außerdem ist die Aufnahme von ¹⁸F-FDG nicht spezifisch für Tumorgewebe, sondern gibt nur einen Hinweis auf metabolisch aktives Gewebe, was z.B. auch einer Entzündung entsprechen kann.

Ein weiterer Nachteil der PET ist, neben den hohen Kosten und der Strahlenbelastung, die aufwändige Produktion der Radiotracer, für die ein Zyklotron notwendig ist (Zamagni et al. 2012, Cascini et al. 2010, Regelink et al. 2013).

Trotz dieser Nachteile bleibt die PET das einzige bildgebende Verfahren, das zwischen metabolisch aktiven und inaktiven Läsionen unterscheiden kann und besitzt daher als Modalität für Staging, Therapiemonitoring und Prognoseevaluierung ein großes Potenzial.

Die PET wird heute fast ausschließlich mit einer Niedrig-Dosis-CT kombiniert durchgeführt, da diese Hybridbildgebung die unterschiedlichen Vorteile beider Verfahren vereint.

Ein großes Interesse der aktuellen Forschung besteht darin, Tracer zu entwickeln, die eine spezifische Beurteilung der Krankheitsaktivität des Multiplen Myeloms erlauben. Einer dieser Tracer ist der Aminosäure-Tracer [^{11}C]-Methionin (^{11}C -MET), welcher, da das Multiple Myelom sich wie oben beschrieben durch eine starke Proteinsynthese auszeichnet, diesen Anspruch erfüllen könnte (Lückerath et al. 2013, Nakamoto et al. 2012, Nishizawa et al. 2010).

1.7 Therapie des Multiplen Myeloms

Lange Zeit war die Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan, gefolgt von einer Stammzelltransplantation, ein Standardverfahren zur Therapie des Multiplen Myeloms. Trotz dieser aggressiven Therapie erlitten fast alle Patienten ein Rezidiv, was die intensive Erforschung neuer Therapeutika nötig machte. So kamen in den letzten Jahren mehrere Medikamente auf den Markt, die durch ihr gezielteres Angreifen in die Pathogenese des Multiplen Myeloms zu einer starken Verbesserung der Überlebenszeit führten. Hier seien zum einen die Immunmodulatoren wie Thalidomid und seine Derivate, sowie die Proteasominhibitoren wie Bortezomib genannt.

Bei den Proteasominhibitoren unterscheidet man einen reversiblen von einem irreversiblen Wirkmechanismus. Der Proteasominhibitor Bortezomib, welcher mittlerweile als Standardmedikation zur Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt

wird, hemmt die katalytische Chymotrypsin-ähnliche Einheit des Proteasoms reversibel (Suzuki 2013).

Die Hemmung des Proteasoms führt zur einer Ansammlung von normalen und fehlgefalteten Proteinen, im Falle des Multiplen Myeloms besonders von aberranten Immunglobulinen, sodass die Funktion der Zelle beeinträchtigt wird und es schließlich zur Apoptose kommt. Da Krebszellen aufgrund des gesteigerten Stoffwechsels eine höhere Proteasomaktivität aufweisen als normale Zellen, werden gezielt Krebszellen angegriffen (Moureau et al. 2012).

Trotz dieser gezielteren Wirkungsweise kommt es unter Therapie mit Proteasominhibitoren der ersten Generation häufig zur Entwicklung von Resistenzen, da sich die MM-Zellen durch neue genetische Mutationen der Wirkung entziehen können bzw. durch die Elimination von Klonen, die gegen den Proteasominhibitor sensibel sind, resistente Subklone vermehrt wachsen können und so den Progress der Erkrankung fördern. Außerdem können schwere Nebenwirkungen auftreten. Deshalb wurde weiter an Proteasominhibitoren geforscht, die einen besseren therapeutischen Effekt mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil versprechen (Chauhan et al. 2011, Magrangeas et al. 2013).

Zwei dieser Proteasominhibitoren der zweiten Generation sind Carfilzomib und MLN9708/Ixazomib.

Carfilzomib ist ein seit 2012 zur Behandlung des therapierefraktären bzw. rezidivierenden Myeloms zugelassener Proteasominhibitor mit irreversiblen Wirkmechanismus. In Studien konnte gezeigt werden, dass Carfilzomib durch eine selektivere Wirkung weniger Nebenwirkungen hat, da es gezielter an die katalytische Chymotrypsin-ähnliche Einheit bindet, während es nur eine geringe Affinität zur Caspase- und Trypsin-ähnlichen katalytischen Einheit hat (Redic 2013, Herndon et al. 2013).

MLN9708 besitzt wie Bortezomib einen reversiblen Wirkmechanismus und befindet sich aktuell in Phase drei der klinischen Studien. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass mit MLN9708 behandelte Mäuse länger überleben als mit Bortezomib behandelte, sondern auch, dass MLN9708 bei Bortezomib-resistenten Zellen zur Apoptose führt, ohne die Viabilität normaler Zellen zu beeinträchtigen. Dies lässt auf einen starken Antitumoreffekt bei geringeren Nebenwirkungen schließen. Ein großer Vorteil dieses

Proteasominhibitors ist außerdem, dass er in oraler Applikationsform verfügbar ist (Chauhan et al. 2011).

Ein Hauptproblem der Therapie des Multiplen Myeloms besteht weiterhin darin, dass die Erkrankung eine große intra- und interpersonelle Heterogenität aufweist und somit eine individuelle Therapie verlangt. Deshalb ist es nötig, die molekularen Mechanismen des Multiplen Myeloms weiter zu erforschen, um Subgruppen von Patienten zu identifizieren, die z.B. von einer aggressiveren Therapie profitieren oder von einem bestimmten Therapie-Regime. Denn trotz der großen Fortschritte in der Therapie haben besonders die Patienten, die an einem Hochrisiko-Myelom leiden, wenig durch die neuen Medikamente profitiert (Morgan et al. 2012, Barolgie et al. 2014).

Seit längerem wird deshalb an weiteren Substanzklassen geforscht, deren Wirkungsweise spezifische molekulare Angriffspunkte in der Pathogenese des Multiplen Myeloms zu Grunde liegen.

Hier seien zum einen monoklonale Antikörper sowie Substanzen, die in die Regulation des Zellzyklus oder der ungefalteten Proteinantwort eingreifen, wie Deacetylase-, Kinase- und heat shock protein (Hsp)-90- Inhibitoren, genannt (Ocio et al. 2014).

1.8 Prognoseparameter

Um die Prognose des Multiplen Myeloms einzuschätzen, werden unterschiedliche Parameter verwendet.

Klinisch-laborchemische Parameter wie die Menge des Hämoglobins, Paraproteins, Kalziums, Albumins, beta2-Mikroglobulins und Kreatinins, sowie Parameter der Bildgebung, wie die Anzahl der osteolytischen Läsionen, haben schon seit Langem Eingang in die verschiedenen Klassifikationssysteme zur Stadieneinteilung gefunden.

Bisher variiert die Prognose aber auch innerhalb eines Stadiums noch sehr stark, sodass an der Erforschung präziser prognostischer Marker gearbeitet wird, die es auch möglich machen sollen, Patienten in unterschiedliche Subgruppen, die von bestimmten Therapien am besten profitieren, einzuteilen.

Ein Fokus der Forschung war hier auf die Paraproteinsynthese gerichtet, deren prognostischer Wert schon lange bekannt war (Durie et al. 1975).

Um die Paraproteinsynthese weiter zu spezifizieren, wurde ein Test entwickelt, der die Anzahl der freien Leichtketten misst, da die Myelomzellen häufig nicht vollständige Immunglobuline, sondern nur Leichtketten bilden. Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis der Leichtketten zueinander, der sogenannte FLC-Quotient, mit dem Risiko zum Übergang eines asymptomatischen Myeloms in die symptomatische Form sowie der Prognose korreliert (Agarwal et al. 2013, Kastiris et al. 2013).

Da sich Plasmazellen von Patienten mit MGUS, SMM und Multiplem Myelom genetisch stark von normalen Plasmazellen unterscheiden, besteht seit Langem auch eine intensive Forschung auf dem Gebiet der genetischen prognostischen Marker.

Maligne Plasmazellen häufen im Laufe ihrer Entwicklung verschiedenste Mutationen in ihrem Genom an, die sich nicht nur von Patient zu Patient, sondern auch innerhalb eines Organismus unterscheiden. Studien haben gezeigt, dass die Anzahl dieser Mutationen mit der Entwicklung von MGUS zum SMM und schließlich zum Multiplen Myelom zunimmt. Hieraus lässt sich schließen, dass diese Mutationen einen essentiellen Risikofaktor zur Progression der Erkrankung darstellen (Roschewski et al. 2013).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass zytogenetische Aberrationen wie die Translokation t(4;14) und die Deletion del17p13 mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Trotzdem gibt es auch innerhalb dieser Patientengruppen wieder große Unterschiede in der Überlebenszeit, was auf den Einfluss weiterer Faktoren schließen lässt (Chng et al. 2014).

Um das genetische Profil des Multiplen Myeloms genauer zu erfassen, fokussierte sich die Forschung in den letzten Jahren deshalb auch auf Genexpressionsanalysen. Es wurde z.B. der Transkriptionsfaktor X-box binding protein 1 (XBP-1) untersucht, welcher ein wichtiger Regulator der ungefalteten Proteinantwort (UPR) ist. Es ist anzunehmen, dass eine funktionsfähige UPR nicht nur für normale Plasmazellen, sondern aufgrund der massiven Synthese von Immunglobulinen insbesondere für Myelomzellen überlebensnotwendig ist (Iwakoshi et al. 2003, Ling et al. 2012).

Überdies spielt XBP-1 durch Erhöhung des Interleukin-6 (IL-6) Levels eine bedeutende Rolle in der Differenzierung von Plasmazellen (Iwakoshi et al. 2003, Carrasco et al. 2007).

Ein weiterer Fokus der Forschung liegt auf der Interaktion der MM-Zellen mit Stromazellen des Knochenmarks. Diese Interaktion ist wichtig für das Überleben der

MM-Zellen, da die Stromazellen dazu beitragen, dass die MM-Zellen sich ansiedeln, überleben und weiter proliferieren. Außerdem können sich Knochenmark-residente MM-Zellen häufig der Wirkung vieler anti-MM Therapeutika entziehen. Dies bezeichnet man als cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) (Damiano et al. 1999, Raab et al. 2009).

Diese Tumor-Stromazellinteraktion wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle gewährleistet.

Hier seien der Chemokinrezeptor CXCR4 (SDF1-Rezeptor) sowie das Adhäsionsmolekül CD138 (Syndecan-1) genannt.

CXCR4 wird auch als Homingrezeptor bezeichnet, da er eine wichtige Rolle in der Regulation der Migration von MM-Zellen ins periphere Blut und zurück in das Knochenmark spielt. CD138 fungiert als Rezeptor für Proteine der extrazellulären Matrix und für Oberflächenmoleküle von Stromazellen (Katz et al. 2010, Alsayed et al. 2007).

1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

Bisher ist es nicht möglich, mit einem bildgebenden Verfahren alle Fragen der Diagnostik, der Stadieneinteilung, des Therapiemonitorings und der Prognoseevaluation des Multiplen Myeloms zu klären. Da es sich beim Multiplen Myelom aber um eine stark heterogene Erkrankung handelt, die eine frühzeitige individuelle Therapie erfordert, ist es unbedingt nötig Verfahren zu entwickeln, die eine spezifische Charakterisierung der Erkrankung bei jedem einzelnen Patienten ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die MM-Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2 mit dem zur Therapie des Multiplen Myeloms neuen Proteasominhibitor MLN9708 behandelt.

Hierzu wurden zunächst Dosis-Wirkungskurven mittels FACS-Messung erstellt, um die mittlere letale Dosis (LC_{50}) des Proteasominhibitors für jede Zelllinie zu bestimmen. Die ermittelte Dosis wurde anschließend zur Behandlung der Zellen verwendet.

Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mit dem Standardtracer ^{18}F -FDG oder dem in der Anwendung beim Multiplen Myelom neuen Aminosäuretracer ^{11}C -MET

inkubiert und die Aufnahme der Tracer zu den Zeitpunkten 5, 30, 60, 90 und 120 min (^{18}F -FDG) bzw. 5, 15, 30, 45 und 60 min (^{11}C -MET) mit einem Gammastrahlungszähler gemessen. Des Weiteren wurde die Ausprägung biologischer Merkmale der MM-Pathogenese, wie Proliferation, Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Leichtketten und des Transkriptionsfaktors *xbp-1*, bei behandelten und unbehandelten Zellen mittels FACS-Messung bzw. qPCR untersucht. Anschließend wurde ermittelt, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Traceraufnahme und der Ausprägung dieser biologischen Merkmale der MM-Pathogenese bei behandelten und unbehandelten Zellen besteht.

Folgende Fragen sollen hierdurch beantwortet werden:

Ist ^{11}C -MET besser zur Diagnostik des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

Ist ^{11}C -MET besser zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

Ist ^{11}C -MET besser zur Stadieneinteilung und Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Autoklav MELA 6, Autoklav 23	MELAG Medizintechnik, Berlin
Bioanalyser 2100	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Brutschrank HERA cell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Genheimer GmbH, Hettstadt
Gammastrahlungszähler	1480 WIZARD™ 3“, Automatic Gamma Counter, WALLAC Oy, FIN - 20101 Turku Finnland
Gefrierschrank HERA Safe, freeze kendro laboratory products, -86 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlschrank Öko Super glass line	LIEBHERR International AG, Bulle, Schweiz
MACS-Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mechanischer Zellzähler	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop AXIO ZEISS, Vert. A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co, Lauda- Königshofen
PCR-Thermocycler FlexCycler ²	Analytik Jena AG, Jena
Pipettierhelfer accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim

Qubit® Fluorometer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie	Bender & Hobein AG Zürich, Schweiz
Real-Time PCR iCycler iQ™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank Laminar-Airflow-Kabine , HERA Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stoppuhr	TFA, Dostmann GmbH + Co. KG, Wertheim-Reicholzheim
Thermoschrank	Aqua® Lytic, Dortmund
Vakuumpumpe	VWR, Darmstadt
Zentrifugen Megafuge 2.0 R Centrifuge 5810 R Avanti™ 30 Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau Eppendorf AG, Hamburg Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filterspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pasteurpipetten	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
PCR-Gefäße 0,2 ml, 0,5 ml	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
QIAshredder™ spin columns	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea

96-Loch-Platten

Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Ethanol absolut

Apotheke des Universitätsklinikums
Würzburg

Fetales Kälberserum (FCS)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Interleukin-6

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

L-Glutamin
GlutaMAX™

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

MLN9708

Selleckchem, International Clinical Service
GmbH, München

Natriumpyruvat

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Penicillin und Streptomycin

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Propidiumiodid (PI)

SIGMA-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen

Oligo-dT-Primer (0,4 µg/µl)

Qiagen, Hilden

RNase Inhibitor (4u/µl)

Qiagen, Hilden

Roswell Park Memorial Institute
(RPMI) 1640-Medium

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Kits

Omniscript RT Kit

Qiagen, Hilden

Qubit RNA Assay Kit

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

RNase free DNase Set

Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
RNA 6000 Nano-Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

2.1.5 Antikörper

Maus-anti-Ig kappa light-chain-APC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus-anti-Ig lambda light-chain- FITC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus-CD 138-APC, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus-CD 184 (CXCR4)-PE , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Hase-anti-hKi67-FITC	Abcam plc, Cambridge, UK

2.1.6 Primer

TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
XBP1 FAM Hs00231936_m1	
18S FAM Hs99999901_s1	

2.1.7 Zelllinien

INA-6, human, MM	Bereitstellung von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Würzburg
MM.1S human, MM	ATCC, no.: CRL-2974
OPM-2, human, MM	DSMZ, no.: ACC 50

2.1.8 Puffer und Lösungen

2.1.8.1 Zellkultur

Wachstumsmedium für MM Zelllinien

RPMI-1640

+	10 % FCS
+	2 mM L-Glutamin
+	1 % Natriumpyruvat
+	1 % Penicillin/Streptomycin

Zusätzliches Agens zur Kultivierung von INA-6

IL-6 (2,7 ng/ml)

Einfriermedium

20 % FCS

10 % DMSO

70 % RPMI-1640

Herstellung von FACS-Puffer

Puffer	Präparation	Konzentration/Aufbewahrung
FACS-Puffer	15 ml FCS in 500 ml PBS	3 % FCS/PBS

2.1.8.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Reagenz	Präparation	Konzentration/Aufbewahrung
Propidiumiodid (PI)	10 mg Propidiumiodid-Pulver + 4 ml H ₂ O	2,5 mg/ml, 4 °C, im Dunkeln

2.1.9 Radionuklide

2-[¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose (¹⁸F-FDG) Halbwertszeit: 110 Minuten

[¹¹C]-Methionin (¹¹C-MET) Halbwertszeit: 20 Minuten

Alle in dieser Arbeit verwendeten radioaktiv markierten Tracersubstanzen wurden im Interdisziplinären PET-Zentrum (IPZ) der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg hergestellt.

2.1.10 Software

Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
EndNote Program X6	Thomson Reuters, NYC, USA
BD CellQuest Pro™ Software	Beckton Dickinson, Heidelberg
PASW Statistics 18	SPSS Inc., Chicago

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Splitten von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Zellwachstum wurde mit einem Lichtmikroskop kontrolliert. Zum Splitten der Zellen wurde nach 2-3 Tagen ein Teil der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und Wachstumsmedium hinzugefügt.

Zur Versuchsdurchführung wurden 0,5 x 10⁶ Zellen/ml ausgesät, nach 48 h geerntet und bei 1428 x g 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert und gezählt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl PBS gemischt. Hiervon wurden 10 µl in eine Neubauerkammer überführt und unter dem Mikroskop gezählt.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gezählte Zellzahl/Zahl der ausgezählten Kammern} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4/\text{ml}$$

Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert und in Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Isopropanolkühler mit einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen auf 37 °C erwärmt und mit 10 ml Wachstumsmedium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert und kultiviert.

2.2.2 Synthese der eingesetzten Radiotracer

Alle in dieser Arbeit verwendeten radioaktiv markierten Tracersubstanzen wurden vom Interdisziplinären PET-Zentrum (IPZ) der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte unter Einhaltung der pharmazeutischen Regeln der guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice (GMP)). Alle Radiotracer wurden vor Anwendung jeweils mittels validierter analytischer Verfahren auf Identität und radiochemische Reinheit geprüft.

Die Herstellung der zur radiochemischen Markierung eingesetzten Radionuklide [¹⁸F] und [¹¹C] erfolgte an einem 16,5 MeV GE-Zyklotron PETtrace 800.

Synthese von 2-¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose (¹⁸F-FDG)

[¹⁸F]-FDG wurde im IPZ mithilfe eines GE FASTlab™ Synthesemoduls (automatisierte PET-Radiotracer-Syntheseplattform) hergestellt. Die radiochemische Präparation erfolgte nach einer vom Hersteller (GE Healthcare) vorinstallierten Sequenz. Radiochemisch handelt es sich bei dieser Präparation um eine nucleophile Fluorierung des Precursors Mannosetriplat (= Markierungsvorläufer) und nachfolgender alkalischer Hydrolyse zur Abspaltung der Schutzgruppen (Yu, 2006). Nachstehende Abbildung zeigt das vollständige Reaktionsschema (Abb. 2.1).

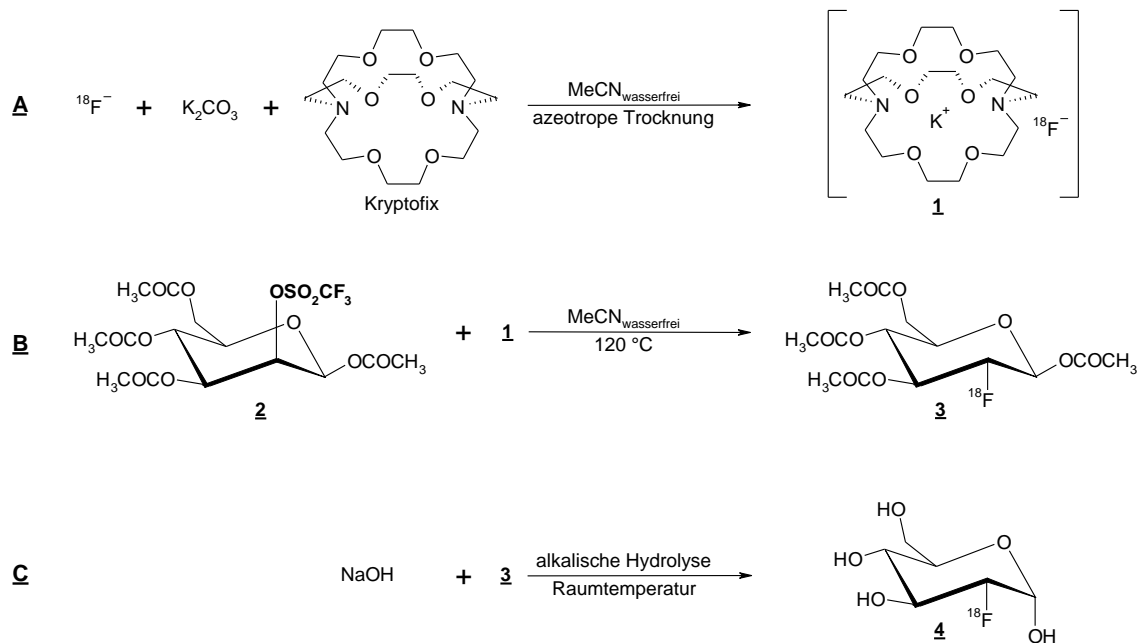


Abb. 2.1: Vollständiges Reaktionsschema zur radiochemischen Präparation von 2-¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose (**4**) aus dem Precursor Mannosetriplat (**2**).

Synthese von [¹¹C]-Methionin (¹¹C-MET)

[¹¹C]-MET wurde im IPZ mithilfe eines GE TRACERlab FX-C-PRO Synthesemoduls (automatisierte PET-Radiotracer-Syntheseplattform) hergestellt. Die radiochemische Präparation erfolgte nach einer im IPZ ausgearbeiteten, an Literaturinformationen angelehnten Sequenz. Radiochemisch handelt es sich bei dieser Präparation um eine online [¹¹C]-Methylierung von *L*-Homocystein (Shao et al. 2011). Nachstehende Abbildung zeigt das vollständige Reaktionsschema (Abb. 2.2).

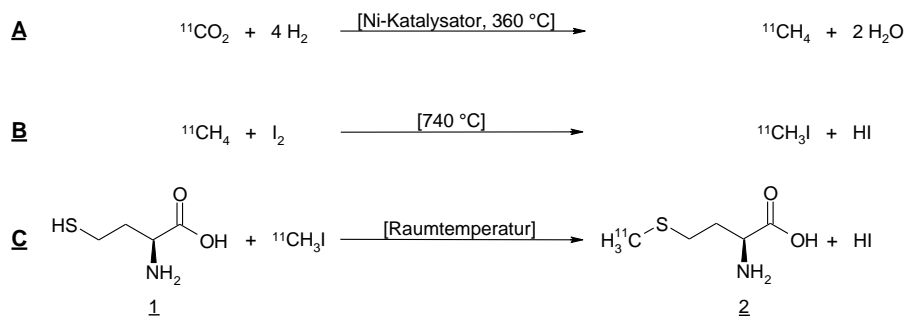


Abb. 2.2: Vollständiges Reaktionsschema zur radiochemischen Präparation von [^{11}C]-Methionin (2) aus dem Precursor *L*-Homocystein (1).

2.2.3 Bestimmung der mittleren letalen Konzentration (LC_{50}) von MLN9708

Zur Bestimmung der mittleren letalen Konzentration (LC_{50}) des Proteasominhibitors MLN9708 wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierzu wurden in einer 96-Loch-Platte je 1×10^5 Zellen in 200 μl pro Vertiefung mit verschiedenen Konzentrationen von MLN9708 für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Prozentsatz toter Zellen mithilfe der PI-Färbung (s.2.2.4) durchflusszytometrisch ermittelt.

Im Folgenden wurden die Zelllinien INA-6 mit 28,5 nM, MM.1S mit 36 nM und OPM-2 mit 20 nM MLN9708 für 48 h behandelt.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt, pelletiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 200 μl Färbelösung (1 μl PI in 200 μl FACS-Puffer) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen nochmals mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und gemessen.

Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden in einer 96-Loch-Platte je 1×10^5 Zellen in 200 μl pro Vertiefung ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, durch tröpfchenweise Zugabe von 1 ml eiskaltem 70% Ethanol fixiert und mind. 24 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden 100 μl Färbelösung (1 μl Hase-anti-hKi67-FITC Antikörper in 99 μl FACS-Puffer) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen nochmals mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen. Dann wurde der Anteil Ki67-positiver Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert.

Bestimmung der Expression von Zelloberflächenmarkern

Zur Bestimmung der Expression von CD138 wurden in einer 96-Loch-Platte je 1×10^5 Zellen in 200 μl pro Vertiefung ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 110 μl Färbelösung (100 μl FACS-Puffer + 10 μl anti-CD138 Antikörper) für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und gemessen.

Zur Bestimmung der Expression von CD184 (CXCR4) wurden in einer 96-Loch-Platte je 1×10^5 Zellen in 200 μl pro Vertiefung ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 110 μl Färbelösung (100 μl FACS-Puffer + 10 μl anti-CD184 Antikörper) für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

Bestimmung der Expression intrazellulärer Immunglobulin kappa/lambda-Leichtketten

Zur Bestimmung der Expression intrazellulärer Ig kappa/lambda-Leichtketten, wurden in einer 96-Loch-Platte je 1×10^5 Zellen in 200 μl pro Vertiefung ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 250 μl Inside Fix für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgte ein erneuter Waschschrift mit FACS-Puffer. Danach wurden sie mit je 100 μl Färbelösung (91 μl Inside Perm + 9 μl Maus-anti-Ig kappa light-chain-APC) bzw. (91 μl Inside Perm + Maus-anti-Ig lambda light-chain- FITC) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit Inside Perm gewaschen, in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Zur Gewinnung der RNA wurden je 4×10^6 Zellen in 8 ml pro Kulturflasche ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mithilfe des RNeasy Mini Kits die RNA nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Zur Zellyse wurden 600 μl RLT-Puffer zugegeben, das Lysat auf eine QIASchredder Säule pipettiert und für 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 600 μl 70 % Ethanol hinzugefügt. Nach 15 sec Zentrifugation bei 8000 x g war die RNA an die RNeasy Säule gebunden. Nun erfolgte ein Waschschrift mit 350 μl RW1-Puffer. Dann wurden zur Entfernung genomischer DNA unter Verwendung des RNase-free DNase Sets von Qiagen 10 μl DNase I und 70 μl RDD-Puffer hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA erneut mit 350 μl RW1-Puffer und anschließend zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde die RNA mit 40 μl RNase-freiem Wasser eluiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bestimmung der RNA Qualität

Die RNA Qualität wurde mithilfe des RNA 6000 Nano Kits von Agilent am Bioanalyzer 2100 von Margarete Göbel, Institut für Virologie und Immunologie, Würzburg, geprüft.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA auf Eis aufgetaut. Nach dem Protokoll des Herstellers wurde das Qubit-Reagenz 1:200 mit dem Qubit-Puffer verdünnt. Da das Endvolumen 200 µl betragen muss, wurden in die 2 Kontrollröhrchen je 190 µl der zuvor hergestellten Lösung + 10 µl RNA-Standard 1 bzw. 2 gegeben, während die Versuchsröhrchen 199 µl Qubit-Lösung + 1 µl RNA enthielten. Nach einer Inkubationszeit von mind. 2 min bei Raumtemperatur wurden die Proben mit dem Qubit Fluorometer 1.0 gemessen.

Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des Omniscript RT-Kits von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Synthese wurden 0,5 µg RNA eingesetzt. Der Mastermix enthielt 1x RT-Puffer, je 0,5 µM dNTPs, 1 µM Oligo(dT)Primer, 10 Units RNase-Inhibitor, 4 Units Omniscript Reverse Transkriptase und so viel H₂O, dass das Endvolumen inklusive RNA 20 µl betrug. Die cDNA-Synthese wurde in einem Thermocycler bei 37 °C für 60 min durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine Methode, die die relative Quantifizierung von mRNA-Transkripten erlaubt, da die neu synthetisierten Produkte mit einem Fluorochrom markiert sind. Hier wurde sie verwendet, um die mRNA des *xbp1*-Gens zu quantifizieren. Der Mastermix enthielt 10 µl TaqMan-Gene-Expression-Mastermix, 1 µl TaqMan-Sonde und so viel H₂O, dass das Endvolumen inklusive 10 ng cDNA 20 µl

betrug. Als Sonden wurden 18S FAM Hs99999901_s1 (18S-RNA) als Housekeeping-Gen und XBP1 FAM Hs00231936_m1 (*xbp1*) zur Detektion der gesuchten mRNA verwendet. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde jede Probe als Triplikat pipettiert. Außerdem wurde für jede Sonde ein Triplikat ohne cDNA gemessen, um eine Kontamination des Mastermix mit DNA auszuschließen. Anschließend wurde die Quantifizierung mithilfe des iCyclers nach folgendem Programm durchgeführt:

Zyklus	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1	02:00	50	1x
2	10:00	95	1x
3			40x
Schritt 1	00:15	95	
Schritt 2	01:00	60	
4	HOLD	15	1x

Tabelle 2.1 Programm zur Durchführung der qPCR am iCycler

Zur Berechnung der Genexpression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet. Hierzu wird der Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) des Kontrollgens 18S-RNA vom Ct-Wert des Zielgens *xbp1* subtrahiert. Dies ergibt den ΔCt -Wert.

$$\Delta\text{Ct}_1 = \text{Ct}(\text{Zielgen unbehandelte Zellen}) - \text{Ct}(\text{Kontrollgen unbehandelte Zellen})$$

$$\Delta\text{Ct}_2 = \text{Ct}(\text{Zielgen behandelte Zellen}) - \text{Ct}(\text{Kontrollgen behandelte Zellen})$$

Um nun die beiden Gruppen (behandelte vs. unbehandelte Zellen) zu vergleichen, werden deren ΔCt -Werte voneinander subtrahiert, was den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ergibt.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_2 - \Delta\text{Ct}_1$$

Um die n-fache Expression des Zielgens in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erhalten, wird der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zur Basis 2 logarithmiert.

$$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})} = n\text{-fache Expression}$$

Der Genexpressionslevel des Zielgens in der Kontrollgruppe wird gleich 1 gesetzt. Werte < 1 geben somit eine verringerte, Werte > 1 eine gesteigerte Genexpression des Zielgens in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

2.2.6 Aufnahme der Radiotracer *in vitro*

Zur Analyse der Traceraufnahme *in vitro* wurden je 10×10^6 Zellen in 20 ml pro Kulturflasche ausgesät und mit der für die jeweilige Zelllinie ermittelten LC_{50} von MLN9708 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und in PBS aufgenommen, wobei jede Probe 400.000 Zellen in einem Volumen von 500 μ l enthielt. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde jede Probe als Triplikat pipettiert. Anschließend wurde das radioaktive Nuklid mit PBS auf eine Konzentration von 1 Mio Zerfälle/Minute (^{18}F -FDG) bzw. 1.5 Mio Zerfälle/Minute (^{11}C -MET) verdünnt. Jede Probe wurde mit 50 μ l radioaktiver Lösung versetzt und bei 37 °C inkubiert. Als Referenz diente ein Triplikat, das nur 50 μ l radioaktive Lösung, jedoch keine Zellen enthielt.

Um die Kinetik zu bestimmen, wurde die Traceraufnahme durch Inkubation auf Eis (2 min) zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt.

Zeitpunkte ^{18}F -FDG: 5-30-60-90-120 min

Zeitpunkte ^{11}C -MET: 5-15-30-45-60 min

Die Proben wurden zweimal mit 200 μ l kaltem PBS gewaschen (3360 x g, 2 min 4 °C) und die im Zellpellet enthaltene Radioaktivität mit dem Gammastrahlungszähler bestimmt.

In jedem Versuch wurden auch zwei Hintergrundwerte, d.h. leere Reaktionsgefäße, gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Tabellenkonfigurationsprogramm Microsoft Excel (Redmond, USA).

Zerfallskorrektur der Rohwerte

Für die Hintergrundkorrektur wurde von den im Gammastrahlungszähler gemessenen Rohwerten (Zerfälle/Minute) die Hintergrundaktivität (gemessene Aktivität in leerem Gefäß) subtrahiert.

$$A = R - H$$

Anschließend wurden die Werte halbwertszeitkorrigiert.

$$A_t = A \times e^{\ln 2 / T \times t}$$

A_t nach HWZ korrigierte Aktivität zum Zeitpunkt t in „counts per minute“

- A* gemessene Aktivität minus Hintergrundaktivität in „counts per minute“
H Hintergrundaktivität in „counts per minute“
R Rohwert (gemessene Aktivität ohne Korrektur) in „counts per minute“
t Halbwertszeit in Minuten
T (Position der Probe) $\times 1.24^1$

¹ Dieser Wert entspricht der experimentell ermittelten Mess- und Bearbeitungszeit des Gammacounters pro Probe

Mittelwertbildung aus Triplikaten

$$A_{t_MW} = (A_{t1} + A_{t2} + A_{t3})$$

A_{t1-3} Einzelwerte für die Aktivität, HWZ korrigiert, zum Zeitpunkt t , in „counts per minute“

A_{t_MW} mittlere Aktivität, HWZ korrigiert, zum Zeitpunkt t in „counts per minute“

Berechnung der prozentualen Aufnahme des radioaktiven Tracers

Die prozentuale Aufnahme eines Radiotracers gibt die relative Aktivität in einer Zellprobe im Verhältnis zur initial zugegebenen Aktivitätsmenge (Referenz) an.

$$\text{Zelluptake [\%]} = A_{t_MW_Zelluptake} / A_{t_MW_Referenzen}$$

2.2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Unterschiedshypothesen wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Unterschiede wurden ab einen p-Wert von < 0.05 als statistisch signifikant bezeichnet.

Zur Überprüfung der Zusammenhangshypothesen wurden Bravais-Pearson-Korrelationen berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika verschiedener MM-Zelllinien

Zur Darstellung der Tumorheterogenität des Multiplen Myeloms wurden Zelllinien mit unterschiedlichen Charakteristika ausgewählt.

Tabelle 3.1 Charakteristika der Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2

Zelllinie	INA-6	MM.1S	OPM-2
Spezies	human	human	human
Herkunft	Unbekannt	42 J. ♀	56 J. ♀
Immunglobulin	IgG kappa	IgA lambda	IgG lambda
Diagnose	Plasmazelleukämie	MM	MM, Rezidiv
Wachstum	Suspension	partiell adhärent	Suspension
Besonderheiten	IL-6 abhängig	steroidsensibel	t(4;14), hypertriploid
Relative Proliferationsrate*	2.5	1	2.5

*Lückerath et al. 2013

Die Zelllinie INA-6 stammt von einem Patienten mit Plasmazelleukämie (Burger et al. 2001). Eine Besonderheit dieser Zelllinie ist das IL-6-abhängige Wachstum. Der Entzug dieses Interleukins führt zum Zelltod (Brocke-Heidrich et al. 2004).

MM.1S wurden aus einer Patientin mit Multiplem Myelom isoliert. Sie wachsen partiell adhärent und sind steroidsensibel.

Die Zelllinie OPM-2 stammt von einer Patientin, die an einem rezidierten Multiplen Myelom litt. Bei OPM-2 führt die Translokation t(4;14) dazu, dass die Onkogene *fibroblast growth factor receptor 3 (fgfr3)* und *myeloma set domain gene (mmset)* unter Kontrolle des *igh*-Promotors geraten, was zu einer verstärkten Transkription führt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Kalff et al. 2012).

3.2 Reduktion der Viabilität durch MLN9708

Zur Bestimmung der mittleren letalen Konzentration (LC_{50}) von MLN9708 wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Diese zeigten eine signifikante Reduktion der Viabilität aller Zelllinien durch MLN9708 (Abb. 3.1). Außerdem wurde bei den schneller wachsenden Zelllinien INA-6 und OPM-2 die Viabilität schon mit geringeren Konzentrationen, 28,5 nM für INA-6 und 20 nM für OPM-2, auf 50 % gesenkt, als bei den langsam wachsenden MM.1S. Für diese wurden 36 nM benötigt.

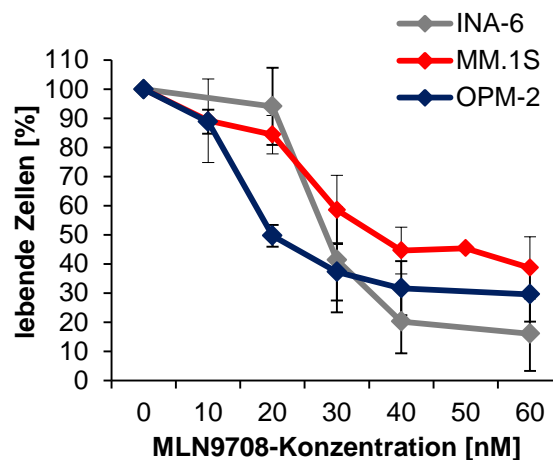


Abbildung 3.1 Reduktion der Viabilität durch MLN9708

Die Zelllinien wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von MLN9708 inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl lebender und toter Zellen durchflusszytometrisch mithilfe der PI-Färbung bestimmt. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Dargestellt ist der relative prozentuale Anteil lebender Zellen als Mittelwert (MW) mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) ($n = 20$). Die Behandlung mit MLN9708 reduzierte die Viabilität aller drei Zelllinien. Die mittlere letale Konzentration wurde für jede Zelllinie aus den gemittelten Dosis-Wirkungskurve graphisch ermittelt (INA-6 = 28,5 nM, MM.1S = 36 nM, OPM-2 = 20 nM).

3.3 Eignung von ^{11}C -MET zur Bildgebung des Multiplen Myeloms im Vergleich zu ^{18}F -FDG

Unbehandelte Zellen nahmen sowohl ^{11}C -MET als auch ^{18}F -FDG auf (Abb. 3.2 a-f). Die ^{11}C -MET-Aufnahme un behandelter Zellen war jedoch signifikant höher als die ^{18}F -FDG-Aufnahme. Auch hinsichtlich der Aufnahmekinetik unterschieden sich die beiden Tracer. Nach Erreichen eines Maximalwertes fiel die intrazelluläre Aktivität von ^{18}F -

FDG stark ab. Die aufgenommene Menge an ^{11}C -MET hingegen nahm bei MM.1S und OPM-2 über die gesamte Versuchsdauer zu. Für die Zelllinie INA-6 war nur ein leichter Abfall zu verzeichnen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Lückerath et al. 2013).

Humane Myelomzelllinien, die mit MLN9708 behandelt wurden, nahmen ebenfalls ^{11}C -MET und ^{18}F -FDG auf. Die relative Traceraufnahme sowie die Aufnahmekinetik behandelter Zellen unterschieden sich von denen unbehandelter Zellen (Abb. 3.2 a-f).

3.3.1 Aufnahmekinetik behandelter Zellen

Die intrazellulär gespeicherte ^{18}F -FDG-Aktivität nahm bei den Zelllinien INA-6 und OPM-2 nach Erreichen eines Maximalwertes (30 bzw. 60 min) ab. In MM.1S Zellen stieg die intrazelluläre Aktivitätsmenge nur leicht an (bis 60 min) und erreichte dann ein Plateau.

Die intrazelluläre ^{11}C -MET-Aktivität der Zelllinien MM.1S und OPM-2 nahm über die gesamte Versuchsdauer zu. Bei INA-6 war nach Erreichen des Maximalwertes (30 min) nur ein leichter Abfall zu verzeichnen.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ^{11}C wurde eine Versuchsdauer von 60 min gewählt, sodass unklar ist, ob die ^{11}C -MET-Aufnahme für MM.1S und OPM-2 nach 60 min schon maximal war oder noch weiter zunahm.

3.3.2 Prozentuale Traceraufnahme behandelter MM-Zellen

Vergleicht man für jede Zelllinie den Maximalwert der prozentualen ^{11}C -MET-Aufnahme unter Behandlung mit MLN9708 mit der ^{18}F -FDG-Aufnahme, erhält man für alle drei Zelllinien deskriptiv höhere Werte für ^{11}C -MET. Dieser Unterschied ist für die Zelllinien INA-6 und MM.1S signifikant ($p < 0.05$).

Da in der klinischen Praxis die PET-Aufnahme 60 min post injectionem durchgeführt wird, wurde für jede Zelllinie die prozentuale ^{11}C -MET-Aufnahme mit der ^{18}F -FDG-Aufnahme zum Zeitpunkt 60 min verglichen. Auch hier ergaben sich für alle drei

Zelllinien deskriptiv höhere Werte für ^{11}C -MET. Dieser Unterschied war für die Zelllinien INA-6 und MM.1S signifikant ($p < 0.05$).

3.3.3 Eignung der Tracer zur Differenzierung zwischen behandelten und unbehandelten MM-Zellen

In der Fähigkeit zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu differenzieren, gab es Unterschiede zwischen den Tracern. Die ^{11}C -MET-Aufnahme behandelter im Vergleich zu unbehandelten Zellen unterschied sich so stark, dass es über die gesamte Versuchsdauer bei allen drei Zelllinien möglich war, die Kurven der unbehandelten von denen der behandelten Zellen zu trennen. Mit ^{18}F -FDG gelang dies nur bei der Zelllinie MM.1S über den gesamten Zeitraum. Bei den anderen beiden Zelllinien kam es durch die Abnahme der intrazellulären Aktivität bei unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 60 min (INA-6) bzw. 90 min (OPM-2) zur Überschneidung der Kurven. Auch zu den Zeitpunkten, bei denen eine Unterscheidung möglich war, war die Differenz zwischen unbehandelten und behandelten Zellen bei INA-6 und OPM-2 kleiner als bei MM.1S.

Der Zeitpunkt, bei dem der Unterschied in der Aufnahme zwischen behandelten und unbehandelten Zellen maximal war, lag für ^{18}F -FDG bei 30 min (INA-6, OPM-2) bzw. 60 min (MM.1S), für ^{11}C -MET bei 15 min (INA-6) bzw. 60 min (MM.1S, OPM-2). Alle Unterschiede waren signifikant ($p < 0.05$). Die Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu dem Zeitpunkt, bei dem der Unterschied maximal war, waren mit ^{11}C -MET deskriptiv alle größer als mit ^{18}F -FDG. Letzteres galt analog für den Zeitpunkt 60 Minuten.

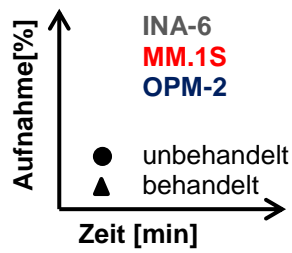
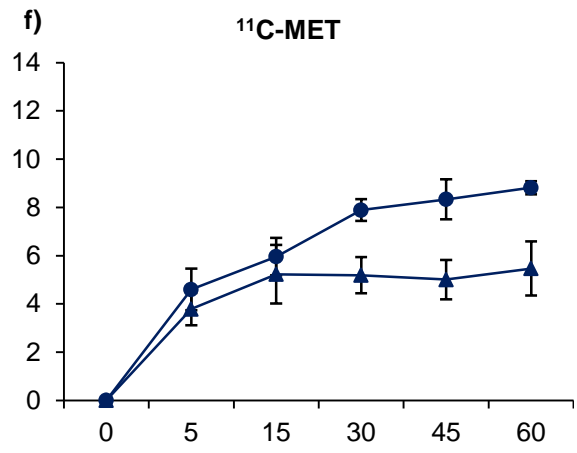
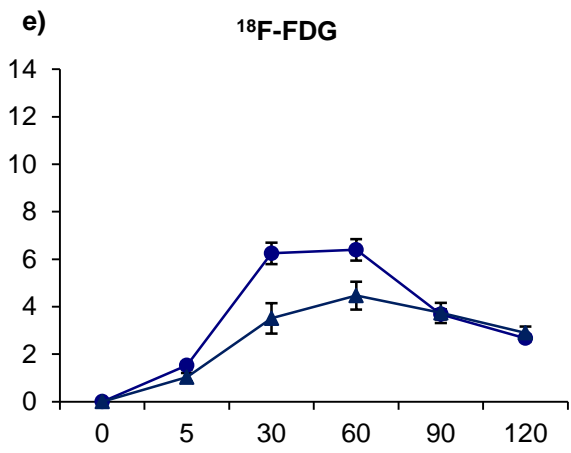
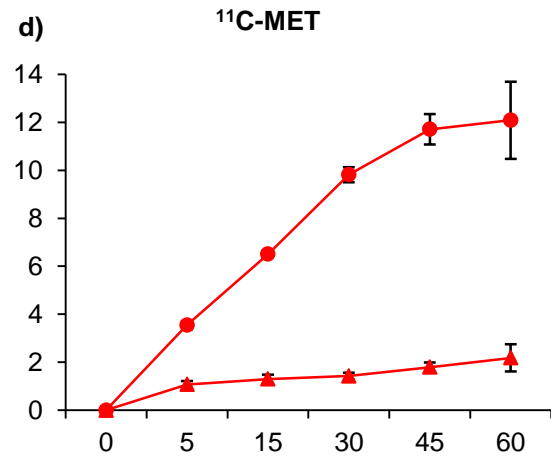
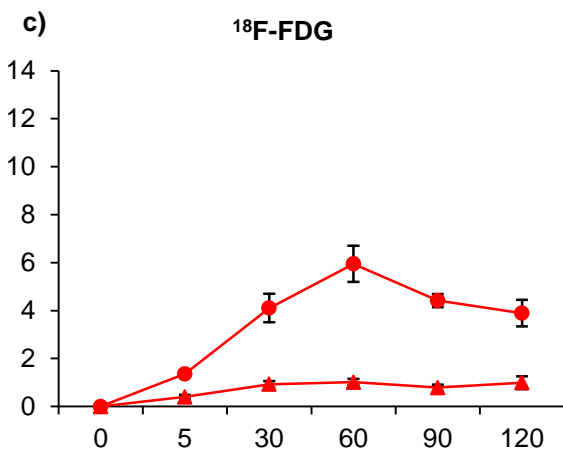
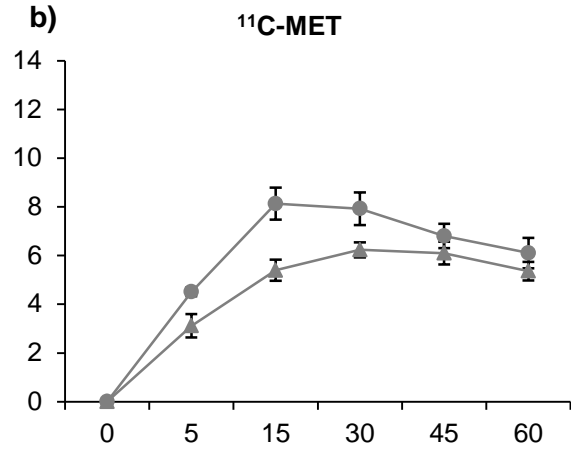
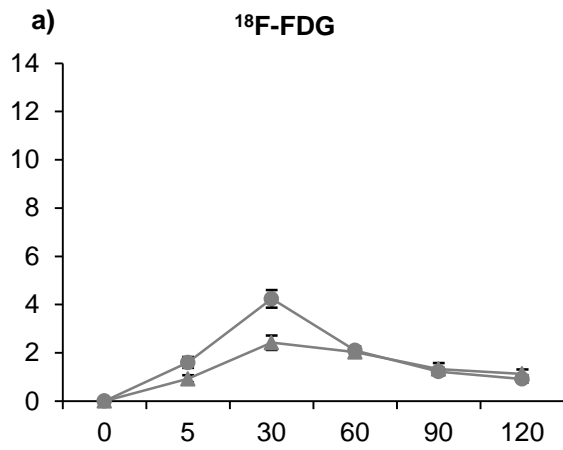


Abbildung 3.2 a-f Aufnahme von ^{11}C -MET vs. ^{18}F -FDG durch mit MLN9708 behandelte und unbehandelte Zellen

Die Zelllinien wurden für 48h mit der LC_{50} von MLN9708 behandelt bzw. mit normalem Nährmedium inkubiert. Anschließend wurden die Radiotracer ^{11}C -MET bzw. ^{18}F -FDG für ein Zeitintervall von 60 min (^{11}C -MET) bzw. 120 min (^{18}F -FDG) hinzugegeben und die Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und mit einem Gammastrahlungszähler gemessen. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und Hintergrund- und Halbwertszeit- korrigiert. Dargestellt ist jeweils die gemittelte prozentuale Aufnahme mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (MW +/- SEM, n = 5 für ^{18}F -FDG, n = 4 für ^{11}C -MET).

3.4 Einfluss von MLN9708 auf Charakteristika der Pathogenese des Multiplen Myeloms

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit MLN9708 die Traceraufnahme reduziert. Nun sollte untersucht werden, inwiefern sich die Behandlung mit MLN9708 auf biologische Charakteristika der MM-Pathogenese auswirkt und ob Veränderungen in der Traceraufnahme mit Veränderungen biologischer Charakteristika korrelieren.

3.4.1 Proliferation von unbehandelten und mit MLN9708 behandelten Zellen

Um herauszufinden, inwiefern sich eine Behandlung mit MLN9708 auf die Proliferation von MM-Zellen auswirkt, wurden die Zellen für 48 h mit der mittleren letalen Konzentration LC_{50} von MLN9708 behandelt. Anschließend wurde die relative Proliferationsrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen durchflusszytometrisch mithilfe einer Ki67-Färbung bestimmt. Hierbei zeigte sich bei allen Zelllinien eine signifikante Reduktion der Proliferation durch MLN9708 ($p < 0.05$) (Abb. 3.3). So sank die Proliferationsrate von INA-6 auf unter 50 %, von MM.1S auf unter 40 % und von OPM-2 auf unter 60 % des Ausgangswertes.

Weiterhin fiel auf, dass die langsam wachsende Zelllinie MM.1S tendenziell stärker in der Proliferation gehemmt wurde, als die schneller wachsenden Zelllinien INA-6 und OPM-2. Hierbei war der Unterschied zwischen MM.1S und OPM-2 signifikant ($p < 0.05$).

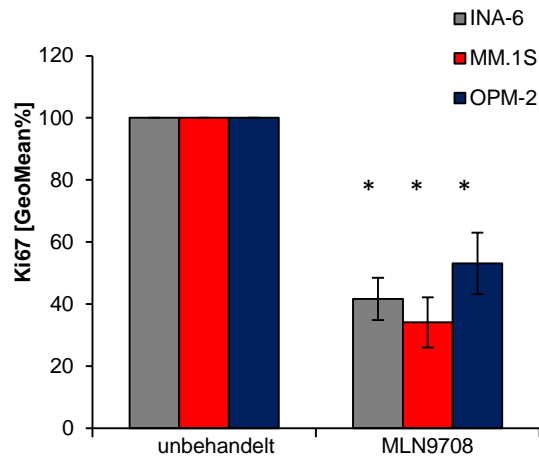
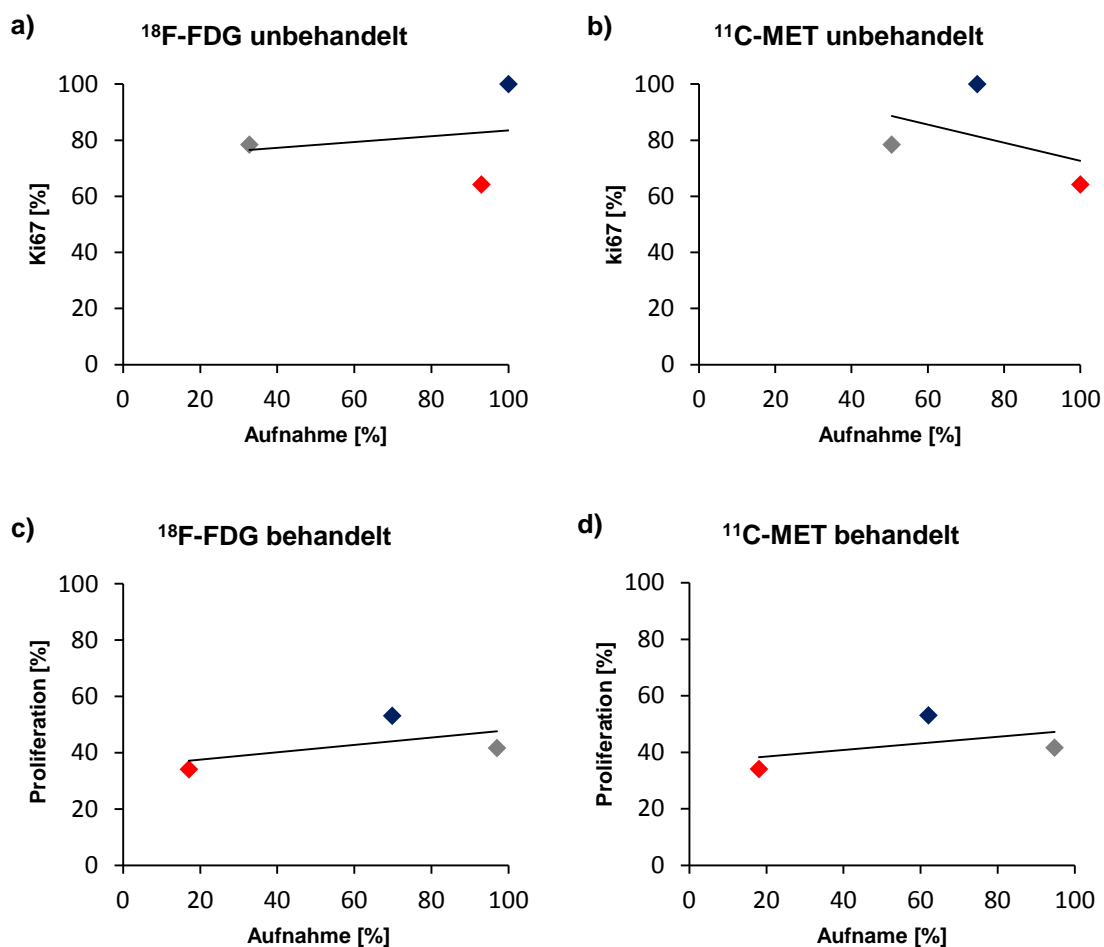


Abbildung 3.3 Reduktion der Proliferation durch MLN9708

Die Zellen wurden für 48 h mit der LC_{50} von MLN9708 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proliferationsrate wurde durchflusszytometrisch mittels Ki67-Färbung bestimmt. Dargestellt ist die relative Proliferationsrate der behandelten Zellen auf Basis der gemittelten Hintergrund-korrigierten Fluoreszenzintensität (GeoMean) (MW +/- Standardabweichung (SD); n = 5) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit MLN9708 führt zu einer signifikanten Verringerung der Proliferation in allen drei Zelllinien (* = $p < 0.05$).

Bei unbehandelten Zellen ging eine höhere ^{18}F -FDG-Aufnahme mit einer höheren Proliferation einher, der Zusammenhang war jedoch nur schwach ausgeprägt ($r = 0.21$; Abb. 3.4 a). Eine höhere ^{11}C -MET-Aufnahme ging mit einer niedrigeren Proliferation einher, ($r = -0.44$; Abb. 3.4 b), hierbei handelte es sich um einen mittelstarken Zusammenhang.

Bei behandelten Zellen zeigte sich für beide Tracer, dass eine niedrigere Traceraufnahme mit einer niedrigeren Proliferation einherging ($r = 0.55$ für ^{18}F -FDG und $r = 0.47$ für ^{11}C -MET) (Abb. 3.4 c-d).



INA-6 MM.1S OPM-2

Abbildung 3.4 Korrelation der Proliferation mit der Traceraufnahme

Korrelation der Proliferation mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (a) bzw. ^{11}C -MET (b) zum Zeitpunkt 60 min bei unbehandelten Zellen sowie Korrelation der Proliferation mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (c) und ^{11}C -MET (d) zum Zeitpunkt 60 min bei behandelten Zellen.

3.4.2 Expression von CXCR4 (SDF-1-Rezeptor) und CD138 (Syndecan-1) an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien

Da CXCR4 und CD138 eine wichtige Rolle für das Homing bzw. die Adhäsion von MM-Zellen spielen, wurde die Expression dieser beiden Oberflächenmarker auf MM-Zelllinien, MLN9708-induzierte Expressionsänderungen und eine mögliche Korrelation mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG bzw. ^{11}C -MET untersucht.

3.4.2.1 Expression von CXCR4

Die Expression des Homingrezeptors CXCR4 auf den verschiedenen Zelllinien unterschied sich signifikant ($p < 0.05$). Die Zelllinie OPM-2 wies im Vergleich zu INA-6 eine dreimal höhere, im Vergleich zu MM.1S sogar eine 7.5-mal höhere CXCR4-Expression auf (Abb. 3.5. a). Nach Behandlung mit MLN9708 war die CXCR4-Expression nur bei der Zelllinie OPM-2 signifikant reduziert und zwar auf mehr als die Hälfte des Ausgangswertes ($p < 0.05$) (Abb. 3.5 b).

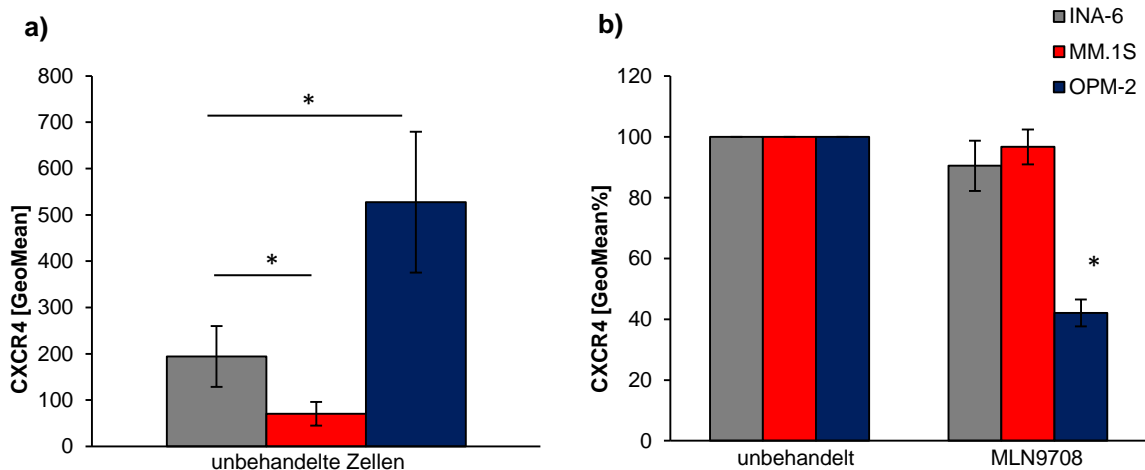


Abbildung 3.5 CXCR4-Expression an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien

Die Zellen wurden für 48 h mit der LC_{50} von MLN9708 behandelt bzw. in normalem Nährmedium inkubiert. Anschließend wurde die CXCR4-Expression der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

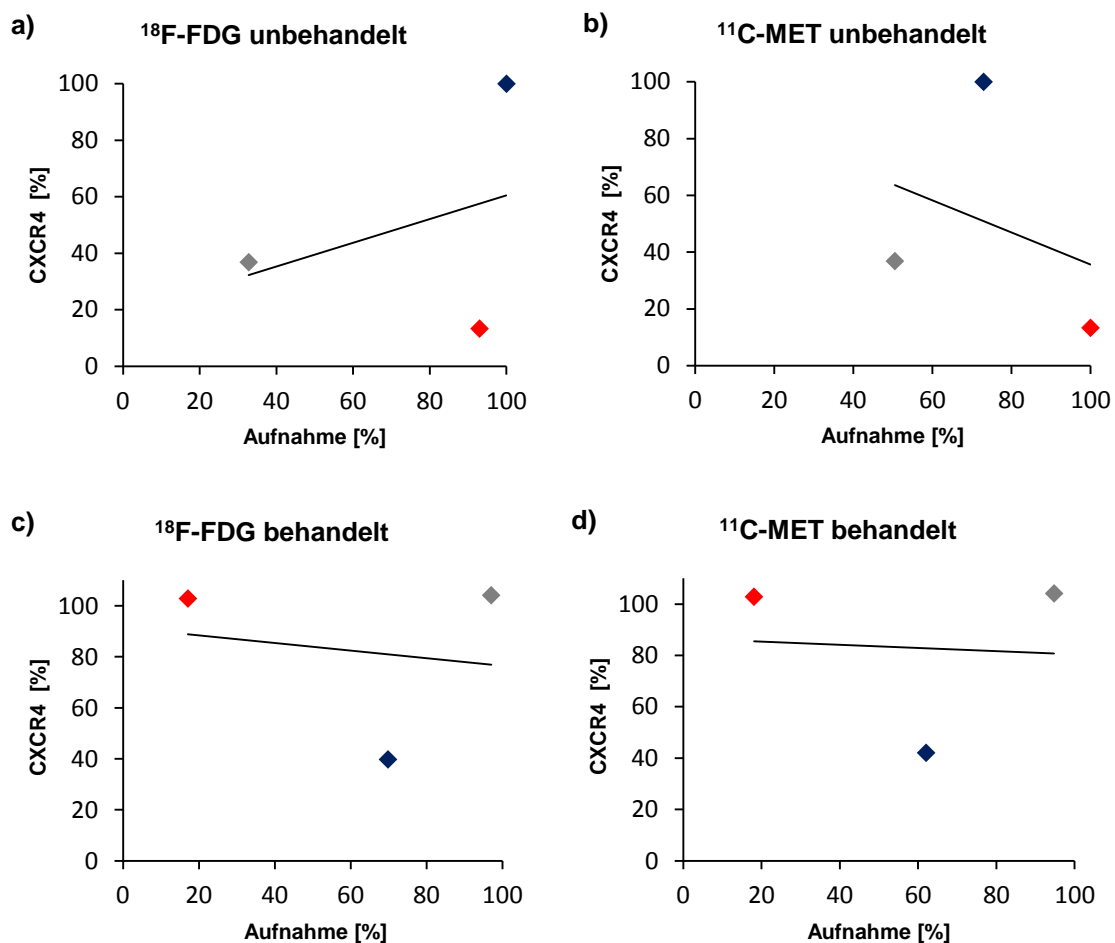
(a) CXCR4-Expression un behandelter MM-Zellen ($n = 5$).

(b) Relative CXCR4-Expression nach Behandlung mit MLN9708 ($n = 4$).

Dargestellt ist jeweils die Hintergrund-korrigierte gemittelte Fluoreszenzintensität (GeoMean; MW \pm SD) (* = $p < 0.05$).

Bei unbehandelten Zellen ging eine höhere ^{18}F -FDG-Aufnahme tendenziell mit einer Erhöhung der Expression von CXCR4 einher, der Zusammenhang war aber nur schwach ausgeprägt ($r = 0.34$; Abb. 3.6 a). Eine höhere ^{11}C -MET-Aufnahme ging tendenziell mit einer geringeren Expression von CXCR4 einher, auch hier war der Zusammenhang nur marginal ($r = -0.31$; Abb. 3.6 b).

Zwischen der Traceraufnahme und der Expression von CXCR4 bei behandelten Zellen konnte kein Zusammenhang festgestellt werden: $r = -0.16$ für ^{18}F -FDG bzw. $r = -0.07$ für ^{11}C -MET (Abb. 3.6 c-d).



INA-6 MM.1S OPM-2

Abbildung 3.6 Korrelation der Expression von CXCR4 mit der Traceraufnahme
 Korrelation der Expression von CXCR4 mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (a) bzw. ^{11}C -MET (b) zum Zeitpunkt 60 min bei unbehandelten Zellen sowie Korrelation der Expression von CXCR4 mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (c) bzw. ^{11}C -MET (d) zum Zeitpunkt 60 min bei behandelten Zellen.

3.4.2.2 Expression von CD138 an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien

Auch in der Expression von CD138 an der Zelloberfläche wurden signifikante Unterschiede deutlich ($p < 0.05$) (Abb. 3.7 a). Die CD138-Expression der Zelllinie OPM-2 war zweimal höher als die von MM.1S und sogar dreimal höher als die von INA-6.

Nach Behandlung mit MLN9708 kam es bei allen drei Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Expression von CD138 auf unter 15 % des Ausgangswertes ($p < 0.05$) (Abb. 3.7 b). Diese Reduktion war jedoch nicht darauf zurückzuführen, dass der prozentuale Anteil CD138-exprimierender Zellen abnahm (Abb. 3.7 c). Vielmehr wurde beobachtet, dass der Großteil der unbehandelten CD138-exprimierenden Zellen eine hohe Expression aufwies und nur ein kleiner Teil eine niedrige, das Verhältnis lag ca. bei 80:20. Bei behandelten Zellen kehrte sich dieses Verhältnis um (Abb. 3.7 d).

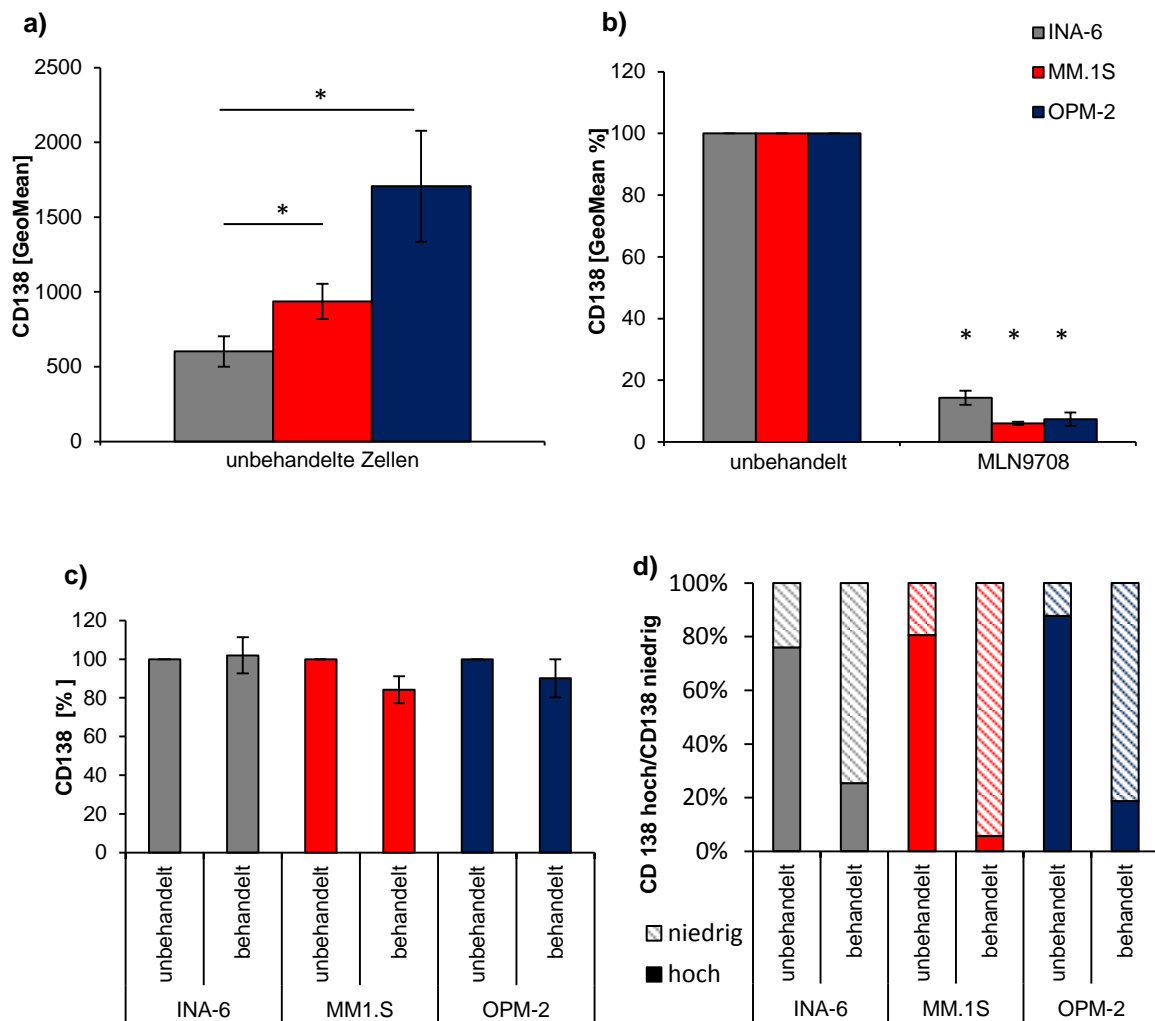


Abbildung 3.7 CD138-Expression an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien

Die Zellen wurden für 48 h mit der LC_{50} von MLN9708 behandelt bzw. in normalem Nährmedium inkubiert. Anschließend wurde die CD138-Expression der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

a) CD138-Expression un behandelter MM-Zellen (n = 5)

b) Relative CD138-Expression nach Behandlung mit MLN9708 (n = 4)

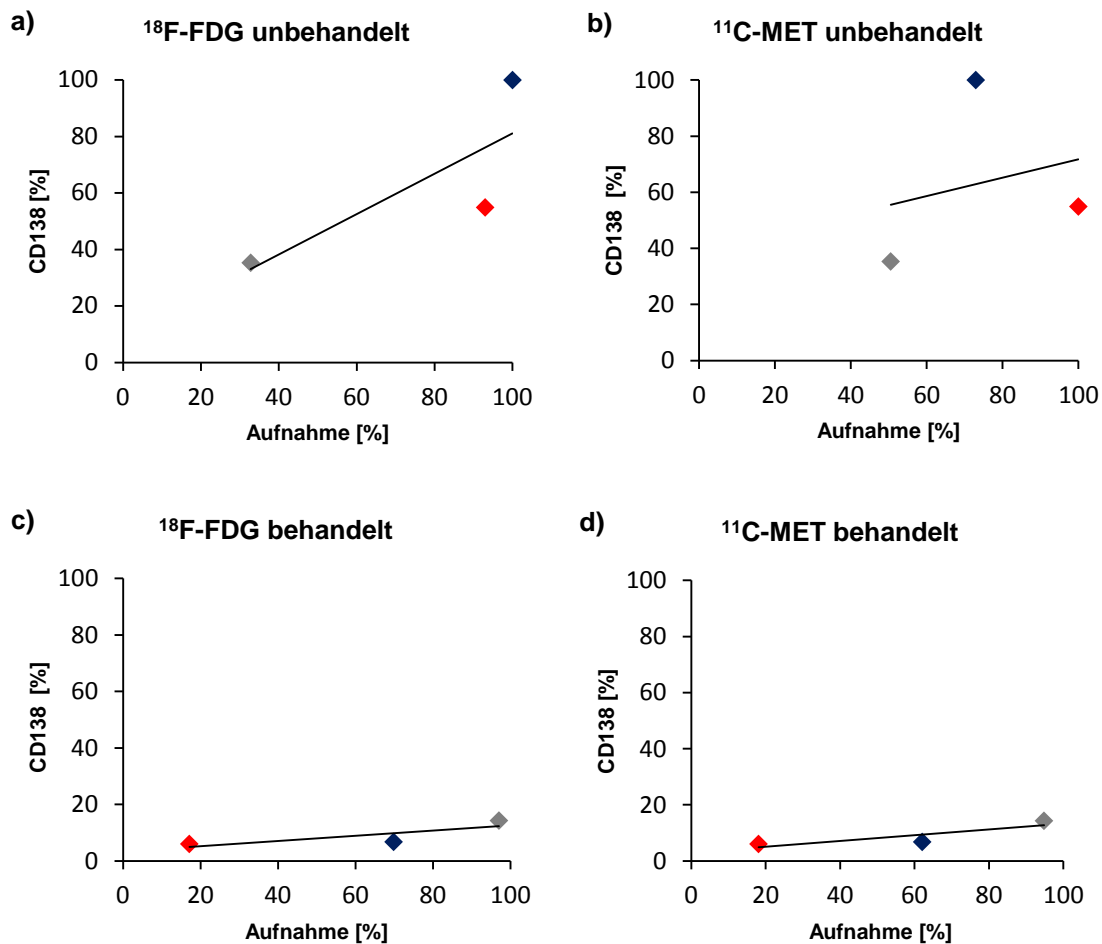
c) Prozentualer Anteil CD138 positiver Zellen in der Gesamtpopulation

d) Verhältnis von CD138 hoch/niedrig

Dargestellt ist jeweils die Hintergrund-korrigierte gemittelte Fluoreszenzintensität (GeoMean; MW \pm SD) (* = p < 0.05).

Bei unbehandelten Zellen ging eine höhere ^{18}F -FDG-Aufnahme mit einer höheren Expression von CD138 einher, dieser Zusammenhang war sehr stark ausgeprägt ($r = 0.79$; Abb. 3.8 a). Für ^{11}C -MET ergab sich ebenfalls ein positiver Zusammenhang, dieser war allerdings nur gering ausgeprägt ($r = 0.24$; Abb. 3.8 b).

Bei behandelten Zellen zeigte sich je geringer die Traceraufnahme war, desto geringer war die Expression von CD138, sodass sich ein stark positiver Zusammenhang ergab ($r = 0.81$ für ^{18}F -FDG bzw. $r = 0.86$ für ^{11}C -MET) (Abb. 3.8 c-d).



INA-6 MM.1S OPM-2

Abbildung 3.8 Korrelation der Expression von CD138 mit der Traceraufnahme
 Korrelation der Expression von CD138 mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (a) bzw. ^{11}C -MET (b) zum Zeitpunkt 60 min bei unbehandelten Zellen sowie Korrelation der Expression von CD138 mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (c) bzw. ^{11}C -MET (d) zum Zeitpunkt 60 min bei behandelten Zellen.

3.4.3 Expression intrazellulärer Immunglobulin kappa/lambda-Leichtketten

Um die Zelllinien bezüglich des Vorhandenseins intrazellulärer Leichtketten zu charakterisieren und den Einfluss von MLN9708 auf die Expression dieser zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Wie ihrer Herkunft nach zu erwarten (Tab. 3.1), wurden bei der Zelllinie INA-6 eine intrazelluläre Expression von kappa-Leichtketten, bei MM.1S und OPM-2 von lambda-Leichtketten beobachtet. In der Quantität der intrazellulären Leichtketten unbehandelter Zellen ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). So zeigte die Zelllinie OPM-2 im Vergleich zu MM.1S eine 1.5-mal höhere, im Vergleich zu INA-6 sogar eine mehr als 2.5-mal höhere intrazelluläre Expression von Ig-Leichtketten (Abb. 3.9 a).

Nach Behandlung mit MLN9708 war die intrazelluläre Expression der Ig-Leichtketten in allen drei Zelllinien signifikant reduziert ($p < 0.05$). Bei der Zelllinie INA-6 sank die Expression auf unter 50 %, bei MM.1S und OPM-2 auf unter 80 % bzw. auf 60 % des Ausgangswertes (Abb. 3.9 b).

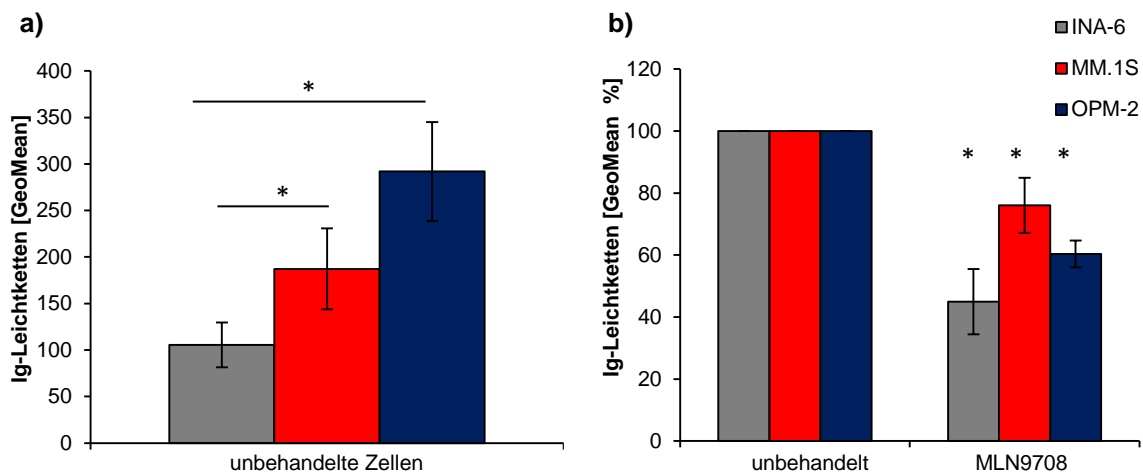


Abbildung 3.9. Expression intrazellulärer Ig-Leichtketten in MM-Zellen

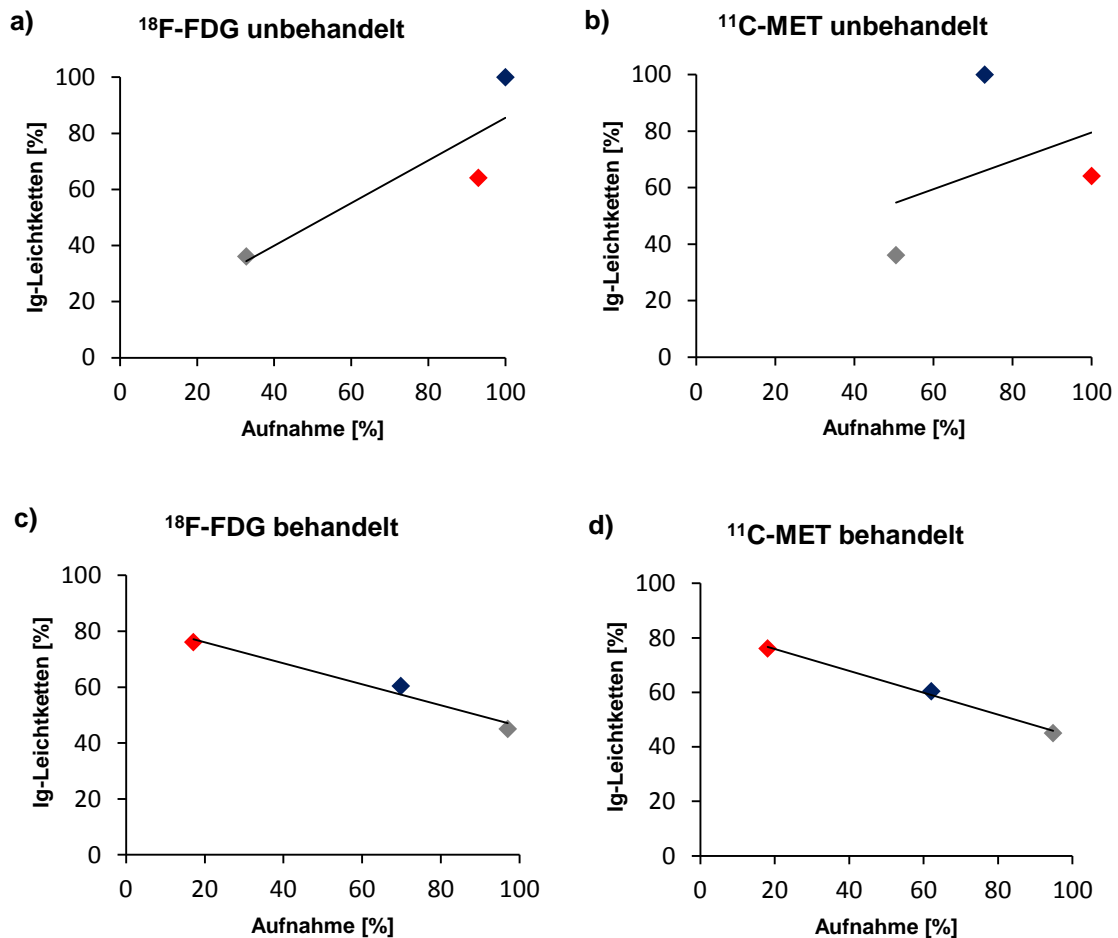
Die Zellen wurden für 48 h mit der LC_{50} von MLN9708 behandelt bzw. in normalem Nährmedium inkubiert. Anschließend wurde die Expression intrazellulärer Leichtketten durchflusszytometrisch bestimmt.

(a) Leichtkettenexpression unbehandelter MM-Zellen ($n = 4$).

(b) Relative Leichtkettenexpression nach Behandlung mit MLN9708 ($n = 4$).

Dargestellt ist jeweils die Hintergrund-korrigierte gemittelte Fluoreszenzintensität (GeoMean; MW \pm SD) (* = $p < 0.05$).

Bei unbehandelten Zellen ging eine höhere Traceraufnahme mit einem Anstieg der intrazellulär vorhandenen Ig-Leichtketten einher, dieser Zusammenhang war für ^{18}F -FDG stark ($r = 0.88$; Abb. 3.10 a) und für ^{11}C -MET etwas schwächer ausgeprägt ($r = 0.39$; Abb. 3.10 b). Bei behandelten Zellen zeigte sich je niedriger die Traceraufnahme war, desto höher war die Anzahl intrazellulär vorhandener Ig-Leichtketten, sodass sich eine stark negative Zusammenhang ergab: $r = -0.98$ für ^{18}F -FDG bzw. $r = -1$ für ^{11}C -MET (Abb. 3.10 c-d).



INA-6 MM.1S OPM-2

Abbildung 3.10 Korrelation der Ig-Leichtketten mit der Traceraufnahme

Korrelation der Ig-Leichtketten mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (a) bzw. ^{11}C -MET (b) zum Zeitpunkt 60 min bei unbehandelten Zellen sowie Korrelation der Ig-Leichtketten mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG (c) bzw. ^{11}C -MET (d) zum Zeitpunkt 60 min bei behandelten Zellen.

3.4.4 Expression von *xbp-1* bei behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen

Die Zelllinien wurden mithilfe einer qPCR auf Veränderungen in der Expression des Transkriptionsfaktors *xbp-1* nach Behandlung mit MLN9708 untersucht. Hierbei zeigten sich für INA-6 und OPM-2 keine signifikanten Unterschiede. Bei der Zelllinie MM.1S konnte eine marginal signifikante Reduktion der Expression unter Behandlung beobachtet werden ($p < 0.1$) (Abb. 3.11).

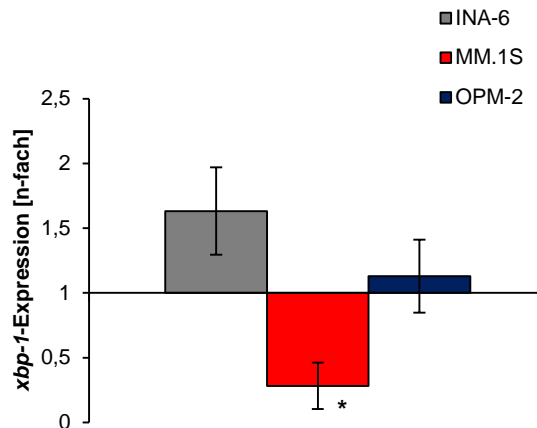


Abbildung 3.11 Auswirkung von MLN9708 auf die *xbp-1*-Expression

Zur cDNA behandelter und un behandelter Zellen wurden eine Sonde zur Detektion der mRNA eines Housekeeping-Gens und eine Sonde zur Detektion der *xbp1*-mRNA gegeben. Anschließend wurde die Quantifizierung der mRNA mithilfe eines iCyclers durchgeführt, wobei alle Proben in Triplikaten gemessen wurden. Die Behandlung mit MLN9708 führte zu einer marginal signifikanten Reduktion der Expression von *xbp1*-mRNA bei der Zelllinie MM.1S (* = $p < 0.1$, $n = 5$). Dargestellt ist die gemittelte n-fache Expression behandelter Zellen im Vergleich zu un behandelten Zellen mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (MW \pm SEM).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die MM-Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2 mit dem Proteasominhibitor MLN9708 behandelt. Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mit dem Standardtracer ^{18}F -FDG oder dem in der Anwendung beim Multiplen Myelom neuen Aminosäuretracer ^{11}C -MET inkubiert und die Aufnahme der Tracer zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Außerdem wurde die Traceraufnahme in Bezug zu biologischen Merkmalen der MM-Pathogenese gesetzt.

Hierdurch soll geklärt werden ob ^{11}C -MET besser zur Diagnostik, zum Therapiemonitoring, zur Stadieneinteilung und der Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet ist als ^{18}F -FDG.

Viele Studien haben bereits einen zusätzlichen Nutzen neuer bildgebender Verfahren zur Beantwortung dieser Fragestellungen zeigen können (s. 4.1 - 4.3). Aufgrund verschiedener Nachteile dieser Verfahren, welche ausführlich im Abschnitt 1.6 dargestellt sind, ist es dennoch nötig, präzisere Methoden der Bildgebung, z.B. durch die Verwendung neuer Radiotracer wie ^{11}C -MET, zu entwickeln, da bisher kein Verfahren existiert, mit dem all diese Fragen zuverlässig beantwortet werden können.

4.1 Ist ^{11}C -MET besser zur Diagnostik des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

Der zusätzliche Nutzen neuer bildgebender Verfahren wie MRT und ^{18}F -FDG-PET in der Diagnostik des Multiplen Myeloms wurde bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen (Dimopoulos et al. 2009).

Die Wertigkeit von ^{11}C -MET zur Diagnostik des Multiplen Myeloms hingegen wurde außerhalb unsere Arbeitsgruppe erst in wenigen Studien mit geringer Patientenzahl untersucht (vgl. Dankerl et al. 2007, Nishizawa et al. 2010, Nakamoto et al. 2012).

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die ^{11}C -MET-Aufnahme unbehandelter Myelomzellen signifikant höher war als die ^{18}F -FDG-Aufnahme. Dies spricht dafür, dass ^{11}C -MET eine höhere Sensitivität zur Detektion von MM-Zellen aufweisen könnte als ^{18}F -FDG. Aufgrund dieser Beobachtung sowie bereits publizierten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Lückerath

et al. 2013) wurde in unserer Arbeitsgruppe die ^{11}C -MET- mit der ^{18}F -FDG-Aufnahme im Mausmodell (MM-Xenograft) untersucht; es zeigte sich eine signifikant höhere ^{11}C -MET-Aufnahme der Tumorzellen im Vergleich zu ^{18}F -FDG (Lückerath et al. 2015). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass sich ^{11}C -MET besser zur Diagnostik des Multiplen Myeloms eignen könnte als ^{18}F -FDG, da mit ^{11}C -MET auch sehr kleine Läsionen schon entdeckt werden könnten. Diese vielversprechenden Ergebnisse motivierten eine erste klinische Studie in der die ^{11}C -MET- mit der ^{18}F -FDG-Aufnahme in Patienten, die an einem Hochrisiko-Myelom erkrankt waren, verglichen wurde: wieder zeigte sich eine signifikant höhere ^{11}C -MET-Aufnahme im Vergleich zu ^{18}F -FDG. Außerdem konnten mit ^{11}C -MET mehr Läsionen entdeckt werden als mit ^{18}F -FDG (Lapa et al. 2016). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls zeigten, dass mit ^{11}C -MET potenziell mehr Läsionen *in vivo* beim Menschen detektiert werden können als mit ^{18}F -FDG (Dankerl et al. 2007, Nishizawa et al. 2010, Nakamoto et al. 2012).

Die Verwendung von ^{11}C -MET statt ^{18}F -FDG hätte für die Patienten also den großen Vorteil, dass die Erkrankung möglicherweise bereits in einem früheren Krankheitsstadium mit besseren Heilungschancen diagnostiziert werden könnte.

Interessant zu untersuchen wäre auch, ob mit ^{11}C -MET bereits Vorstufen des Multiplen Myeloms, wie z.B. das asymptomatische Myelom detektiert werden können. Hierzu beginnt in unserer Arbeitsgruppe gerade eine Studie, die u.a. die ^{11}C -MET- mit der ^{18}F -FDG-Aufnahme im asymptomatischen Myelom vergleichend untersucht.

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich außerdem, dass die intrazelluläre Aktivität von ^{18}F -FDG bei unbehandelten Zellen nach Erreichen eines Maximalwertes stark abfiel, während die aufgenommene Menge an ^{11}C -MET über die gesamte Versuchsdauer zunahm bzw. nur leicht abfiel. Dies könnte einen Vorteil für den klinischen Alltag darstellen: Kommt es zu einer zeitlichen Verzögerung im klinischen Ablauf, könnte die PET-Aufnahme trotz der kurzen Halbwertszeit von ^{11}C noch durchgeführt werden, was den Stationsalltag entspannen und dem Patienten einen erneuten Termin zur Untersuchungsdurchführung ersparen würde.

4.2 Ist ^{11}C -MET besser zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

Verschiedene Studien haben bereits den Nutzen neuer bildgebender Verfahren zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms untersucht. Die MRT scheint hierfür nur bedingt geeignet zu sein, da Veränderungen der Signalintensität im MRT zwar mit dem Therapieansprechen korrelieren können, sich häufig aber trotz Therapieansprechens keine Änderung der Signalintensität zeigt (Rubini et al. 2016). Spezielle funktionelle MRT-Techniken wie die Diffusionsgewichtete MRT (DWI) zeigen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich des Therapiemonitorings des Multiplen Myeloms und müssen in weiterführenden Studien untersucht werden (Zamagni et al. 2016).

Die Eignung der ^{18}F -FDG-PET/CT zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms wurde schon in einigen Studien untersucht. So wurde bereits gezeigt, dass Veränderungen der ^{18}F -FDG-Aufnahme eine Aussage über das Therapieansprechen zulassen, wenn konventionelle bildgebende Verfahren noch keine Veränderungen aufweisen (Caldarella et al. 2012). Des Weiteren wies eine Mausmodell-Studie nach, dass mit Hilfe einer ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchung das Therapieansprechen auf den Proteasominhibitor MLN9708 beurteilt werden konnte (Duncan et al. 2013). Auch bei Patienten nach autologer Stammzelltransplantation war eine Beurteilung des Therapieansprechens mithilfe einer ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchung möglich (Nanni et al. 2013).

Bis jetzt wurde aber keine Studie außerhalb unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, die die Wertigkeit von ^{11}C -MET zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms untersucht hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Differenz in der Traceraufnahme zwischen mit dem Proteasominhibitor MLN9708 behandelten und unbehandelten Zellen mit ^{11}C -MET im gesamten Untersuchungszeitraum größer war als mit ^{18}F -FDG. Dies weist darauf hin, dass eine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mit ^{11}C -MET besser gelingt als mit ^{18}F -FDG. Außerdem zeigten sich mit ^{11}C -MET zu früheren Zeitpunkten größere Differenzen in der Traceraufnahme zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe die ^{11}C -MET- und die ^{18}F -FDG-Aufnahme im Mausmodell (MM-Xenograft) bei mit Bortezomib behandelten Mäusen

untersucht. Hierbei zeigte sich bereits 24 h nach Therapiebeginn eine signifikante Reduktion der ^{11}C -MET-Aufnahme, wohingegen die ^{18}F -FDG-Aufnahme unverändert blieb (Lückerath et al. 2015).

Bestätigt sich dieser Effekt im Menschen, hätte dies für die Patienten den Vorteil, dass man früher und sicherer eine Aussage über das Therapieansprechen machen könnte. Dies würde bedeuten, dass man im Falle eines Nichtansprechens die Patienten nicht unnötig lange einer für sie wirkungslosen Therapie mit all ihren Komplikationen aussetzen müsste, sondern früher auf ein anderes Therapieregime umstellen könnte, was die Heilungschancen der Patienten verbessern würde. Überdies könnten so unnötige Kosten reduziert werden. Vor diesem Hintergrund plant unsere Arbeitsgruppe derzeit eine Studie, die die Detektion des Therapieansprechens mit ^{11}C -MET-PET, ^{18}F -FDG-PET und MRT bei an einem Multiplem Myelom erkrankten Patienten vergleichen soll. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur die ^{11}C -MET-Aufnahme unbehandelter, sondern auch die behandelte Zellen höher ist, als die entsprechende ^{18}F -FDG-Aufnahme. Dies legt nahe, dass mit ^{11}C -MET unter Behandlung noch geringere Mengen an MM-Zellen detektiert werden könnten, als mit ^{18}F -FDG, sodass eine genauere Aussage über den Grad des Therapieansprechens möglich wäre. So könnte auch eine minimale Resterkrankung, die sogenannte *minimal residual disease* (MRD), detektiert werden, was den vorzeitigen Abbruch der Therapie bei vermeintlicher Totalremission verhindern würde: Während mit ^{18}F -FDG schon keine Läsionen mehr nachweisbar wären, könnten mit ^{11}C -MET oft noch verbliebene kleine Läsionen dargestellt werden, was die Entscheidung zur Therapiefortführung oder -intensivierung nach sich ziehen und somit potentiell bessere Überlebenschancen bieten würde.

Auch ist davon auszugehen, dass ein Rezidiv im ^{11}C -MET-PET früher entdeckt werden könnte als im ^{18}F -FDG-PET, sodass die Patienten schneller einer adäquaten Therapie zugeführt werden könnten, was ebenfalls die Heilungschancen verbessern würde.

4.3 Ist ^{11}C -MET besser zur Stadieneinteilung und Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet als ^{18}F -FDG?

Die Eignung neuer bildgebender Verfahren zur Stadieneinteilung und Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms wurde bereits in einigen Studien untersucht.

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Anzahl fokaler Läsionen im MRT mit laborchemischen Prognoseparametern wie Albumin und C-reaktivem Protein (CRP) korreliert, eine Korrelation mit anderen gängigen prognostischen Laborparametern wie beta2-Mikroglobulin oder mit zytogenetischen Mutationen konnte nicht gefunden werden. Es war aber möglich mithilfe der MRT Subgruppen von Patienten zu definieren, die eine bessere Überlebenschance hatten (Walker et al. 2007).

Für die ^{18}F -FDG-PET wurde nachgewiesen, dass die Anzahl FDG-avidere fokaler Läsionen sowohl mit prognostisch relevanten laborchemischen Parametern wie beta-2-Mikroglobulin, CRP und Laktatdehydrogenase (LDH) korreliert, als auch mit zytogenetischen Mutationen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Bartel et al. 2009).

Bis jetzt wurde aber keine Studie außerhalb unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, die die Eignung von ^{11}C -MET zur Stadieneinteilung und zur Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms untersucht hat.

Um die Wertigkeit von ^{11}C -MET bzw. ^{18}F -FDG hinsichtlich der Stadieneinteilung und der Prognoseevaluation des Multiplen Myeloms zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme der Tracer mit unterschiedlichen Faktoren, die im Zusammenhang mit der Biologie des Multiplen Myeloms stehen, korreliert.

In der Höhe der ^{11}C -MET-Aufnahme zeigten sich bei unbehandelten Zellen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Die Höhe der ^{11}C -MET-Aufnahme korrelierte wiederum unterschiedlich mit Faktoren, die im Zusammenhang mit der Aggressivität einer Zelllinie stehen. So ergab sich für die ^{11}C -MET-Aufnahme und die Proliferationsrate sowie die CXCR4-Expression ein leicht negativer, für die ^{11}C -MET-Aufnahme und die Leichtkettenproduktion sowie die CD138-Expression ein leicht positiver Zusammenhang. Interessanterweise war die Korrelation zwischen der ^{18}F -FDG-Aufnahme und den genannten Faktoren stets positiv, was darauf schließen lässt, dass ^{18}F -FDG besser zur Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms geeignet sein könnte als ^{11}C -MET. Die Ergebnisse hinsichtlich ^{18}F -FDG stehen im Einklang mit der o.g.

Literatur, in der ebenfalls ein Nutzen von ^{18}F -FDG zur Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms gezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse bezüglich ^{11}C -MET stehen teilweise im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe, bei denen ein stärkerer Zusammenhang zwischen der ^{11}C -MET-Aufnahme und den genannten Faktoren nachgewiesen werden konnte (Lückerath et al. 2013). Da bei jener Studie mehr Daten zur Verfügung standen, als bei der hier vorliegenden Arbeit, ist es möglich, dass diese Ergebnisse aufgrund einer zu geringen Datenmenge nicht reproduziert werden konnten.

Außerdem sei darauf hingewiesen, dass die Versuche zur Bestimmung der Traceraufnahme und den genannten Faktoren nicht parallel, sondern nacheinander durchgeführt wurden, was ein gewisses Fehlerrisiko birgt.

Um die Prognoseevaluation unter Therapie zu beurteilen, wurden die Traceraufnahme und die Ausprägung von biologischen Faktoren der MM-Pathogenese bei behandelten Zellen korreliert.

Da sich in der qPCR keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *xpb1* bei behandelten und unbehandelten Zellen zeigten, wurde auf eine Korrelation mit der Traceraufnahme verzichtet. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass der Zeitpunkt, zu dem die RNA behandelter Zellen isoliert wurde, mit 48 h zu spät gewählt war und somit keine Veränderungen der Genexpression mehr detektiert werden konnten. Es wäre interessant zu untersuchen, ob man, wenn man die RNA zu einem früheren Zeitpunkt isoliert, zum gleichen Ergebnis kommt. Denn einige Studien konnten zeigen, dass Unterschiede in der *xpb1*-Expression prognostischen Wert besitzen könnten (Bagratuni et al. 2010, Ling et al. 2012).

Für die Traceraufnahme und die Proliferation sowie die Expression von CD138 ergaben sich positive Korrelationen, d.h. je niedriger die Traceraufnahme, desto niedriger waren auch die Proliferation bzw. die CD138-Expression bei behandelten Zellen. Im Falle von CD138 ist besonders interessant, dass unter Therapie nicht der prozentuale Anteil CD138-exprimierender Zellen, sondern die CD138-Expressionsstärke an der Zelloberfläche abnahm. Studien konnten zeigen, dass eine Verminderung der CD138-Expression mit verringertem Wachstum und verstärkter Apoptose von MM-Zellen einhergeht (Reijmers et al. 2010), sodass der Schluss, dass eine Verminderung der

CD138-Expression positiven prognostischen Wert besitzt, durchaus nahe liegt. Proliferation und CD138-Expression könnten also unter Therapie als Prognoseparameter, deren Aktivität mit der Traceraufnahme korreliert, geeignet sein. Zwischen der ^{18}F -FDG- bzw. ^{11}C -MET-Aufnahme und der Expression von CXCR4 konnte bei behandelten Zellen kein Zusammenhang beobachtet werden. Die Korrelation zwischen der Traceraufnahme und der Expression intrazellulären Leichtketten war sogar negativ. Dieses Ergebnis ist besonders im Fall von ^{11}C -MET überraschend, denn wenn die ^{11}C -MET-Aufnahme die generelle MET-Aufnahme der Zellen widerspiegelt, stehen den Zellen durch eine geringere ^{11}C -MET-Aufnahme weniger Aminosäuren zur Verfügung, sodass man annehmen würde, dass die Leichtkettenproduktion bei geringerer ^{11}C -MET-Aufnahme abnimmt und sich somit eine positive Korrelation ergeben müsste. In dem hier durchgeführten Versuch wurden allerdings nur die intrazellulär vorhandenen Leichtketten berücksichtigt. Es wäre interessant zu sehen, ob man mit einem Versuch der die Menge an sezernierten Leichtketten misst, z.B. einem ELISA, zum gleichen Ergebnis kommt. Außerdem wäre es sehr hilfreich zu untersuchen, ob ^{11}C -MET überhaupt in von Myelomzellen gebildete Paraproteine eingebaut wird. Studien konnten zeigen, dass radioaktiv markiertes MET zwar in Proteine eingebaut wird, aber auch über andere Stoffwechselwege metabolisiert wird, was eine Quantifizierung der Proteinsynthese anhand der MET-Aufnahme schwierig macht (Ishiwata et al. 1988, Jager et al. 2001). Überdies wäre es möglich, dass die Zellen trotz der geringeren Leichtkettenproduktion stärker proliferieren, was sich in einer erhöhten ^{11}C -MET-Aufnahme widerspiegeln könnte (Lückerath et al. 2013).

Auffallend ist, dass sich bei allen Versuchen die Korrelationswerte für ^{11}C -MET und ^{18}F -FDG nicht wesentlich unterscheiden, sondern immer in die gleiche Richtung weisen. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Studie durchgeführt, in der die Eignung des ^{18}F -FDG-PET/CT zur Prognoseevaluierung bei Patienten mit einem Multiplem Myelom Rezidiv nach Stammzelltransplantation untersucht wurde (Lapa et al. 2014). Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl ^{18}F -FDG-avider Läsionen und Standardprognoseparametern wie FLC-Quotienten, beta2-Mikroglobulin und LDH. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der bereits oben erwähnten Studie von Bartel et al. in der ebenfalls eine Korrelation zwischen der Anzahl ^{18}F -FDG-avider Läsionen und laborchemischen Prognoseparametern gefunden wurde (vgl. Bartel et al.

2009). Diese Ergebnisse motivierten eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe, in der die Patienten sowohl PET-CT-Aufnahmen mit ^{11}C -MET als auch mit ^{18}F -FDG erhielten, welche mit klinischen Parametern korreliert wurden. Neben den bereits unter Abschnitt 4.1 beschriebenen Ergebnissen dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein intramedullärer Läsionen und abnormer beta2-Mikroglobulinwerte sowie Erhöhung der freien Leichtketten für beide Tracer gezeigt werden, eine Korrelation zwischen der Höhe der Traceraufnahme und den laborchemischen Parametern ergab sich jedoch nicht. Interessanterweise zeigte sich aber eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der ^{11}C -MET-Aufnahme und der Knochenmarksbeteiligung, welche als unabhängiges Maß der MM-Aggressivität und der Tumorlast gelten könnte (Lapa et al. 2016).

In einer bereits unter Abschnitt 4.1 und 4.2 erwähnten Studie unserer Arbeitsgruppe an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die bereits nach 24 h eine Reduktion der ^{11}C -MET-Aufnahme zeigten, länger überlebten und unter einer geringeren Tumorprogression litten. Zu diesem Zeitpunkt waren andere Parameter wie Proliferation, CD138 - und Leichtkettenexpression noch unverändert (Lückerath et al. 2015). Dies lässt darauf schließen, dass nicht unbedingt die Korrelation zwischen der ^{11}C -MET-Aufnahme und der Ausprägung bestimmter Parameter zur Evaluation der Prognose dienlich ist, sondern dass schon die frühe Reduktion der ^{11}C -MET-Aufnahme alleine an prognostischem Wert besitzt. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen der Höhe der ^{11}C -MET-Aufnahme und der Expression des L-Typ-Aminosäuretransporters 1 (LAT1) besteht (Ocubo et al. 2010). Die Expression von LAT1 wiederum korrelierte mit der Prognose von am Multiplen Myelom erkrankten Patienten (Isoda et al. 2014). Diese Untersuchungen stützen die These, dass eine frühe Reduktion der ^{11}C -MET-Aufnahme mit der Prognose korreliert. In unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der LAT1-Expression und der Prognose gefunden werden (Lapa et al. 2016).

4.4 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ^{11}C -MET-Aufnahme unbehandelter und mit MLN9708 behandelter Myelomzellen signifikant höher war als die ^{18}F -FDG-Aufnahme.

Außerdem war die Differenz in der Traceraufnahme zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mit ^{11}C -MET im gesamten Untersuchungszeitraum größer als mit ^{18}F -FDG. Dies weist darauf hin, dass eine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mit ^{11}C -MET besser gelingt als mit ^{18}F -FDG.

Außerdem zeigten sich mit ^{11}C -MET zu früheren Zeitpunkten größere Differenzen in der Traceraufnahme zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Zwischen Traceraufnahme und biologischen Merkmalen der MM-Pathogenese ergaben sich für behandelte und unbehandelte Zellen variable Zusammenhänge.

Die diskutierten Ergebnisse legen in Zusammenschau mit der existierenden Literatur nahe, dass ^{11}C -MET besser zur Diagnostik und zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms geeignet ist als ^{18}F -FDG, sodass es durchaus möglich ist, dass ^{11}C -MET in Zukunft ^{18}F -FDG als Standardtracer ersetzen könnte.

Ob ^{11}C -MET auch besser zur Stadieneinteilung und zur Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet ist als ^{18}F -FDG, muss in weiteren Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die trotz großer Fortschritte in der Therapie immer noch eine schlechte Prognose hat.

Bisher ist es nicht möglich, mit einem bildgebenden Verfahren alle Fragen der Diagnostik, der Stadieneinteilung, des Therapiemonitorings und der Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms zu klären. Da es sich beim Multiplen Myelom aber um eine stark heterogene Erkrankung handelt, die eine frühzeitige individuelle Therapie erfordert, ist es unbedingt nötig Verfahren zu entwickeln, die eine spezifische Charakterisierung der Erkrankung bei jedem einzelnen Patienten ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die MM-Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2 mit dem Proteasominhibitor MLN9708 behandelt. Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mit dem Standardtracer 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose (¹⁸F-FDG) oder dem in der Anwendung beim Multiplen Myelom neuen Aminosäuretracer [¹¹C]-Methionin (¹¹C-MET) inkubiert und die Aufnahme der Tracer zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Des Weiteren wurde die Ausprägung biologischer Merkmale der MM-Pathogenese bei behandelten und unbehandelten Zellen untersucht. Anschließend wurde ermittelt, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Traceraufnahme und der Ausprägung biologischer Merkmale der MM-Pathogenese bei behandelten und unbehandelten Zellen besteht.

Hierdurch soll geklärt werden, ob ¹¹C-MET besser zur Diagnostik, dem Therapiemonitoring und der Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms geeignet ist als der Standardtracer ¹⁸F-FDG.

Es zeigte sich eine signifikant höhere ¹¹C-MET-Aufnahme sowohl unbehandelter als auch behandelter Zellen im Vergleich zu ¹⁸F-FDG. Außerdem war eine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mit ¹¹C-MET besser möglich als mit ¹⁸F-FDG. Zwischen Traceraufnahme und biologischen Merkmalen der MM-Pathogenese, wie Proliferation, Expression von intrazellulären Leichtketten, CXCR4 und CD138, ergaben sich für behandelte und unbehandelte Zellen variable Zusammenhänge.

Die Ergebnisse legen nahe, dass ¹¹C-MET besser zur Diagnostik und zum Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms geeignet ist als der Standardtracer ¹⁸F-FDG.

Ob ^{11}C -MET auch zur Stadieneinteilung und zur Evaluation der Prognose des Multiplen Myeloms besser geeignet ist als ^{18}F -FDG, muss in weiteren Studien untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Agarwal, A., Ghobrial, I. M. (2013). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clin Cancer Res* 19(5): 985-994.
- Alsayed, Y., Ngo, H., Runnels, J., Leleu, X., Singha, U. K., Pitsillides, C. M., Spencer, J. A., Kimlinger, T., Ghobrial, J. M., Jia, X. et al. (2007). Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 109(7): 2708-2717.
- Bagratuni, T., Wu, P., Gonzalez de Castro, D., Davenport, E. L., Dickens, N. J., Walker, B. A., Boyd, K., Johnson, D. C., Gregory, W., Morgan, G. J. et al. (2010). XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. *Blood* 116(2): 250-253.
- Barlogie, B., Mitchell, A., van Rhee, F., Epstein, J., Morgan, G. J., Crowley, J. (2014). Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 124(20): 3043-3051.
- Bartel, T. B., Haessler, J., Brown, T. L., Shaughnessy, J. D. Jr., van Rhee, F., Anaissie, E., Alpe, T., Angtuaco, E., Walker, R., Epstein, J. et al. (2009). F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 114(10): 2068-2076.
- Brocke-Heidrich, K., Kretzschmar, A. K., Pfeifer, G., Henze, C., Löffler, D., Koczan, D., Thiesen, H. J., Burger, R., Gramatzki, M., Horn, F. (2004). Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 103(1): 242-251.

- Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., Bernand, S., Baum, W., Duerr, B., Hocke, G. M., Steininger, H., Gebhart, E. et al. (2001). Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *Hematol J* 2(1): 42-53.
- Caldarella, C., Isgrò, M. A., Treglia, I., Treglia, G. (2012). Is fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography useful in monitoring the response to treatment in patients with multiple myeloma? *Int J Hematol* 96(6): 685-691.
- Carrasco, D.R., Sukhdeo, K., Protopopova, M., Sinha, R., Enos, M., Carrasco, D, E., Zheng, M., Mani, M., Henderson, J., Pinkus, G. S. et al. (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* 11(4): 349-360.
- Cascini, G. L., Cuccurullo, V., Tamburrini, O., Mansi, L., Rotondo, A. (2010). Nuclear medicine in multiple myeloma -- more than diagnosis. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 13(1): 32-38.
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., Richardson, P., Anderson, K. C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res* 17(16): 5311-5321.
- Chng, W. J., Dispenzieri, A, Chim, C. S., Fonseca, R., Goldschmidt, H., Lentzsch, S., Munshi, N., Palumbo, A., Miguel, J. S., Sonneveld, P. et al. (2014). IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 28(2): 269-277.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93(5): 1658-1667.
- Dankerl, A., Liebisch, P., Glatting, G., Friesen, C., Blumstein, N. M., Kocot, D., Wendl, C., Bunjes, D., Reske, S. N. (2007). Multiple Myeloma: Molecular Imaging with 11C-Methionine PET/CT--Initial Experience. *Radiology* 242(2): 498-508.

- Dimopoulos, M. A., Kastritis, E., Rosinol, L., Bladé, J., Ludwig, H. (2008). Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia* 22(8): 1485-1493.
- Dimopoulos, M., Terpos, E., Comenzo, R. L., Tosi, P., Beksac, M., Sezer, O., Siegel, D., Lokhorst, H., Kumar, S., Rajkumar, S. V. et al. (2009). International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 23(9): 1545-1556.
- Duncan, K., Rosean, T. R., Tompkins, V. S., Olivier, A., Sompallae, R., Zhan, F., Tricot, G., Acevedo, M. R., Ponto, L. L., Walsh, S. A. et al. (2013). (18)F-FDG-PET/CT imaging in an IL-6- and MYC-driven mouse model of human multiple myeloma affords objective evaluation of plasma cell tumor progression and therapeutic response to the proteasome inhibitor ixazomib. *Blood Cancer J* 3: e165.
- Durie, B. G. (2006). The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer* 42(11): 1539-1543.
- Durie, B. G., Salmon, S. E. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36(3): 842-854.
- Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A. et al. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23(15): 3412-3420.
- Harousseau, J. L., Moreau, P. (2009). Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 360(25): 2645-2654.

- Herndon, T. M., Deisseroth, A., Kaminskas, E., Kane, R. C., Koti, K. M., Rothmann, M. D., Habtemariam, B., Bullock, J., Bray, J. D., Hawes, J. et al. (2013). U.S. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 19(17): 4559-4563.
- Howlander N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, S. F., Kosary, C. L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z. et al. (2016). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/
- Kyle, R. A., Child, J. A.; Anderson, K., Barlogie, B., Bataille, R., Bensinger, W., Blade, J., Boccadoro, M., Dalton, W., Dimopoulos, M., et al. (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121(5): 749-757.
- Ishiwata, K., Vaalburg, W., Elsinga, P. H., Paans, A.M., Woldring, M. G. (1988). Comparison of L-[1-11C]methionine and L-methyl-[11C]methionine for measuring in vivo protein synthesis rates with PET. *J Nucl Med* 29(8): 1419-1427.
- Isoda, A., Kaira, K., Iwashina, M., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Oyama, T., Asao, T., Matsumoto, M. et al. (2014). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci* 105(11): 1496-1502.
- Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Glimcher, L. H. (2003). The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev* 194: 29-38.
- Jager, P. L., Vaalburg, W., Pruijm, J., de Vries, E. G., Langen, K. J., Piers, D.A. (2001). Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* 42(3): 432-445.

- Kalff, A., Spencer, A. (2012). The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J* 2: e89.
- Kastritis, E., Terpos, E., Moulopoulos, L., Spyropoulou-Vlachou, M., Kanellias, N., Eleftherakis-Papaiakovou, E., Gkotsamanidou, M., Migkou, M., Gavriatopoulou, M., Roussou, M. et al. (2013). Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia* 27(4): 947-953.
- Katz, B.Z. (2010). Adhesion molecules--The lifelines of multiple myeloma cells. *Semin Cancer Biol* 20(3): 186-195.
- Landgren, O., Linet, M. S., McMaster, M. L., Gridley, G., Hemminki, K., Goldin, L. R. (2006). Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 118(12): 3095-3098.
- Lapa, C., Knop, S., Schreder, M., Rudelius, M., Knott, M., Jörg, G., Samnick, S., Herrmann, K., Buck, A. K., Einsele, H. et al. (2016). ¹¹C-Methionine-PET in Multiple Myeloma: Correlation with Clinical Parameters and Bone Marrow Involvement. *Theranostics* 6(2): 254-261.
- Lapa, C., Lückerrath, K., Malzahn, U., Samnick, S., Einsele, H., Buck, A. K., Herrmann, K., Knop, S. (2014). ¹⁸F-FDG-PET/CT for prognostic stratification of patients with multiple myeloma relapse after stem cell transplantation. *Oncotarget* 5(17): 7381-7391.
- Ling, S. C., Lau, E. K., Al-Shabeeb, A., Nikolic, A., Catalano, A., Iland, H., Horvath, N., Ho, P. J., Harrison, S., Fleming, S. et al. (2012). Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* 97(1): 64-72.

- Lückerath, K., Lapa, C., Spahmann, A., Jörg, G., Samnick, S., Rosenwald, A., Einsele, H., Knop, S., Buck, A. K. (2013). Targeting paraprotein biosynthesis for non-invasive characterization of myeloma biology. *PLoS One* 8(12): e84840.
- Lückerath, K., Lapa, C., Albert, C., Herrmann, K., Jörg, G., Samnick, S., Einsele, H., Knop, S., Buck, A. K. (2015). ¹¹C-Methionine-PET: a novel and sensitive tool for monitoring of early response to treatment in multiple myeloma. *Oncotarget* 6(10): 8418-8429.
- Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Gouraud, W., Lodé, L., Decaux, O., Godmer, P., Garderet, L., Voillat, L., Facon, T., Stoppa, A. M. et al. (2013). Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 27(2): 473-481.
- Mahindra, A., Hideshima, T., Anderson, K. C. (2010). Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Rev* 24 Suppl 1: S5-11.
- Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orlowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A., Harousseau, J. L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120(5): 947-959.
- Morgan, G. J., Kaiser, M. F. (2012). How to use new biology to guide therapy in multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012: 342-349.
- Nakamoto, Y., Kurihara, K., Nishizawa, M., Yamashita, K., Nakatani, K., Kondo, T., Takaori-Kondo, A., Togashi, K. (2013). Clinical value of ¹¹C-methionine PET/CT in patients with plasma cell malignancy: comparison with ¹⁸F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40(5): 708-715.
- Nanni, C., Zamagni, E., Celli, M., Caroli, P., Ambrosini, V., Tacchetti, P., Brioli, A., Zannetti, B., Pezzi, A., Pantani, L. et al. (2013). The value of ¹⁸F-FDG PET/CT after autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients affected by multiple myeloma (MM): experience with 77 patients. *Clin Nucl Med* 38(2): e74-9.
- Nishizawa, M., Nakamoto, Y., Suga, T., Kitano, T., Ishikawa, T., Yamashita, K. (2010). ¹¹C-Methionine PET/CT for multiple myeloma. *Int J Hematol* 91(5): 733-734.

- Ocio, E.M., Richardson, P. G., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Mateos, M. V., Orlowski, R., Kumar, S., Usmani, S., Roodman, D., Niesvizky, R. et al. (2014). New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 28(3): 525-542.
- Okubo, S., Zhen, H. N., Kawai, N., Nishiyama, Y., Haba, R., Tamiya, T. (2010). Correlation of L-methyl-11C-methionine (MET) uptake with L-type amino acid transporter 1 in human gliomas. *J Neurooncol* 99(2): 217-225.
- Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., Anderson, K. C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet* 374(9686): 324-339.
- Rajkumar, S. V. (2005) MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 340-345.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastiris, E., Richardson, P. et al. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15(12): e538-548.
- Redic, K. (2013). Carfilzomib: a novel agent for multiple myeloma. *J Pharm Pharmacol* 65(8): 1095-1106.
- Regelink, J. C., Minnema, M. C., Terpos, E., Kamphuis, M. H., Raijmakers, P. G., Pieters-van den Bos, I. C., Heggelman, B. G., Nievelstein, R. J., Otten, R. H., van Lammeren-Venema, D. et al. (2013). Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. *Br J Haematol* 162(1): 50-61.

- Reijmers, R. M., Groen, R. W., Rozemuller, H., Kuil, A., de Haan-Kramer, A., Csikós, T., Martens, A. C., Spaargaren, M., Pals, S. T. (2010). Targeting EXT1 reveals a crucial role for heparan sulfate in the growth of multiple myeloma. *Blood* 115(3): 601-604.
- Roschewski, M., Korde, N., Wu, S. P., Landgren, O. (2013). Pursuing the curative blueprint for early myeloma. *Blood* 122(4): 486-490.
- Rubini, G., Niccoli-Asabella, A., Ferrari, C., Racanelli, V., Maggialetti, N., Dammacco, F. (2016). Myeloma bone and extra-medullary disease: Role of PET/CT and other whole-body imaging techniques. *Crit Rev Oncol Hematol* 101: 169-183.
- Shao, X., Hoareau, R., Runkle, A. C., Tluczek, L. J. M., Hockley, B. G., Henderson, B. D. and Scott, P. J. H. (2011). Highlighting the versatility of the Tracerlab synthesis modules. Part 2: fully automated production of [¹¹C]-labeled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FX C-Pro. *J Label Compd Radiopharm* 54(14): 819–838.
- Suzuki, K. (2013). Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol* 43(2): 116-124.
- Walker, R., Barlogie, B., Haessler, J., Tricot, G., Anaissie, E., Shaughnessy, J. D. Jr., Epstein, J., van Hemert, R., Erdem, E., Hoering, A. et al. (2007). Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *J Clin Oncol* 25(9): 1121-1128.
- Wallin, A., Larsson, S. C. (2011). Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer* 47(11): 1606-1615.
- Yu, S. (2006). Review of 18F-FDG synthesis and quality control. *Biomed Imaging Interv J.* 2(4): e57.
- Zamagni, E., Cavo, M. (2012). The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *Br J Haematol* 159(5): 499-513.

Zamagni, E., Tacchetti, P., Terragna, C., Cavo, M. (2016). Multiple myeloma: disease response assessment. *Expert Rev Hematol* 9(9): 831-837.

7 Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2.1	Vollständiges Reaktionsschema zur radiochemischen Präparation von 2-[¹⁸ F]-Fluoro-2-Desoxy- <i>D</i> -Glukose aus dem Precursor Mannosetriplat
Abbildung 2.2	Vollständiges Reaktionsschema zur radiochemischen Präparation von [¹¹ C]-Methionin aus dem Precursor <i>L</i> -Homocystein
Abbildung 3.1	Reduktion der Viabilität durch MLN9708
Abbildung 3.2	Aufnahme von ¹¹ C-MET vs. ¹⁸ F-FDG durch mit MLN9708 behandelte und unbehandelte Zellen
Abbildung 3.3	Reduktion der Proliferation durch MLN9708
Abbildung 3.4	Korrelation der Proliferation mit der Traceraufnahme
Abbildung 3.5	CXCR4-Expression an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien
Abbildung 3.6	Korrelation der Expression von CXCR4 mit der Traceraufnahme
Abbildung 3.7	CD138-Expression an der Zelloberfläche von MM-Zelllinien
Abbildung 3.8	Korrelation der Expression von CD138 mit der Traceraufnahme
Abbildung 3.9	Expression intrazellulärer Ig-Leichtketten in MM-Zellen
Abbildung 3.10	Korrelation der Ig-Leichtketten mit der Traceraufnahme
Abbildung 3.11	Auswirkung von MLN9708 auf die <i>xbp-1</i> -Expression
Tabelle 2.1	Programm zur Durchführung der qPCR am iCycler
Tabelle 3.1	Charakteristika der Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
FLC-Quotient	Quotient der freien Leichtketten
g	Gramm
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Stunde
HWZ	Halbwertszeit
IL-6	Interleukin-6
IPZ	Interdisziplinäres PET-Zentrum
l	Liter
LAT1	L-Typ-Aminosäuretransporter 1
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LDH	Laktatdehydrogenase
mg	Milligramm
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute
mind.	mindestens
Mio	Millionen
mM	millimolar

MM	Multiples Myelom
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PI	Propidiumiodid
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase- kettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMM	smoldering Myeloma
u.a.	unter anderem
UPR	ungefaltete Proteinantwort
vgl.	vergleiche
XBP-1	X-box binding protein 1
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
¹¹ C-MET	[¹¹ C]-Methionin
¹⁸ F-FDG	2-[¹⁸ F]-Fluoro-2-Desoxy-D-Glukose

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Buck für die Überlassung des Promotionsthemas, das anregende Feedback und die anhaltende Unterstützung,

meiner Betreuerin Frau Dr. Katharina Lücknerath für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und Förderung,

dem Team des Interdisziplinären PET-Zentrums, insbesondere Herrn Dr. Gerhard Jörg, für die Herstellung der Radiotracer,

Margarete Göbel (Institut für Virologie und Immunologie, Würzburg) für die Analyse der RNA-Qualität,

Helga Wagner (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Würzburg) für die praktische Vermittlung der qPCR-Methodik,

dem gesamten Team der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg für die gute Zusammenarbeit sowie

meinem Freund und meiner Familie für die tatkräftige und liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit.