

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Andreas Buck

**$^{11}\text{C}$ -MET und  $^{18}\text{F}$ -FDG: *In vitro* Vergleich zur Bildgebung beim  
Multiplen Myelom im Kontext biologischer Charakteristika**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dalma Brumberg, geb. Ichouh

aus Würzburg

Würzburg, August 2018

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Andreas Buck

Korreferent bzw. Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Martin Kortüm

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2019

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Multiple Myelom.....	1
1.2	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.3	Pathogenese .....	2
1.4	Diagnostische Kriterien und Stadieneinteilung .....	3
1.5	Prognose .....	5
1.6	Bildgebende Verfahren und deren Stellenwert.....	6
1.6.1	Röntgenaufnahme.....	6
1.6.2	Computertomographie.....	7
1.6.3	Magnetresonanztomographie .....	7
1.6.4	Positronenemissionstomographie.....	8
1.7	Therapie des Multiplen Myeloms.....	11
1.7.1	Proteasominhibitoren.....	11
1.8	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1	Materialien.....	14
2.1.1	Laborgeräte.....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3	Chemikalien.....	15
2.1.4	Antikörper .....	16
2.1.5	Zelllinien .....	16
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	16
2.1.6.1	Zellkultur .....	16
2.1.6.2	Dosis-Wirkungs-Beziehung.....	17
2.1.7	Radiotracer .....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Zellkultur .....	18
2.2.1.1	Einfrieren von Zelllinien.....	18
2.2.1.2	Auftauen von Zelllinien .....	18
2.2.1.3	(Sub-) Kultivierung der Zellen und Zellzahlbestimmung .....	18
2.2.2	Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven für Carfilzomib .....	19
2.2.3	Untersuchung und Quantifizierung zellbiologischer Parameter mittels Durchflusszytometrie .....	19

2.2.3.1	Untersuchung der Expression von CD138 (Syndecan-1) und CXCR4 (CD 184) an der Zelloberfläche .....	19
2.2.3.2	Untersuchung der Expression intrazellulärer Immunglobulin $\kappa$ und $\lambda$ Leichtketten .....	20
2.2.3.3	Analyse der Zellproliferation mittels Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester-Färbung .....	21
2.2.4	Tracer.....	21
2.2.4.1	Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]-2-Fluor-2-desoxy-D-glukose .....	21
2.2.4.2	Synthese von [ $^{11}\text{C}$ ]-L-Methyl-Methionin .....	21
2.2.5	Zelluläre Radiotraceraufnahme .....	21
2.2.6	Statistische Analyse.....	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
3.1	Biologie der verwendeten Myelomzelllinien .....	23
3.2	Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration .....	24
3.3	Radiotraceraufnahme zur Bildgebung des Multiplen Myeloms.....	25
3.3.1	$^{18}\text{F}$ -FDG versus $^{11}\text{C}$ -MET – Aufnahme bei unbehandelten Zellen .....	25
3.3.2	$^{18}\text{F}$ -FDG versus $^{11}\text{C}$ -MET – Aufnahme bei behandelten Zellen .....	27
3.4	Biologische Marker des Multiplen Myeloms und deren Beeinflussung durch Carfilzomib .....	28
3.4.1	Untersuchung der Zelloberflächenexpression von CD138 und CXCR4.....	28
3.4.2	Expression intrazellulärer Ig $\kappa$ und Ig $\lambda$ – Leichtketten .....	32
3.4.3	Proliferation der verwendeten Myelomzelllinien.....	33
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1	Diagnostische Überlegenheit von $^{11}\text{C}$ -MET im Vergleich zu $^{18}\text{F}$ -FDG .....	36
4.2	Therapieevaluierung mittels $^{11}\text{C}$ -MET .....	38
4.3	Einfluss von Charakteristika der Pathogenese des Multiplen Myeloms auf die Traceraufnahme im Kontext der Behandlung mit Carfilzomib.....	40
4.3.1	CD138 .....	40
4.3.2	CXCR4 .....	40
4.3.3	Immunglobuline .....	41
4.3.4	Proliferation.....	42
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>56</b>
8.1	Abkürzungen .....	56

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) gehört der Gruppe der lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen an. Es zeichnet sich durch eine große intratumorale Heterogenität aus und geht mit diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks einher. Bedingt wird dies durch einen Klon maligner transformierter Plasmazellen, welche unkontrolliert intaktes, jedoch nicht funktionelles, monoklonales Immunglobulin (M-Protein) produzieren (Palumbo & Anderson, 2011; Rajkumar et al., 2014). Das monoklonale Ig kann meist bestimmten Antikörperklassen (IgG - ca. 60% der Patienten, IgA - ca.25%, IgD, IgE und IgM - weniger als 2%) oder auch nur deren Leichtketten (Bence-Jones-Myelom – ca.15%) zugeordnet werden; dagegen ist das asekretorische MM selten (ca. 1%) (Magrangeas et al., 2003; Middela & Kanse, 2009). Unabhängig davon wird das M-Protein nach den jeweils produzierten Leichtketten in Subtypen unterteilt: entsprechend der Verteilung in normalen Plasmazellen sind diese bei zwei Drittel kappa ( $\kappa$ ) – produzierend, während die Plasmazellen bei ein Drittel der Patienten lambda ( $\lambda$ ) – Ketten exprimiert (Magrangeas et al., 2003).

## 1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer weltweiten Inzidenz von 6-7 pro 100.000 jährlich gehört das MM zu den häufigsten Tumoren von Knochenmark und Knochen. Es bildet 1% aller malignen Erkrankungen und 10-15% der hämatoonkologischen Krankheitsentitäten (Gerecke et al., 2016; Phekoo et al., 2004). Männer und Afroamerikaner sind insgesamt häufiger betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Männern 71 Jahre und bei Frauen 74 Jahre beträgt. Eine Erstdiagnose unter 45 Jahren ist selten (Rajkumar & Kumar, 2016). Die Ätiologie des MM ist nach wie vor weitestgehend unbekannt. Zu den angenommenen Risikofaktoren zählen einerseits autoimmune, infektiöse und entzündliche Fehlsteuerungen, zum anderen wird ein Zusammenhang zwischen Krankheitsentstehung und erhöhter Exposition mit ionisierenden Strahlen, Pestiziden und organischen Lösungsmitteln vermutet (Brown et al., 2008; Kyle & Rajkumar, 2007).

### 1.3 Pathogenese

Das MM ist eine genetisch komplexe Erkrankung, die sich durch einen mehrschrittigen Entwicklungsprozess auszeichnet und entsprechend verschiedene klinische Phasen durchläuft, deren Unterscheidung durch die Bewertung von biologischen Parametern erfolgt (Prideaux et al., 2014). Das früheste Stadium ist die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Diese präsentiert sich vorwiegend klinisch inapparent und wird häufig im Rahmen eines Zufallsbefundes detektiert. Definiert wird die MGUS durch eine klonale Plasmazellproliferation von <10% und einem M-Protein-Level von <30g/l bei fehlenden Endorganschäden oder Symptomen (International Myeloma Working Group, 2003). In der Allgemeinbevölkerung liegt die Prävalenz bei Personen im Alter von über 50 Jahren bei 3-5% (Gerecke et al., 2016; Kyle et al., 2006). Dabei besteht ein lebenslanges Risiko zur Entwicklung eines manifesten MM. Es weisen, bei fehlender Diagnostik durch fehlende klinische Merkmale, jedoch lediglich 10% der neu diagnostizierten Fälle mit MM in ihrer Vorgeschichte eine dokumentierte MGUS auf. Dennoch wird angenommen, dass das MM nahezu immer aus der prämaligen Stufe hervorgeht (Landgren et al., 2009; Rajkumar & Kumar, 2016; Weiss et al., 2009). Um dies zeitgerecht zu detektieren und eine Therapie einzuleiten sind regelmäßige Kontrollen erforderlich. Einige Risikofaktoren lassen darauf schließen, dass eine schnelle Progression vorliegen könnte. Hierunter zählen Größe und Typ des M-Proteins, Anzahl der Plasmazellinfiltration im Knochenmark und der Anteil an freien Leichtketten (Kyle et al., 2010; Perez-Persona et al., 2007; Turesson et al., 2014).

Ein Stadium zwischen MGUS und MM stellt das Asymptomatische Multiple Myelom ('Smoldering Multiple Myeloma', SMM) dar. Auch hier besteht eine asymptomatische Form der Plasmazellfehlsteuerung, die durch eine höhere intramedulläre Tumorausdehnung (klonale Plasmazellen  $\geq 10\%$ ) und/oder einem höheren Serum-M-Protein ( $\geq 30$  g/l) definiert ist (Prideaux et al., 2014). Neben den für die Diagnostik relevanten laborchemischen Unterschieden zwischen MGUS und SMM ist die Entwicklung zum klinisch aktiven MM ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Formen: während das Risiko der Entwicklung zum aktiven MM bei der MGUS bei etwa 1% pro Jahr liegt, findet man beim SMM, zumindest in den ersten 5 Jahren, eine Wahrscheinlichkeit von 10% pro Jahr (Kyle et al., 2007; Rajkumar & Kumar, 2016). Die Diagnose eines SMM erfordert die schwierige Unterscheidung zwischen stabilem

Zustand und schnellem Fortschreiten zum klinisch apparenten Erscheinungsbild der Erkrankung, wobei bislang ein pathologisches oder molekulares Merkmal zur Differenzierung fehlt (Rajkumar et al., 2012).

Das klinisch apparente MM ist Folge des verdrängenden Wachstums der aberranten Immunglobuline und der Interaktion zwischen Myelomzellen, Knochenmark und Mediatoren (Kuehl & Bergsagel, 2012). Ausgangspunkt ist vor allem die intramedulläre Proliferation, welche im Verlauf die Hämatopoese verdrängt, angrenzende Knochen infiltriert und in Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen resultiert. Die Sekretion des M-Proteins ins Blut und die Ausscheidung über den Urin kann den Befall multipler Organe verursachen und führt damit zur extramedullären Manifestation des MM, welche jedoch nur bei 6-7,5% der Fälle auftritt und in Relation zum rein intramedullären MM mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Bartel et al., 2009; Kyle et al., 2003; Prideaux et al., 2014; Weinstock et al., 2015). Auf dieser Ursache basierend zeigen sich erste klinische Symptome meist in Form von Müdigkeit, Knochenschmerzen, rezidivierenden Infektionen, neurologischen und renalen Defiziten bis hin zur Erfüllung der CRAB-Kriterien (siehe Abschnitt *1.4 Diagnostische Kriterien und Stadieneinteilung*) (Landgren et al., 2006).

Neben MGUS, SMM und MM stellt unter anderem das solitäre Plasmozytom eine weitere Unterform der Plasmazellerkrankungen dar. Dieses zeichnet sich durch eine solitäre Läsion mit nachweisbaren klonalen Plasmazellen im Knochen oder Weichteilgewebe ohne Beteiligung des Knochenmarks und ohne Nachweis von symptomatischen Endorganschäden im Sinne der CRAB-Kriterien aus (Rajkumar, 2016b).

#### 1.4 Diagnostische Kriterien und Stadieneinteilung

Die diagnostischen Kriterien für MGUS und SMM sind in Abschnitt *1.3* näher geschildert. Beim MM galt jahrzehntelang der Nachweis von Endorganschäden, als Manifestation der klonalen Expansion der entarteten Plasmazellen, als Voraussetzung für die Diagnosestellung. Diese wurden als sogenannte CRAB-Kriterien mit Hyperkalzämie (engl. = hypercalcemia, C), renaler Dysfunktion (engl. = renal insufficiency, R), Anämie (engl. = anemia, A) und Osteolysen (engl. = bone lesions, B) zusammengefasst (Rajkumar et al., 2014). Im Rahmen fehlender oder nebenwirkungsreicher Therapien wurde die Empfehlung zur Therapie erst bei Erfüllung einer dieser Kriterien ausgesprochen.

Klassisch erfolgt die Stadieneinteilung des MM nach Durie und Salmon und dem International Staging System (ISS). Die seit 1975 etablierte Stadieneinteilung nach Durie und Salmon steht mit der geschätzten Tumormasse in Beziehung und erfolgt in 3 Stadien, wobei sowohl Therapieplanung als auch Prognose daraus abgeleitet werden. Maßgebend für die Einteilung sind M-Protein-Level, Anzahl der Osteolysen, Hämoglobinwerte, Serumkalziumwerte sowie der Kreatininwert als Maß für die Nierenfunktion (Durie & Salmon, 1975). Die Durie/Salmon PLUS Klassifikation stellt eine Weiterentwicklung der Einteilung nach Durie/Salmon dar, welche zusätzlich bildgebende Parameter aus Magnetresonanztomographie (MRT), Ganzkörper-Positronenemissionstomographie (PET) mit [<sup>18</sup>F]-Fluordesoxy-Glukose (FDG) und Ganzkörper-Computertomographie (CT) mit einschließt (Durie, 2006). 2014 erfolgte die Überarbeitung der Diagnosekriterien des MM durch die International Myeloma Working Group (IMWG) (Rajkumar et al., 2014). Zu den Entwicklungen die dazu beigetragen haben gehören die Etablierung breiterer und nebenwirkungsärmerer therapeutischer Möglichkeiten, die unter anderem zu einer Verdopplung der Überlebenszeit geführt haben, sowie neue spezifische Biomarker, die eine exaktere Differenzierung zwischen therapiebedürftigen und zu beobachtenden Vorläuferstadien erlauben (Kumar et al., 2014). Hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit, asymptomatische Patienten mit erhöhtem Progressionsrisiko zu detektieren und schneller und effektiver mit möglichen Therapieansätzen zu beginnen (Dispenzieri et al., 2013; Rajkumar et al., 2012). Besonders Patienten mit Hochrisiko-SMM zeigten einen deutlichen Überlebensvorteil bei frühzeitigem Therapiebeginn (Rajkumar, 2016b; Rajkumar et al., 2014). Nicht zuletzt trugen auch die verbesserten Bildgebungsmodalitäten, als eine Form der genannten Biomarker, zu dieser Entwicklung bei. Folgende Kriterien wurden durch die IMWG zur Sicherung der Diagnose festgelegt (Rajkumar et al., 2014):

Klonale Plasmazellen im Knochenmark  $\geq 10\%$  oder histologische Sicherung eines ossären oder extramedullären Plasmozytoms

und

Nachweis eines oder mehrerer der folgenden myelomdefinierenden Ereignisse:

- (i.) Nachweis von Endorganschäden durch überschießende Plasmazellproliferation:

- Hyperkalzämie: Serum-Kalzium  $>2,75$  mmol/l
  - Renale Insuffizienz: Serum-Kreatinin  $>2$  mg/dl
  - Anämie: Hämoglobinwert  $<10$  g/dl
  - Knochenläsionen:  $\geq 1$  osteolytische Läsion im konventionellen Röntgen/  
CT/  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT
- (ii.) Klonale Plasmazellen im Knochenmark  $\geq 60\%$
  - (iii.) Freie Leichtketten  $\geq 100$  mg/dl
  - (iiii.)  $>1$  fokale Läsion in der MRT (Mindestgröße 5 mm)

Eine weitere Klassifikation zur besseren Abschätzung der Prognose stellt das 2005 durch die International Myeloma Working Group (IMWG) publizierte International Staging System (ISS) dar, welches Patienten mit MM durch Bestimmung des Serumalbumins und des  $\beta_2$ -Mikroglobulins im Serum in 3 prognostische Subgruppen einteilt, während bildgebende Verfahren keine Rolle spielen (Greipp et al., 2005). 2015 erschien eine überarbeitete Version des ISS (Revised International Staging System, R-ISS). Dieses beruht auf der Integration von ISS-Prognosefaktoren und erhöhter Serumlaktatdehydrogenase oder dem Vorhandensein von chromosomalen Aberrationen in der zytogenetischen Analyse (Palumbo et al., 2015).

## 1.5 Prognose

Nach wie vor gilt die Diagnose des MM als infauste Prognose. Trotz der stetigen und rasanten Entwicklung der Therapie- und Diagnostikmöglichkeiten im Verlauf des vergangenen Jahrzehntes liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit MM unter 75 Jahren derzeit bei circa 45% und das mediane Überleben bei 5-7 Jahren (Gerecke et al., 2016; Mikhael et al., 2013; Rajkumar & Kumar, 2016). Gründe hierfür liegen unter anderem in der Komplexität und der intratumoralen genetischen sowie der intertumoralen Heterogenität der Erkrankung (Kuehl & Bergsagel, 2012). Um diese zu erfassen, die schnelle Entwicklung von Medikamentenresistenzen nachzuvollziehen und Risiko sowie die bislang nach wie vor sehr variable Prognose zu evaluieren, ist eine Vielzahl klinischer und biologischer Marker notwendig (Snozek et al., 2008; Stewart et al., 2007). Hierzu zählen neben der Therapiewahl unter anderem die Tumorbiologie (Immunphänotyp, Zytogenetik), Tumorlast und bildgebende Faktoren. Die Notwendigkeit der Bestimmung

dieser Biomarker zur individuellen Myelomcharakterisierung scheint wesentlich um unter anderem Beginn, Effizienz und Toxizität der Therapie abzuwägen (Mikhael et al., 2013; Rajkumar, 2016a).

## 1.6 Bildgebende Verfahren und deren Stellenwert

Bildgebende Verfahren spielen eine Rolle bei der Diagnosestellung des MM, der Tumorstadieneinteilung, der Identifikation von Komplikationen, der Therapieentscheidung und der Beurteilung des Therapieansprechens. Sie dienen der Darstellung der beim Multiplen Myelom charakteristischen ossären und extraossären Beteiligung (Dutoit et al., 2013; Healy et al., 2011).

Zehn Prozent der Myelompatienten weisen bei Diagnosestellung eine diffuse Osteopenie oder Osteoporose auf, bis zu 90% entwickeln im Verlauf der Erkrankung Osteolysen (Dimopoulos et al., 2009). Diese lassen sich mit planaren Röntgenaufnahmen, CT, MRT und <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT erfassen (Terpos et al., 2011).

### 1.6.1 Röntgenaufnahme

Die, weiterhin als Standard geltende, vergleichsweise kostengünstige Ganzkörper-Röntgenaufnahme zeigt, trotz der Vorteile der breiten Verfügbarkeit und der besseren Detektion kortikaler Knochenläsionen, Einschränkungen sowohl in der Sensitivität als auch der Spezifität. So ist der Nachweis von Osteolysen erst ab einer Destruktion der trabekulären Struktur von etwa 30-50% möglich. Zudem ist eine Abgrenzung zwischen osteoporotischen und osteopenen Knochenläsionen und myelomatösen Veränderungen nicht möglich (Edelstyn et al., 1967; Healy et al., 2011). Ein weiterer bedeutender Limitationsfaktor bei der Verwendung stellt die fehlende Beurteilungsmöglichkeit des Therapieansprechens dar, da bestehende Osteolysen persistieren (Mihailovic & Goldsmith, 2015; Vij et al., 2016).

### 1.6.2 Computertomographie

Als bessere Alternative zur planaren Röntgenaufnahme bietet die Ganzkörper-CT eine höhere diagnostische Sensitivität zur Detektion auch kleinster osteolytischer Prozesse sowie extraossärer Läsionen (Healy et al., 2011). Weiterhin ermöglicht sie beim MM die Detektion von diffuser Osteopenie, Frakturen und seltener Osteosklerose (Mahnken et

al., 2002). Besonders Wirbelsäule, Becken und Brustkorb, die durch das konventionelle Röntgen nur unzureichend erfasst werden, sind in der CT-Aufnahme umfassender beurteilbar. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist die Möglichkeit der kompletten diagnostischen Bewertung in einer Aufnahme. Zudem bietet sich die Möglichkeit CT-gesteuerter Punktionen und Biopsien, unter anderem von Wirbelsäule und Becken. Jedoch besteht, wie auch bei der planaren Röntgenaufnahme, der Nachteil, dass die CT lediglich eine morphologische Beurteilung ermöglicht. Sie erlaubt weder eine Bewertung der Myelomaktivität im Krankheitsverlauf noch eine Bewertung des Therapieansprechens im Falle von persistierenden Osteolysen. Zudem liegt, selbst bei Verwendung von Niedrigdosis-Protokollen, eine deutlich höhere Strahlenbelastung im Vergleich zur konventionellen Röntgenaufnahme vor (1,3-3 - fach erhöht) (Dimopoulos et al., 2009; Healy et al., 2011).

### 1.6.3 Magnetresonanztomographie

Die MRT wird durch die IMWG als Teil der überarbeiteten Diagnosekriterien des Durie/Salmon PLUS Staging Systems zur initialen Beurteilung der Krankheitsaktivität des MM vor allem beim Plasmozytom des Knochens sowie bei Verdacht auf SMM und asymptomatischem MM empfohlen (Dimopoulos et al., 2009). Sie liefert, ohne Strahlenbelastung, Informationen zur Tumorlast und zum Ausmaß der Plasmazellinfiltration im Knochenmark sowie im Weichteilgewebe (Mesguich et al., 2014). Vorteil ist vor allem eine hohe Detektionsrate von fokalen und diffusen Läsionen, die im Vergleich zu konventionellen Röntgenbildern um bis zu 80% höher ist (Mesguich et al., 2014; Regelink et al., 2013). Die MRT spielt eine wichtige Rolle bei der Abklärung neurologischer Symptome und Rückenschmerzen, da sie eine sensitive Methode zur Detektion von paravertebralen und intraspinalen Weichteilmanifestationen und Rückenmarkskompressionen darstellt (Vij et al., 2016). Einen hohen Stellenwert erhält die MRT weiterhin durch die Möglichkeit prognostische Aussagen zu erlauben, da Anzahl und Muster der detektierten Läsionen stark mit Behandlungserfolg und Gesamtüberleben korrelieren. Dennoch ist der Einsatz zur direkten Verlaufskontrolle limitiert, da das entsprechende bildgebundene Korrelat mit einer Zeitdifferenz von bis zu 9-12 Monaten verzögert auftreten kann (Durie, 2006).

Die Entwicklung neuer funktioneller MRT-Sequenzen ermöglicht die Verwendung der MRT als prognostischen bildgebenden Biomarker. Hierzu zählen unter anderem die kontrastverstärkte, die dynamische kontrastverstärkte sowie die diffusionsgewichtete MRT. Mittels eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels können Aussagen über die Signalintensität, über lokale Perfusion, relatives Blutvolumen, kapilläre Oberflächenaustauschfläche, Gefäßpermeabilität und systemische Eliminierung gemacht werden (Healy et al., 2011). Dabei ist unter anderem eine erhöhte Knochenangiogenese mit dem Übergang eines prämaligen Stadiums in ein aktives MM assoziiert (Vij et al., 2016). Die diffusionsgewichtete Bildgebung analysiert die Bewegungsfreiheit von interstitiellen Wassermolekülen und ermöglicht damit die nichtinvasive Quantifizierung veränderter Diffusion, Volumen und Flusspermeabilität in Gefäßen. Es wurde nachgewiesen, dass die Diffusion in Tumoren beeinträchtigt ist - somit könnte eine Abnahme der Diffusion möglicherweise auf eine Krankheitsprogression hinweisen (Herneth et al., 2005; Vij et al., 2016).

Im direkten Vergleich von MRT und  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT zeigt sich die MRT in Hinblick auf die Detektion diffuser Knochenmarksinfiltrationen überlegen. Diese wiederum hat die schlechteste Prognose bei der Beurteilung des Behandlungserfolges bei konventioneller Chemotherapie (Messiou & Kaiser, 2015; Zamagni et al., 2007). Während die MRT in Bezug auf den Langzeit-Behandlungserfolg wegweisender erscheint, eignet sich die  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT besser für die Bewertung des direkten Behandlungsanprechens (Walker et al., 2004). Weitere Einschränkungen der MRT ergeben sich durch den hohen Kostenfaktor, die lange Aufnahmedauer sowie die fehlende flächendeckende Verfügbarkeit (Dimopoulos et al., 2009; Nanni et al., 2006).

#### 1.6.4 Positronenemissionstomographie

Die PET ist ein nuklearmedizinisches Bildgebungsverfahren, welches mittels Injektion von Radiopharmazeutika eine tomographische Darstellung (patho-) physiologischer Prozesse ermöglicht. Gegenwärtig wird die PET unter Verwendung sogenannter „Hybridgeräte“ meist in Kombination mit einer CT angewendet.

Das mit dem Positronen-emittierenden Radionuklid [ $^{18}\text{F}$ ] markierte Glukoseanalogon 2-Fluor-2-deoxy-D-Glukose ist dabei der am häufigsten verwendete Radiotracer bei onkologischen Fragestellungen (Juweid & Cheson, 2006). Zellen vieler unterschiedlicher

Tumorentitäten können durch ihre erhöhte metabolische Aktivität und der daraus resultierenden hohen Glukoseaufnahme dargestellt werden (Healy et al., 2011; Lutje et al., 2009; Warburg, 1925). Die zelluläre Aufnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG verläuft analog zur normalen Glukose in Tumoren und normalem Hirngewebe vor allem über den GLUT-1-Transporter. Anschließend wird diese intrazellulär phosphoryliert und kann nicht in den weiteren Schritten der Glykolyse verstoffwechselt werden (Mihailovic & Goldsmith, 2015). Aufgrund der äußerst geringen Dephosphorylierung von  $^{18}\text{F}$ -FDG kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation des Moleküls. Durch den radioaktiven Zerfall des gekoppelten  $^{18}\text{F}$  kann der Radioligand mittels PET lokalisiert und durch Erstellung eines Schnittbildes dreidimensional visualisiert werden. Das Ausmaß der Traceraufnahme wird durch ein semiquantitatives Maß, dem standardisierten Aufnahmewert (standardized uptake value, SUV), bemessen (Juweid & Cheson, 2006).

$^{18}\text{F}$ -FDG ist auch für die Darstellung von Myelommanifestationen der aktuell etablierte Radiotracer. Die kombinierte molekulare und morphologische Bildgebung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT bietet die Möglichkeit zur Diagnosestellung, zum Staging, zur Therapieevaluation und zur Prognosestellung (Vij et al., 2016). Im Vergleich zur MRT, CT oder zum konventionellem Röntgen bietet sie die Möglichkeit sowohl medulläre als auch extramedulläre Läsionen gleichzeitig zu beurteilen (Bredella et al., 2005). Während die Hauptlimitation der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT die geringe Sensitivität bei der Detektion von diffusem Knochenmarksbefall ist, zeigt sie eine Sensitivität von 78-96% bei der Darstellung extramedullärer Tumormanifestationen (Mesguich et al., 2014).

Therapieentscheidend beim MM ist unter anderem die Unterscheidung zwischen der aktiven Form und den Vorläuferstadien. In der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT bedingen die Vorläuferstadien MGUS und (low-level) SMM größtenteils keine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme, während sich bei der aktiven Form fokale und diffuse Manifestationen häufig  $^{18}\text{F}$ -FDG-positiv darstellen (Durie, 2006; Lütje et al., 2009). Zudem konnte der prognostische Wert für das Gesamtüberleben, abhängig von der Anzahl  $^{18}\text{F}$ -FDG-avidere fokaler Läsionen sowie der Präsenz extramedullärer Manifestationen vor, während und nach einer Therapie, nachgewiesen werden (Bartel et al., 2009; Lapa et al., 2014; Regelink et al., 2013). Anhand der posttherapeutischen Entwicklung von fokalen und diffusen Läsionen lässt sich weiterhin die Effektivität einer Behandlung nach Therapiebeginn evaluieren

und ermöglicht damit ein individualisiertes Therapiekonzept. Gleichzeitig korreliert eine anhaltende  $^{18}\text{F}$ -FDG-Positivität mit einem frühen Rezidivrisiko nach Hochdosistherapie oder Stammzelltransplantation (Durie, 2006; Healy et al., 2011).

Nachteile der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT ergeben sich aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität des  $^{18}\text{F}$ -FDG durch mangelhafte Differenzierung zwischen benignen und Myelomläsionen. Unter anderem durch eine Hypoproliferation eines Teils der Myelomzellen und der inkonstanten Überexpression von Glukosetransportern kann es zu einer verminderten Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG und damit zu falsch negativen Befunden kommen (Vij et al., 2016). Zusätzlich besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Befunden, zum Beispiel durch entzündlich-reaktive Veränderungen oder im Rahmen einer Chemo- oder Strahlentherapie. Die Anwendung des Radiotracers beim MM wird somit limitiert (Juweid & Cheson, 2006).

Dies wiederum betont die Notwendigkeit zur Evaluation etablierter Radiotracer bzw. der Entwicklung neuer Radiotracer für den klinischen Einsatz beim MM. Durch die hohen Proteinsyntheseraten der Myelomzellen sind in den letzten Jahren verstärkt aminosäurebasierte Tracer in den Fokus gerückt (Caers et al., 2014; Luckerath et al., 2015; Vij et al., 2016). Ein solcher Radiotracer ist [ $^{11}\text{C}$ ]-L-Methyl-Methionin ( $^{11}\text{C}$ -MET), der für die Differentialdiagnostik von Hirntumoren sowie für das Therapiemonitoring bei Gliomen verwendet werden kann (Sharma et al., 2016). Die Radiotraceraufnahme wird durch einen Aminosäuretransporter ermöglicht. In Hirntumoren besteht häufig eine verstärkte Expression der L-Aminosäuretransporter, woraus eine erhöhte Aufnahme nach intrazellulär resultiert (Okubo et al., 2010). Bedingt durch die Notwendigkeit einer Zelle (essentielle) Aminosäuren aufzunehmen und durch die erhöhte Produktion von monoklonalem Immunglobulin in MM-Zellen, könnte die radioaktiv markierte Aminosäure  $^{11}\text{C}$ -MET besonders gut für die MM-Bildgebung geeignet sein (Nakamoto, 2014).

## 1.7 Therapie des Multiplen Myeloms

Die Indikation zur systemischen Therapie bei Patienten mit klonaler Plasmazellerkrankung wird bei Diagnose manifester oder drohender Endorganschäden, im Sinne der CRAB-Kriterien, gestellt. Zusätzlich werden folgende Konstellationen für eine mögliche Indikation zur Behandlung angesehen (Mikhael et al., 2013): (i) ein

asymptomatisches MM oder Hochrisiko-SMM mit einer Knochenmarksplasmozytose >60%, (ii) ein deutlich erhöhtes freies Serumleichtkettenverhältnis > 100 oder (iii) eine frühe Knochenmanifestation oder extramedulläre Beteiligung in der <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT oder MRT.

Die initiale Therapiewahl ist individuell abhängig von vielerlei Kofaktoren und stellt eine Herausforderung dar (Mikhael et al., 2013). Der Therapiestandard bei jungen Patienten mit behandlungsbedürftigem MM folgt vereinfacht dem Schema: Induktionstherapie, Melphalan-basierte Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation sowie eine anschließende Erhaltungstherapie (Gerecke et al., 2016; Röllig et al., 2015). Hierbei kommt eine Vielzahl von Medikamenten zum Einsatz: Kortikosteroide, Alkylanzien und Anthrazykline werden zunehmend durch neue Substanzen und deren Kombination ergänzt und erweitert. Hierzu zählen, neben dem etablierten Proteasominhibitor Bortezomib (Bz), neue Proteasominhibitoren wie Carfilzomib (Cz) und Ixazomib sowie immunmodulatorische Medikamente, monoklonale Antikörper und Deacetylasehemmer (Moreau et al., 2016). Das Ziel der Therapie besteht darin, eine möglichst lange Remissionsdauer zu erzielen (Rajkumar, 2016b).

### 1.7.1 Proteasominhibitoren

Das Proteasom ist ein intrazellulärer Enzymkomplex, der zelleigene Proteine in Form von Enzymen, Transkriptionsfaktoren und fehlgefalteten Proteinen sowie zellfremde Proteine abbaut und dadurch die zelluläre Homöostase aufrechterhält. Die Hemmung von Proteasomen führt zu einer Akkumulation dieser Proteine, induziert einen Zusammenbruch des Stoffwechsels und führt damit zur Apoptose der Zelle (Demo et al., 2007). Die Wirkweise der Proteasominhibitoren stellt ein multifaktorielles, noch nicht vollständig erfasstes, Geschehen mit verstärkter Wirkung auf proliferierende Zellen des Organismus dar. Hierdurch kann das Ansprechen entarteter Zellen auf diese Substanzklasse erklärt werden (Kisselev & Goldberg, 2001; Ruschak et al., 2011). Während Proteasome am Abbau vieler für die Tumorentstehung maßgeblicher Proteine beteiligt sind, die wachstumshemmende und apoptotische Signale herunterregulieren, greifen Proteasominhibitoren wiederum in diese Kaskade ein und verschieben hierdurch das Zellgleichgewicht zugunsten der Apoptose (Kisselev & Goldberg, 2001).

Seit 2013 zählt der reversible Proteasominhibitor Bz unter anderem in Kombination mit Dexamethason zur Erstlinientherapie der Induktionstherapie. Weiterhin ist er, je nach Therapieprotokoll, Teil der Erhaltungstherapie (Engelhardt et al., 2014). Zuvor wurde Bz in der Behandlung des therapierefraktären MM bzw. bei Entwicklung eines Rezidivs eingesetzt (Gerecke et al., 2016). Dieser zeigt jedoch Limitationen im Nebenwirkungsprofil und durch aufkommende Resistenzen (Richardson et al., 2003; Ruschak et al., 2011). Zur zweiten Generation gehört unter anderem der epoxyketonbasierte Proteasominhibitor Cz. Dieser bindet, selektiv und irreversibel, an die  $\beta 5$ -Einheit des 20S-Proteasoms (Herndon et al., 2013; Steele, 2013). Diese irreversible Hemmung des Proteasoms erklärt die nachhaltigere Wirkung von Cz im Vergleich zur reversiblen Proteasomhemmung (Ruschak et al., 2011). Des Weiteren zeigen sich Vorteile im Nebenwirkungsspektrum und in der Anwendung bei primär und sekundär Bz-resistenten MM-Zellen (Ruschak et al., 2011). Zugelassen ist die Anwendung von Cz für Patienten deren Erkrankung unter mindestens zwei vorangehenden Therapien refraktär war (Ocio et al., 2014). Unter dem Handelsnamen Kyprolis<sup>®</sup> erfolgte 2015 die Erstzulassung in der Kombinationsbehandlung mit Lenalidomid und Dexamethason in Europa (Gerecke et al., 2016).

## 1.8 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Wahl des Bildgebungsverfahrens beim MM sollte mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität die Beurteilung des initialen Status der Erkrankung bis hin zur Bemessung des Therapieerfolges ermöglichen. Aufgrund der breiten intra- und interindividuellen Heterogenität der Erkrankung stellt dies eine große Herausforderung dar. Trotz zahlreicher Vorteile gegenüber anderen etablierten bildgebenden Verfahren zeigt die <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT Limitationen: da die MM-Zellen zum Teil hypoproliferativ sind oder keine konstante Überexpression von Glukose-1-Transportern aufweisen, wie es vielfach bei malignen Tumoren vorkommt, zeigt sich eine verminderte Akkumulation des phosphorylierten <sup>18</sup>F-FDG (Plathow & Weber, 2008; Vij et al., 2016). Weiterhin ist (A) in einigen Fällen eine Differentialdiagnostik zwischen nicht malignem Krankheitsgeschehen und gering metabolisierenden MM-Läsionen nicht möglich (Vij et al., 2016) und (B) bleiben mehr als ein Drittel der intramedullären MM-Läsionen unentdeckt, vor allem im Rahmen diffuser Knochenmarksinfiltration (Mesguich et al.,

2014; Terpos et al., 2011). Aufgrund dieser Einschränkungen besteht die Notwendigkeit zur Entwicklung einer myelomspezifischen diagnostischen und therapiebewertenden Bildgebung um das Ziel des personalisierten Patientenmanagements zu erreichen.

Diese Arbeit untersucht, ob der aminosäurebasierte PET-Tracer  $^{11}\text{C}$ -MET durch seine biologischen Eigenschaften auf zellulärer Ebene zur Diagnostik des MM besser geeignet ist als das etablierte  $^{18}\text{F}$ -FDG. Insbesondere sollen spezifische Anforderungen an die Radiotracer in unterschiedlichen Zellreihen des MM geprüft werden:

(A) Speicherkapazitätsverhalten vor und nach Therapie mit einem Proteasominhibitor,  
(B) Differenzierung und Darstellung der Tumorerogenität sowie der Subtypen des MM.

Folgende Fragen sollen dabei beantwortet werden:

Ist  $^{11}\text{C}$ -MET dem  $^{18}\text{F}$ -FDG bei Behandlung mit dem Proteasominhibitor Cz in der prä- und posttherapeutischen Bewertung überlegen?

Ist  $^{11}\text{C}$ -MET besser als  $^{18}\text{F}$ -FDG geeignet zwischen den Subtypen des MM zu differenzieren?

Kann aufgrund der Tumorbiologie die Überlegenheit eines Tracers postuliert werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät/Modell	Hersteller
Sterilbank / Laminar-Airflow-Kabine HERA Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlschrank, Öko Super glass line	LIEBHERR International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank HERA Safe, freeze kendro laboratory products, -86 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 2.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Autoklav, MELA 6, Autoklav 23	MELAG Medizintechnik, Berlin
Wasserbad	Memmert GmbH + CO KG, Schwabach
Thermostatschrank	Aqua® Lytic , Dortmund
Brutschrank, HERA cell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine	Genheimer GmbH, Hettstadt
Mikroskop, AXIO ZEISS, Vert. A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen,
Vakuumpumpe	VWR, Darmstadt
Pipettierhelfer, Accu- jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie	Bender & HOBEIN AG Zürich, Schweiz
Mechanischer Zellzähler	VWR International GmbH, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co, Lauda- Königshofen
Stoppuhr	TFA, Dostmann GmbH + Co. KG, Wertheim- Reicholzheim
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg

Gammastrahlungszähler

1480 WIZARD™3', Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, Rodgau

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Serologische Pipetten	Cell Star, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Korea
Pasteurpipetten	BRAND, Wertheim
Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Sarstadt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstadt, Nümbrecht
96-well-Platten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

### 2.1.3 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GlutaMAX™, L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin und Streptomycin (10000U/ml; 100X)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Interleukin-6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Trypanblau, 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ethanol, 97%	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
Carfilzomib	Selleckchem, International Clinical Service GmbH, München
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-hIg kappa Light Chain APC, Klon IS11-24D5	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-hIg lambda light-chain FITC, Klon IS7-24C7	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-hCD138-APC, Klon B-B4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CXCR4-PE (C-X-C-Motiv- Chemokinrezeptor 4, CD184), Klon 12G5	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

#### 2.1.5 Zelllinien

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

#### 2.1.6 Puffer und Lösungen

##### 2.1.6.1 Zellkultur

Wachstumsmedium für MM-Zelllinien	
RPMI 1640	
+ 10%	FCS

+ 2 mM	Glutamin
+ 1 mM	Natriumpyruvat
+ 100 U/ml	Penicillin
+ 100 µg/ml	Streptomycin
<b>Agens zur Kultivierung von INA-6</b>	
IL-6	0,18 µg/µl, 1:1000-verdünnt
<b>Einfriermedium</b>	
RPMI-1640	70%
FCS	20%
DMSO	10%

<b>Puffer</b>	<b>Präparation</b>	<b>Aufbewahrung</b>
FACS-Puffer	500 ml PBS + 15 ml FCS	3% FCS

#### 2.1.6.2 Dosis – Wirkungs – Beziehung

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

#### 2.1.7 Radiotracer

<b>Radiotracer</b>	<b>Halbwertszeit</b>
[ <sup>18</sup> F]- 2-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose ( <sup>18</sup> F-FDG)	109,8 Minuten
[ <sup>11</sup> C]- L-Methyl-Methionin ( <sup>11</sup> C-MET)	20 Minuten

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten radioaktiven Substanzen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Samnick in der Radiopharmazie, im 11 MeV Zyklotron (GE PETtrace 6) des Universitätsklinikums Würzburg, Deutschland, hergestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten an den Zellkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt um Kontaminationen zu verhindern. Die Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden alle 1 - 3 Tage lichtmikroskopisch bewertet.

#### 2.2.1.1 Einfrieren von Zelllinien

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen geerntet und bei 1800 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1-2 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen umgefüllt. Dieses wird in einem mit Isopropanol gefüllten Zellkühler mit einer Kühlrate von circa 1 °C/Min. auf -80 °C heruntergekühlt um im Anschluss in flüssigem Stickstoff bei -196 °C langfristig aufbewahrt zu werden.

#### 2.2.1.2 Auftauen von Zelllinien

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in ein mit 10 ml Wachstumsmedium befülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert und in 10-20 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie auf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt und inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde täglich kontrolliert.

#### 2.2.1.3 (Sub-) Kultivierung der Zellen und Zellzahlbestimmung

Die Zellkulturen wurden entsprechend ihres jeweiligen Wachstumsmusters alle 2 bis 4 Tage gesplittet und mit neuem Medium versehen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen geerntet und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die partiell adhärente Zelllinie MM.1S wurde dazu mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst. Nach Zentrifugation (5 Min. bei 1800 rpm) wurde der Überstand verworfen und die Zellen, je nach Größe des Pellets, in 5-10 ml Medium mit einer serologischen Pipette resuspendiert. 90 µl Medium und 10 µl der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. 10 µl wurden hiervon entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop erfolgte die Zählung der Zellen in den einzelnen Kammern. Hierbei wird der Mittelwert

der gezählten Kammern mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert um auf die Zellzahl  $\times 10^4/\text{ml}$  zu gelangen.

### 2.2.2 Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven für Carfilzomib

Für die Behandlung der Zellen mit Cz wurde zunächst die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) ermittelt. Hierzu wurde eine Lebend-Tod-Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI gelangt nur bei Membrandefekten, zum Beispiel im Rahmen des Zellsterbens, in das Innere der Zelle und interkaliert dort an doppelsträngige Nukleinsäuren. Das Eindringen von PI kann im Durchflusszytometer gemessen werden. Zur Versuchsdurchführung wurden 96-Loch-Platten mit jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium pro Vertiefung versehen und verschiedene Konzentrationen zwischen 0 und 20 nM des Proteasominhibitors Cz zugegeben. Die Platten wurden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und mittels Zentrifugation (5 Min., 1800 rpm) pelletiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Färbelösung, bestehend aus 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI in 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer, und kurzem Mischen erfolgte die durchflusszytometrische Messung im FL-2 Kanal. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von CellQuest Pro (BD CellQuest Pro™ Software, BD, Heidelberg). In einer Kurve wurde dabei der prozentuale Anteil an lebenden Zellen gegen die Cz-konzentration aufgetragen. Anschließend konnte grafisch ermittelt werden, bei welcher Konzentration ein Anteil von 50% toten bzw. lebenden Zellen vorlag.

### 2.2.3 Untersuchung und Quantifizierung zellbiologischer Parameter mittels Durchflusszytometrie

#### 2.2.3.1 Untersuchung der Expression von CD138 (Syndecan-1) und CXCR4 (CD 184) an der Zelloberfläche

Zur Ermittlung der Expression des Adhäsionsmoleküls und Plasmazellmarkers CD138 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 wurden zunächst in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pro Zelllinie 6 mal  $1 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Wachstumsmedium ausgesät. Pro Zelllinie wurde dabei ein Ansatz als Kontrollwert unbehandelt belassen und ein zweites Triplikat mit der zuvor ermittelten Konzentration Cz behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer gewaschen. Nachdem diese zentrifugiert (5 Min., 1800 rpm,

Raumtemperatur) und pelletiert wurden, erfolgte die Resuspension in 100 µl FACS-Puffer. Nach Herstellerangaben der jeweiligen Oberflächenfärbungen wurden die Zellen anschließend mit 10 µl Färbelösung (CD138-APC, human / CD184 (CXCR4)-PE, human) versehen und für 20 Min. im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (5 Min., 1800 rpm), pelletiert und in circa 300 µl Puffermenge resuspendiert. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte für CD138 im FL-4, für CXCR4 im FL-2 Kanal. Das geometrische Mittel der Fluoreszenzaktivität (=GeoMean) der Ansätze wurde unter Anwendung der CellQuest Pro Software ermittelt.

#### 2.2.3.2 Untersuchung der Expression intrazellulärer Immunglobulin $\kappa$ und $\lambda$ Leichtketten

Auch hier erfolgte zunächst die Aussaat und Behandlung der Zellen mit anschließender Inkubation für 48 Stunden in einer Mikrotiterplatte, wie unter Punkt 2.2.3.1 bereits geschildert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt, in 200 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 Min., 1800 rpm). Nach Abtragen des Überstandes erfolgte nach Herstellerangaben unter der Anleitung des Inside Stain Kit zunächst die Fixierung der Zellen. Hierfür wurden diese mit 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 250 µl Inside Fix für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen und Pelletieren mit FACS-Puffer erfolgte die Doppelfärbung der Zellen mit je 100 µl Färbelösung (82 µl Inside Perm + je 9 µl Ig  $\kappa$ -APC / Ig  $\lambda$ -FITC-Antikörper). Dabei dient das Inside Perm der Durchlässigkeit der Zellmembran um die intrazellulären Leichtketten zu erreichen. Durch unterschiedliche Emissionsspektren besteht die Möglichkeit zwei Färbungen gleichzeitig durchzuführen. Nach einer Inkubationszeit von 20-30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mit 1 ml Inside Perm gewaschen und in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung und Messung. Diese wurde für  $\kappa$  im FL-4 Kanal, für  $\lambda$  im FL-1 Kanal durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software CellQuest Pro.

### 2.2.3.3 Analyse der Zellproliferation mittels Carboxyfluorescein succinimidyl ester - Färbung

Mithilfe des grünfluoreszierenden Farbstoffs Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) wurde die Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien bestimmt. Auch hier erfolgte, wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben, die Aussaat und Behandlung der Zellen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, in 300  $\mu$ l und mit 1  $\mu$ M CFSE in 3% FCS/PBS 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proliferation lebender Zellen wurde mittels Durchflusszytometer im FL-1 Kanal als Abnahme der Fluoreszenzaktivität ermittelt und mithilfe von CellQuest Pro ausgewertet.

### 2.2.4 Tracer

#### 2.2.4.1 Synthese von [ $^{18}$ F]- 2-Fluor-2-desoxy-D-glukose

$^{18}$ F-FDG wurde mithilfe eines FASTlab™, einer automatisierten PET-Radiochemie-Syntheseplattform, hergestellt. Das Protokoll der Synthese stammt hierbei aus dem Weißbuch von GE Healthcare.

#### 2.2.4.2 Synthese von [ $^{11}$ C]-L-Methyl-Methionin

$^{11}$ C-MET wurde durch on-line  $^{11}$ C-Methylierung von L-Homocystein Thiolaceton Hydrochlorid entsprechend der Methode von Gomzina und Kuznetsova (Gomzina & Kuznetsova, 2011) hergestellt.

### 2.2.5 Zelluläre Radiotraceraufnahme

Vorbereitend für die Versuche zur Radiotraceraufnahme wurden pro Zelllinie  $10 \times 10^6$  Zellen in 20 ml in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Hierfür wurden pro Zelllinie 2 Flaschen vorbereitet. Ein Ansatz enthielt unbehandelte Zellen, ein weiterer Ansatz wurde mit der jeweils ermittelten IC<sub>50</sub> des Proteasominhibitors Cz behandelt. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug 48 Stunden.

Zur Analyse der Radiotraceraufnahme wurden die Zellen geerntet, gezählt und eine definierte Zahl ( $4 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l PBS) in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Für jeden Zeitpunkt und jede Zelllinie wurden jeweils Triplikate unbehandelter sowie behandelter Zellen vorbereitet. Die Triplikate dienen der Minimierung von Messfehlern. Anschließend erfolgte die Zugabe des Radiotracers. Dieser wurde zuvor mit Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf 1 Mio Zerfälle/min (cpm) im Falle des

$^{18}\text{F}$ -FDG, bzw. auf 1,5 Mio cpm im Falle des  $^{11}\text{C}$ -MET, verdünnt und eingestellt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Nuklids erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Zur Geringhaltung von Fehlerquellen wurde die Radiotracerzugabe beim größten Zeitwert begonnen. Um die Zeit-Aktivitäts-Kinetik zu bestimmen, wurde die Radiotraceraufnahme der jeweiligen  $^{18}\text{F}$ -FDG-Triplikate (HWZ 110 Min.) zu den Zeitpunkten 5 – 30 – 60 – 90 – 120 Minuten, die der jeweiligen  $^{11}\text{C}$ -MET-Triplikate (HWZ 20 Min.) zu den Zeitpunkten 5 – 15 – 30 – 45 – 60 Minuten gestoppt. Dies erfolgte durch eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (3500 U/min, 4°C, 2 Min.), zwei Mal mit je 200  $\mu\text{l}$  kaltem PBS gewaschen und die intrazellulär gespeicherte Radioaktivität der Pellets im Gammastrahlungszähler gemessen. Pro Versuchsdurchlauf wurden zudem Proben mitgeführt, die ausschließlich den jeweiligen Radiotracer enthielten. Diese dienten als Referenz. Um eine Hintergrundkorrektur durchführen zu können wurden leere Reaktionsgefäße gemessen. Aus den hintergrund- und zerfallskorrigierten Rohwerten der Triplikate wurden mithilfe der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel die relative Aufnahme des jeweiligen Radiotracers zu einem bestimmten Zeitpunkt als prozentuale Aufnahme der initial zugegebenen Aktivität sowie Mittelwert und Standardfehler berechnet.

#### 2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Excel 2010/13, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die quantitativen Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW $\pm$ SD) oder  $\pm$  Standardfehler (MW $\pm$ SEM) angegeben (oder Median und Spannweite). Um die Signifikanz zweier Werte zu ermitteln wurde der Mann-Whitney-U-Test für nichtparametrische Datenverteilung angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Biologie der verwendeten Myelomzelllinien

Die MM-Heterogenität wird im Versuchsaufbau mittels dreier Zelllinien humanen Ursprungs mit verschiedenen klinischen und zellbiologischen Eigenschaften nachempfunden (INA-6, MM.1S, OPM-2). In der nachfolgenden Tabelle werden die Zelllinien gegenübergestellt (Tabelle 1).

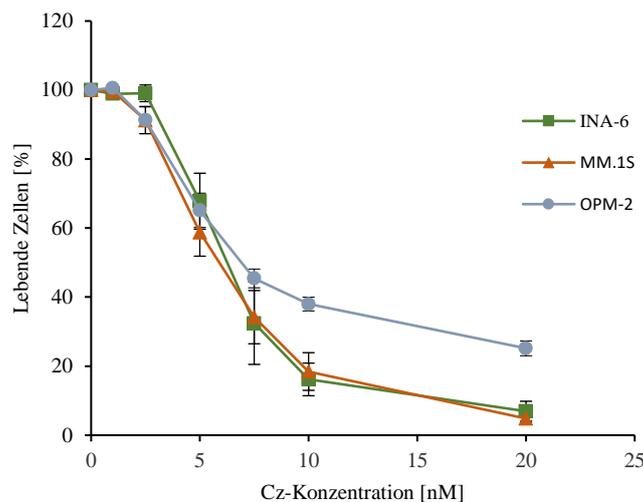
Die Zelllinie INA-6 wurde aus einer Patientin mit Plasmazellleukämie kultiviert, benötigt zum Wachstum IL-6 und zeigt mit 38-40 Stunden Verdopplungszeit das schnellste Wachstum unter den verwendeten Zelllinien (Barille, Bataille, & Amiot, 2000; Burger et al., 2001; Shammas et al., 2008). MM.1S wurde aus dem peripheren Blut einer 42-jährigen Patientin mit MM isoliert. Sie wachsen in Suspension oder partiell adhärent mit einer Verdopplungszeit von 72 Stunden und sind glukokortikoidsensitiv (Greenstein et al., 2003). OPM-2 Zellen stammen aus dem peripheren Blut einer 56-jährigen Patientin mit rezidiviertem MM in leukämischer Phase und haben eine Verdopplungszeit von circa 50-60 Stunden. Sie weisen die Translokation t(4;14) auf, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen Aberration und beschleunigter Krankheitsprogression angenommen (Kalff & Spencer, 2012; López-Corral et al., 2011).

*Tabelle 1 Charakteristika der untersuchten humanen Myelomzelllinien*

<b>Zelllinie</b>	<b>INA-6</b>	<b>MM.1S</b>	<b>OPM-2</b>
<b>Referenz/Quelle</b>	Burger (1994)	ATCC CRL-2974	DSMZ ACC50
<b>Immunglobulin</b>	IgG kappa ( $\kappa$ )	IgA lambda ( $\lambda$ )	IgG lambda ( $\lambda$ )
<b>Wachstum</b>	Suspension	Suspension oder teilweise adhärent	Suspension
<b>Besonderheiten</b>	IL-6-abhängiges Wachstum	dexamethasonsensitiv	t(4;14), hypertriploid

### 3.2 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration

In Abbildung 1 ist die Reduktion der Viabilität der einzelnen Zelllinien nach Inkubation (48h) mit aufsteigenden Konzentrationen des Proteasominhibitors Cz ersichtlich. Für INA-6 und MM.1S zeigte sich insgesamt ein sehr ähnlicher Verlauf. Bis 5 nM lag nahezu eine Halbierung der viablen Zellen vor, anschließend ließ sich bei Verdopplung der Cz-Konzentration eine Reduktion um etwa ein Drittel bis 20 nM verzeichnen. Während OPM-2 bei geringer Cz-Konzentration ein ähnliches Ansprechen aufwies, reagierte die Zelllinie bei höheren Konzentrationen hingegen weniger sensitiv auf Cz und schien resistenter als die anderen beiden Zelllinien zu sein. Für die nachfolgenden Versuche wurde anhand dieser Dosis-Wirkungs-Kurven graphisch die  $IC_{50}$  für jede Zelllinie definiert und ergab für den weiteren Versuchsaufbau folgende Behandlungsdosen: INA-6: 6,0 nM; MM.1S: 6,0 nM; OPM-2: 7,0 nM.



**Abbildung 1 Dosis-Wirkungs-Kurven für Carfilzomib.** Ermittlung der Viabilitätsreduktion der Zelllinien INA-6, MM.1S und OPM-2 mittels PI-Färbung und durchflusszytometrischer Auswertung nach 48-stündiger Behandlung mit Carfilzomib. Darstellung des relativen prozentualen Anteils lebender Zellen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=5$ ).

### 3.3 Radiotraceraufnahme zur Bildgebung des Multiplen Myeloms

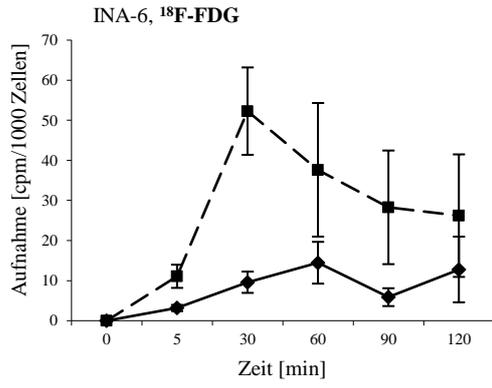
#### 3.3.1 $^{18}\text{F}$ -FDG versus $^{11}\text{C}$ -MET – Aufnahme bei unbehandelten Zellen

Die Auswertungen der Messungen von intrazellulär gespeicherter Radioaktivität der jeweiligen Zelllinie werden in den Abbildungen 2a), c), e) für die Messreihe mit  $^{18}\text{F}$ -FDG und in den Abbildungen 2b), d), f) für die Aufnahme von  $^{11}\text{C}$ -MET veranschaulicht.

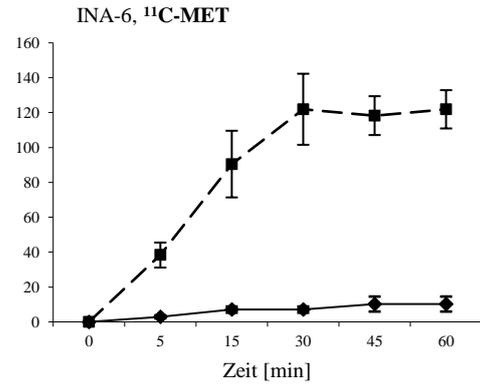
Bei den unbehandelten Zellen lag die maximale  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme zwischen 50-70 cpm/1000 Zellen: für INA-6 lag diese bei  $52,3 \pm 10,9$  cpm/1000 Zellen (MW $\pm$ SEM; Abb. 1a), welche nach 30 Min. erreicht wurde. MM.1S erreichte den FDG-Peak nach 120 Min. ( $66,2 \pm 9,9$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2c), OPM-2 nach 60 Min. ( $67,6 \pm 5,3$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2e). Der maximalen Aufnahme folgt im Falle der INA-6 und OPM-2 Zellreihe eine rasche Abnahme der Radiotracerstorage (Abb. 2a, 2e). MM.1S zeigte im gesetzten Zeitrahmen von 120 Min. einen kontinuierlichen Anstieg (Abb. 2c).

Verglichen zu  $^{18}\text{F}$ -FDG, zeigte sich für  $^{11}\text{C}$ -MET eine höhere Aufnahme für alle Zelllinien. Bezogen auf alle Zeitwerte zeigt sich diese lediglich für INA-6 signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), für MM.1S sowie OPM-2 liegt die Signifikanz bei  $p < 0,1$ . Der Aufnahmepeak der INA-6 Zellen lag bei  $121,9 \pm 20,4$  cpm/1000 Zellen (MW $\pm$ SEM) bei 30 Min. und ging in den nachfolgenden Zeitmessungen bei 45 und 60 Min. nahezu in ein Plateau über (Abb. 2b). Die maximale Radiotraceraufnahme für MM.1S lag bei  $172,4 \pm 34,8$  cpm/1000 Zellen nach 45 Min. (Abb. 2d) und bei  $124 \pm 19,8$  cpm/1000 Zellen nach 60 Min. für OPM-2 (Abb. 2f). Während diese bei MM.1S anschließend einen langsamen Abfall zeigte, war bei OPM-2 bis 60 Min. ein stetiger Anstieg zu sehen (Abb. 2d, 2f).

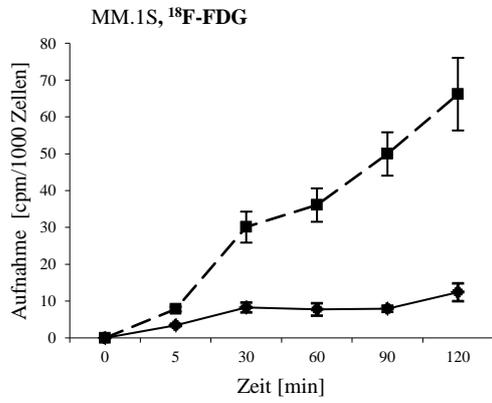
a.)



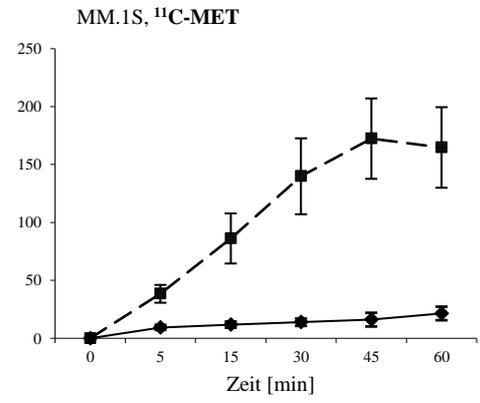
b.)



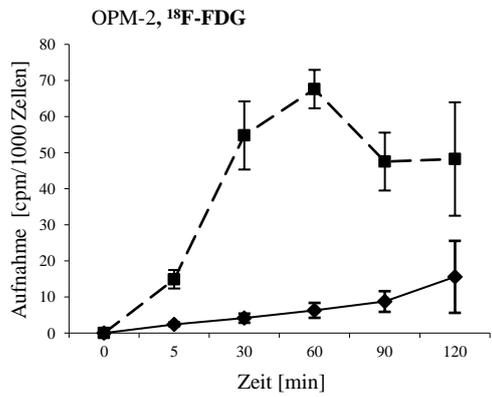
c.)



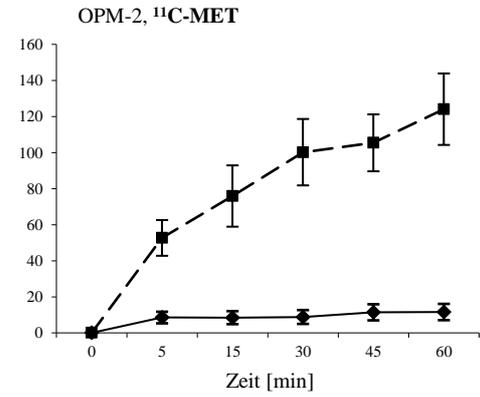
d.)



e.)



f.)



—■— unbehandelt  
—◆— Cz

**Abbildung 2 Vergleich der Radiotraceraufnahme von unbehandelten und behandelten Zellen.** Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Carfilzomib bzw. ohne Behandlung wurden diese in Triplikaten mit  $^{18}\text{F}$ -FDG (a, c, e) bzw.  $^{11}\text{C}$ -MET (b, d, f) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten ( $^{18}\text{F}$ -FDG: 5-30-60-90-120 Min.,  $^{11}\text{C}$ -MET: 5-15-30-45-60 Min.) im Gammastrahlungszähler gemessen. Die hintergrund- und zerfallskorrigierten Daten zeigen hier jeweils den Mittelwert der relativen Aufnahme, die als prozentuale Aufnahme der initial zugegebenen Aktivität pro 1000 Zellen dargestellt wird (Mittelwert cpm pro 1000 Zellen  $\pm$  Standardfehler, n=6).

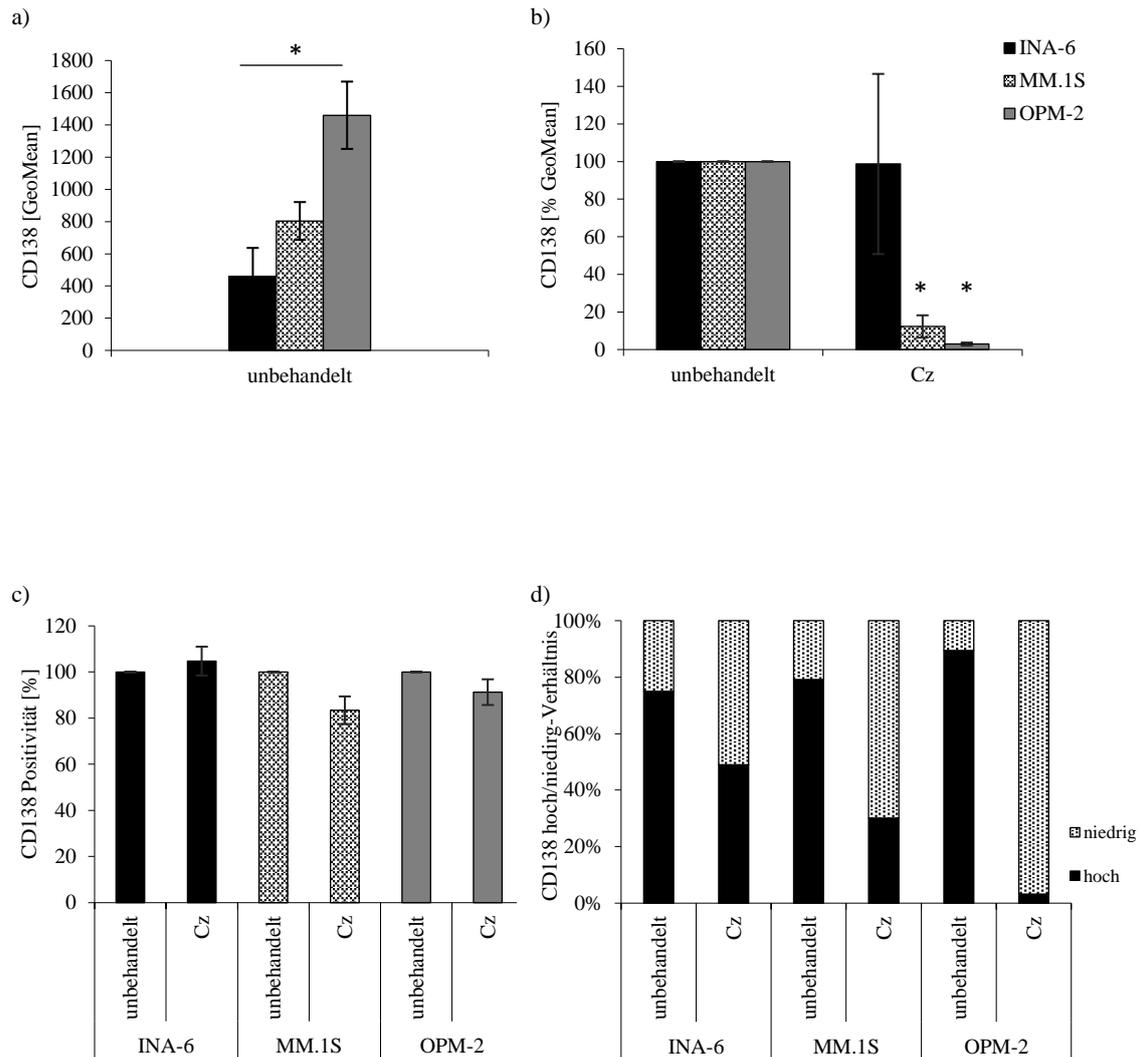
### 3.3.2 $^{18}\text{F}$ -FDG versus $^{11}\text{C}$ -MET – Aufnahme bei behandelten Zellen

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, war sowohl die  $^{11}\text{C}$ -MET- als auch  $^{18}\text{F}$ -FDG - Aufnahme unbehandelter Zellen über den gesamten Messzeitraum in allen 3 Zelllinien deutlich höher als die behandelte Zellen (Cz-Inkubation für 48h). Dennoch zeigte sich im Vergleich der absoluten Werte bei jeder Zelllinie zu jedem Zeitpunkt eine deutlich höhere Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen der mit Methionin markierten Zellen. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Speicherung nach Cz-Behandlung lag für INA-6 und MM.1S, je nach Zeitwert, bei 20-50% des Ausgangswertes ( $p < 0,1$ ). OPM-2 kennzeichnete sich sogar durch eine Speicherkapazitätsabnahme auf 10-30% ( $p < 0,05$ ) aus. Die maximale  $^{18}\text{F}$ -FDG Retention der Zellen mit Cz-Behandlung lag für INA-6 bei 60 Min. ( $14,5 \pm 5,2$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2a) bei MM.1S entsprechend der unbehandelten Zellen bei 120 Min. ( $12,4 \pm 2,4$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2c) und bei OPM-2 ebenfalls bei 120 Min. ( $15,6 \pm 10$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2e). Bei  $^{11}\text{C}$ -MET hingegen zeigte sich für alle 3 Zelllinien bei der vergleichenden Aktivitätsaufnahme zwischen behandelten und unbehandelten Zellen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,02$ ). Das Maximum der  $^{11}\text{C}$ -MET-Retention nach 48-stündiger Behandlung stellte sich für INA-6 ab der 45 Min. mit  $10,2 \pm 4,3$  cpm/1000 Zellen ein, welches auch beim folgenden Zeitwert von 60 Min. keine Veränderung aufwies (Abb. 2b). MM.1S wies eine kontinuierliche Zunahme bis 60 Min. auf ( $16,2 \pm 5,9$  cpm/1000 Zellen; Abb. 2d) und auch die OPM-2-Messreihe zeigte ihr  $^{11}\text{C}$ -MET-Retentionsmaximum bei 60 Min. ( $11,6 \pm 4,5$  cpm/1000 Zellen, Abb. 2f). Zudem zeigte sich im Vergleich zu  $^{18}\text{F}$ -FDG insgesamt eine geringfügig höhere Speicherkapazitätsabnahme zwischen unbehandelten und behandelten Zellen: bei INA-6 zeigte sich ein Abfall auf 4-10% des Ausgangswertes, bei MM.1S auf 9-25% und bei OPM-2 auf 9-17%.

### 3.4 Biologische Marker des Multiplen Myeloms und deren Beeinflussung durch Carfilzomib

#### 3.4.1 Untersuchung der Zelloberflächenexpression von CD138 und CXCR4

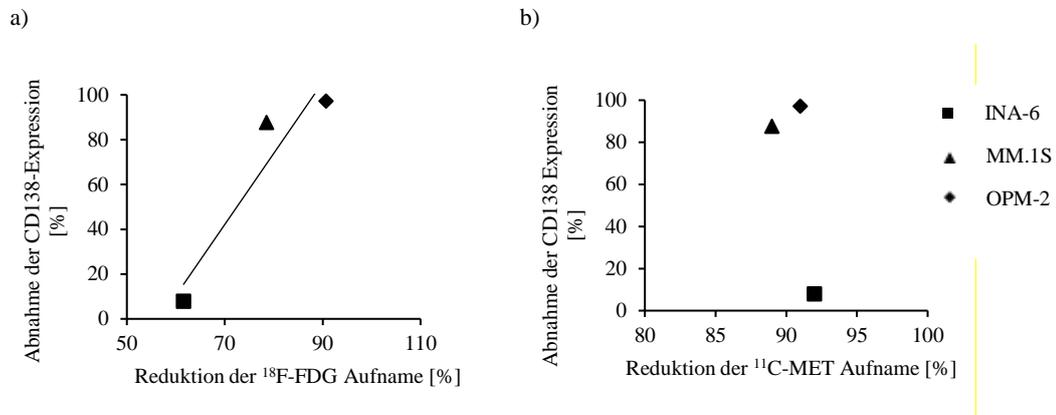
CD138, als wichtiger MM-Marker und Differenzierungsmarker für reife Plasmazellen, zeigte nach Quantifizierung mittels durchflusszytometrischer Auswertung in allen drei Zelllinien ein hohes Expressionslevel. Dies präsentierte sich von OPM-2 zu MM.1S zu INA-6 absteigend (Abb. 3a). Die CD138 Expression war in MM.1S Zellen doppelt, in OPM-2 Zellen dreifach höher als bei INA-6. Alle drei Zelllinien zeigten untereinander signifikante Unterschiede ( $p < 0,02$ ). In der hintergrundkorrigierten, prozentualen Darstellung, wie in Abbildung 5b zu sehen, weist INA-6 eine große Varianz der Expression nach Cz-Behandlung auf, während die weiteren Zellreihen eine signifikante Abnahme aufweisen (MM.1S auf circa 12%,  $p < 0,02$ ; OPM-2 auf circa 3% des Ausgangswertes;  $p < 0,02$ ). Bei genauerer Analyse zeigte sich jedoch, dass keine Veränderung des prozentualen Anteils der Zellen in der jeweiligen Population, die CD138 exprimieren, nach Behandlung mit Cz vorlag (Abb. 3c). Abbildung 3d lässt möglicherweise darauf schließen, dass sich die in Abb. 3b dargestellte CD138 Reduktion durch eine Abnahme von CD138 an der Zelloberfläche erklären lässt. Die Zelllinien zeigten nahezu eine Umkehr des Zustandes von CD138 hoch exprimierenden Zellen zu CD138 niedrig exprimierenden Zellen.



**Abbildung 3 CD138 Oberflächenexpression.** Durchflusszytometrische Bestimmung der CD138 Expression nach 48-stündiger Inkubation mit Carfilzomib bzw. ohne Behandlung, dargestellt als hintergrundkorrigierte Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der geometrisch gemittelten Fluoreszenzintensität (=GeoMean). (a) Absolutes Expressionslevel der unbehandelten Zellen, (b) prozentuales Expressionslevel unbehandelter und behandelter Zellen, (c) prozentualer Anteil CD138 positiver Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen (d) Verhältnis von CD138 hoch zu CD138 niedrig exprimierenden Zellen vor und nach Behandlung ( $n=6$ ,  $*=p<0,02$ ).

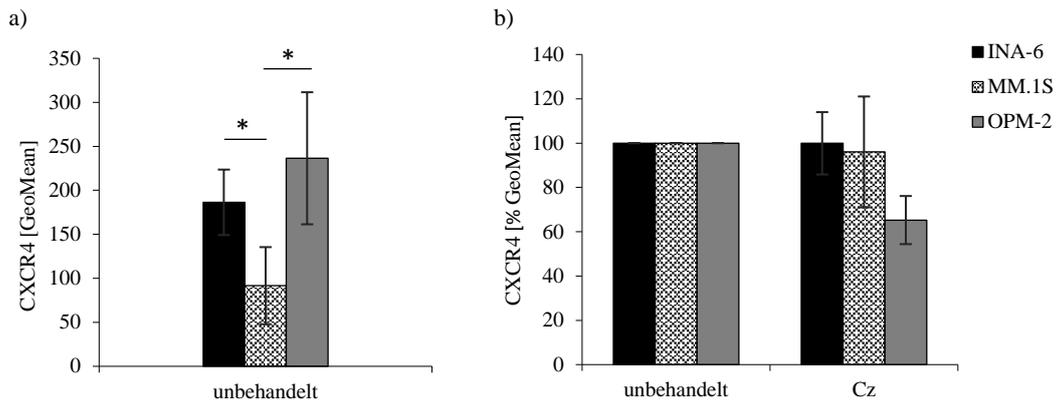
Bei lediglich drei untersuchten Zellreihen bleibt aufgrund der geringen Fallzahl eine Auswertung mit Bestimmung eines Korrelationskoeffizienten zwischen biologischen Markern und Traceraufnahme ohne statistisch signifikante Aussagekraft. Bei visueller Beurteilung des Zusammenhangs von CD 138 Expression und Aufnahme der Radiotracer erkennt man für  $^{18}\text{F}$ -FDG eine positive Tendenz zwischen Reduktion der gespeicherten

Aktivitätsmenge und CD138 Reduktion (Abb. 4a). Für  $^{11}\text{C}$ -MET zeigte sich ein vergleichbarer Zusammenhang nicht (Abb. 4b).



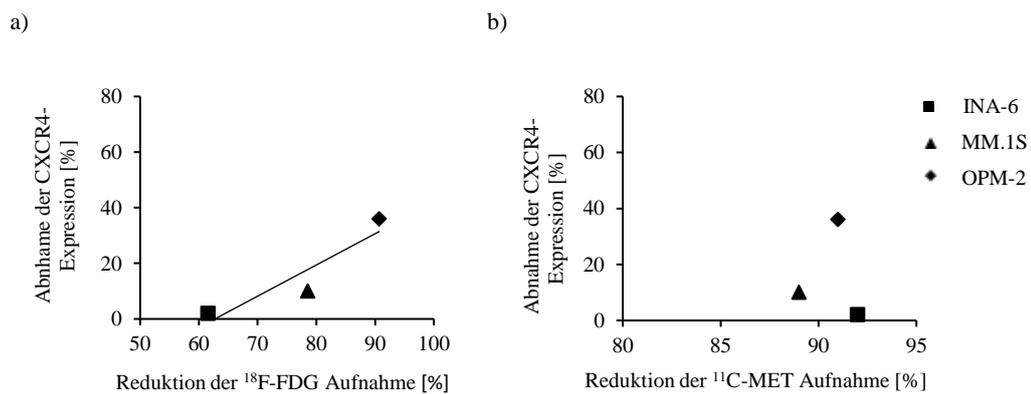
**Abbildung 4 Darstellung der Reduktion von CD138 Expression und Radiotraceraufnahme.** Zusammenhang zwischen der relativen Abnahme der CD138 Expressionsintensität und der prozentualen Reduktion der (a)  $^{18}\text{F}$ -FDG Speicherung bzw. (b)  $^{11}\text{C}$ -MET-Speicherung nach Behandlung mit Cz. Vergleich der Traceraufnahme zum Zeitpunkt 60 Min.,  $n=6$ .

In der Versuchsauswertung wies CXCR4 in OPM-2 die höchste, in MM.1S die geringste Expressionsrate auf (OPM-2 > INA-6 > MM.1S;  $p < 0,02$  für alle), dabei stellte sich die OPM-2 Expression circa dreifach, die INA-6 Expression zweifach höher als die MM.1S Expression dar (Abb 5a). Es zeigte sich in allen 3 Zelllinien eine nicht signifikante Abnahme nach Behandlung mit Cz (INA-6 = keine Abnahme,  $p = \text{n.s.}$ ; MM.1S auf 96%,  $p = \text{n.s.}$ ; OPM-2 auf 65% des Ausgangswertes,  $p = \text{n.s.}$ ; Abb. 5b).



**Abbildung 5 CXCR4 Expressionslevel der MM-Zelllinien.** Durchflusszytometrische Bestimmung der CXCR4 Expression, dargestellt als hintergrundkorrigierter Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der geometrisch gemittelten Fluoreszenzintensität: (a) absolutes Expressionslevel, (b) prozentuales Expressionslevel im Vergleich ohne Behandlung bzw. mit 48-stündiger Behandlung mit Carfilzomib ( $n=6$ ,  $*=p<0.05$ ).

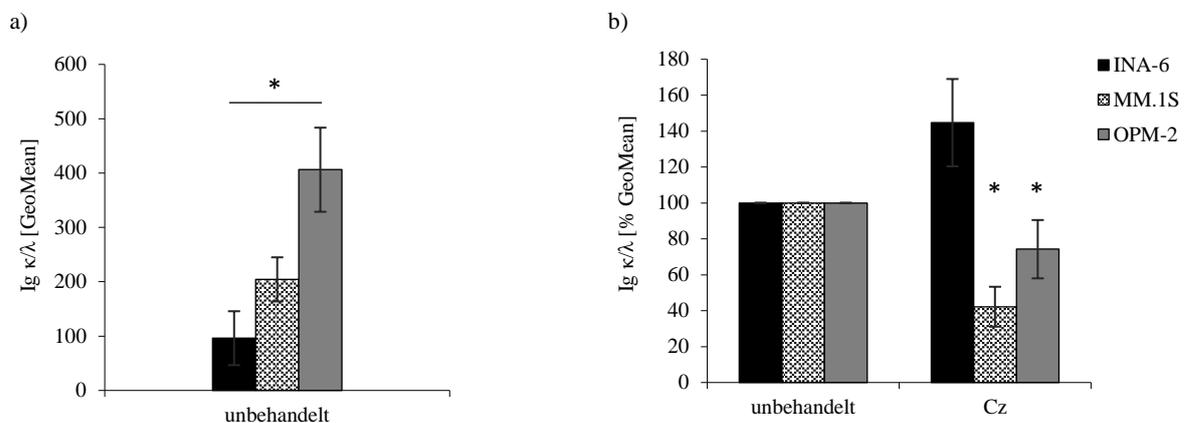
Wird die prozentuale Reduktion nach Cz Behandlung betrachtet, stellte sich für  $^{18}\text{F}$ -FDG visuell ein positiver Zusammenhang zwischen Reduktion der Traceraufnahme und Reduktion der Expression dar (Abb. 6a), während dieser Zusammenhang für  $^{11}\text{C}$ -MET nicht vorlag (Abb. 6b).



**Abbildung 6 Darstellung der Reduktion von CXCR4 Expression und Radiotraceraufnahme.** Zusammenhang der relativen CXCR4-Abnahme mit der prozentualen Reduktion der (a)  $^{18}\text{F}$ -FDG-Speicherung bzw. (b)  $^{11}\text{C}$ -MET-Speicherung nach Behandlung mit Carfilzomib. Vergleich der Traceraufnahme zum Zeitpunkt 60 Min.,  $n=6$ .

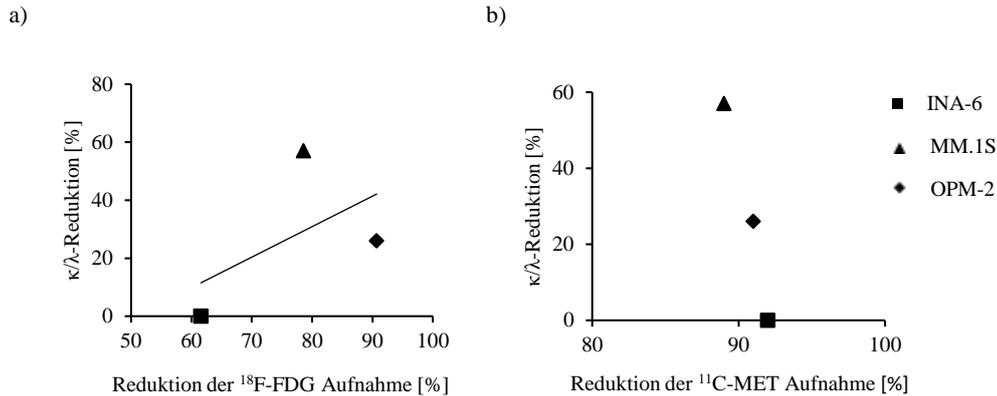
### 3.4.2 Expression intrazellulärer Ig $\kappa$ und Ig $\lambda$ – Leichtketten

Ein weiteres Kennzeichen der Myelombiologie stellt die überschießende Immunglobulin-Leichtkettenproduktion dar. Diese intrazellulären Leichtketten wurden daher ebenfalls durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei zeigte sich für MM.1S eine 2-fach höhere und für OPM-2 eine 4-fach höhere Expression als bei INA-6 ( $p < 0,02$  für alle; Abb. 7a). Im Falle der  $\kappa$ -produzierenden INA-6-Zelllinie erfolgte nach Cz-Behandlung ein deutlicher Ig-Anstieg ( $p = n.s.$ ). Die Immunglobulin  $\lambda$ -Leichtketten produzierenden Zelllinien MM.1S und OPM-2 hingegen wiesen eine signifikante Abnahme der Ig-Produktion auf: MM.1S auf etwa 60% ( $p < 0,02$ ), OPM-2 auf etwa 30% ( $p < 0,05$ ) des unbehandelten Ausgangswertes (Abb. 7b).



**Abbildung 7 Expression intrazellulärer Ig  $\kappa$  und Ig  $\lambda$  Leichtketten.** Darstellung der hintergrundkorrigierten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der geometrisch gemittelten Fluoreszenzintensität (=GeoMean) der Ig  $\kappa$  (INA-6)/ Ig  $\lambda$  (MM.1S/OPM-2) - Expression der MM-Zelllinien (a) als absolutes Expressionslevel, (b) als prozentuale Expression ohne Behandlung bzw. mit Behandlung (Carfilzomib, 48h) ( $n=6$ ,  $*=p < 0,05$ ).

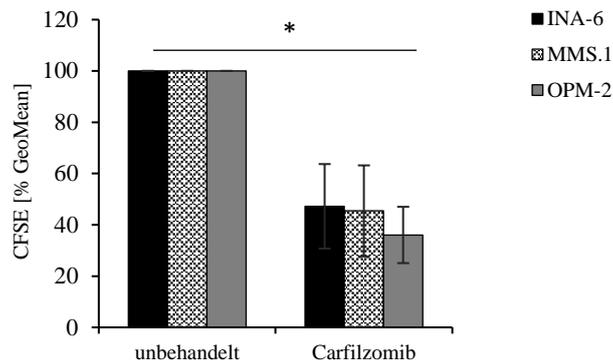
Bei Betrachtung der prozentualen Reduktion nach Cz-Behandlung, zeigte sich für  $^{18}\text{F}$ -FDG tendenziell eine höhere Tracerabnahme bei höherer Leichtkettenreduktion (Abb. 8a). Für  $^{11}\text{C}$ -MET zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Tracerabnahme und Abnahme der Expression von Ig  $\kappa/\lambda$  (Abb. 8b).



**Abbildung 8 Zusammenhang der Reduktion intrazellulärer Ig κ- (INA-6)/ Ig λ- (MM.1S, OPM-2) Leichtketten und Radiotraceraufnahme.** Darstellung der relativen Leichtkettenabnahme und prozentualen Reduktion der (a) <sup>18</sup>F-FDG Speicherung bzw. (b) <sup>11</sup>C-MET-Speicherung nach Behandlung mit Cz. Vergleich der Traceraufnahme zum Zeitpunkt 60 Min., n=6.

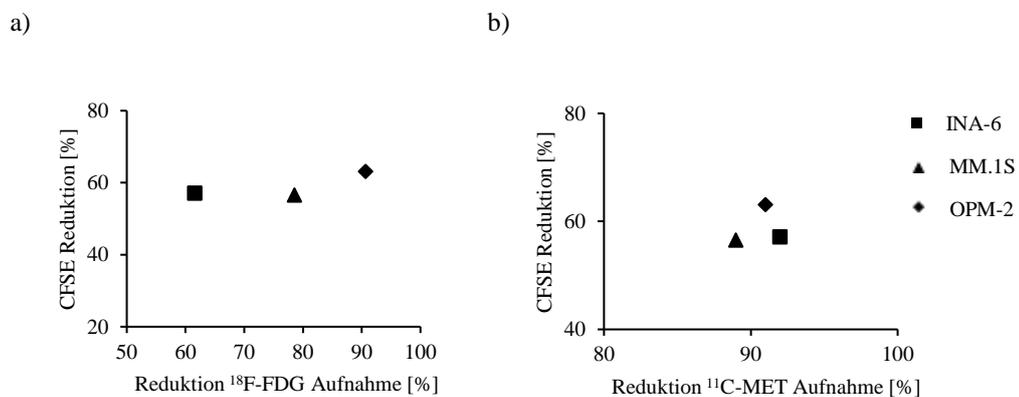
### 3.4.3 Proliferation der verwendeten Myelomzelllinien

Entsprechend der Tatsache, dass sich der Proliferationsmarker CFSE bei Teilung der Zelle gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, ließ sich nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit der ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentration von Cz eine Abnahme der Proliferation durch eine höhere CFSE-Intensität (zwischen 130-170%) in der durchflusszytometrischen Bewertung verzeichnen. Die Proliferation zeigte sich demnach für OPM-2 am höchsten, gefolgt von MM.1S und INA-6. Nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor Cz zeigten die drei Zelllinien eine signifikant geringere relative Proliferation ( $p < 0,02$ ). Abbildung 9 veranschaulicht dies mit der prozentualen Darstellung der Ergebnisse. Hierbei erkennt man, dass Cz bei OPM-2 die höchste Proliferationshemmung bewirkt, diese fiel auf etwa ein Drittel, bei MM.1S sowie INA-6 fiel diese verglichen mit unbehandelten Zellen auf circa die Hälfte ab. Nach Behandlung zeigen die Zelllinien untereinander keine signifikanten Proliferationsunterschiede.



**Abbildung 9 Darstellung der Zellproliferation.** Durchführung mittels CFSE-Färbung und durchflusszytometrischer Quantifizierung von Zellen in unbehandeltem Zustand und Zellen nach Behandlung (Carfilzomib, 48h). Relative prozentuale Darstellung des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung (MW $\pm$ SD) der geometrisch gemittelten Fluoreszenzintensität (GeoMean) der behandelten Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen (n=5, \*=p<0,02).

Nach Cz-Behandlung der Zellen zeigte sich keine Tendenz zwischen einer höheren Proliferationsabnahme und einer höheren Radiotracer-speicherabnahme, weder für  $^{11}\text{C}$ -MET noch für  $^{18}\text{F}$ -FDG (Abb. 10a, 10b).



**Abbildung 10 Darstellung der Reduktion von Proliferation und Radiotraceraufnahme.** Zusammenhang der relativen Proliferationsabnahme mit der prozentualen Reduktion der (a)  $^{18}\text{F}$ -FDG Speicherung bzw. (b)  $^{11}\text{C}$ -MET-Speicherung nach Behandlung mit Cz. Vergleich der Traceraufnahme zum Zeitpunkt 60 Min. - entsprechend der in vivo PET/CT-Aufnahmen, n=6.

## 4 Diskussion

Trotz der Weiterentwicklung der etablierten Stadieneinteilung in Form des Durie/Salmon PLUS Staging Systems und der Überarbeitung der Diagnosekriterien des MM durch die IMWG mit Einführung erweiterter bildgebender Modalitäten stellt die planare Ganzkörperröntgenaufnahme weiterhin den Goldstandard in der Bildgebung des MM zur Detektion von Osteolysen dar (Caers et al., 2014; Dimopoulos et al., 2009). Die Forderung nach Differenzierung zwischen auch kleinster aktiver Läsionen und persistierender, möglicherweise inaktiver, Herde zur Evaluierung des Therapieansprechens und der Anpassung therapeutischer Ansätze könnte der funktionellen Bildgebung eine entscheidende Rolle einräumen (Mihailovic & Goldsmith, 2015).  $^{18}\text{F}$ -FDG als Glukoseanalogon in der Anwendung bei der PET/CT stellt dabei unter anderem einen Ansatz der neuen molekularen Bildgebungsverfahren dar (Durie et al., 2002). Die hohe Sensitivität in der Detektion extramedullärer MM-Manifestationen wird jedoch durch Limitationen in der Spezifität überschattet (Shortt et al., 2009; Zamagni et al., 2007).

Trotz signifikanter Verbesserungen bezüglich des Überlebenszeitraums, führt das MM noch immer in der Mehrzahl der Erkrankungen zu einem Rezidiv und gilt als unheilbar (Barlogie et al., 2014; Brioli et al., 2014). Dementsprechend bedarf es einer verbesserten Herangehensweise sowohl in der prätherapeutischen Diagnostik zur patientenbezogenen Risikostratifizierung als auch in der Beurteilung des Therapieansprechens um auch subklinische Phasen des MM zu detektieren und einer (individualisierten) Therapieplanung zuzuführen (Fulciniti et al., 2015; Mihailovic & Goldsmith, 2015; Paiva et al., 2015).

In dieser Arbeit wurde der aminosäurebasierte Radiotracer  $^{11}\text{C}$ -MET *in vitro* evaluiert, um einzuschätzen, ob seine Eigenschaften als Biomarker das Potential haben, die Sensitivität und Spezifität existierender bildgebender Verfahren in der Diagnostik des MM zu übertreffen. Insbesondere sollte bewertet werden, ob durch die Verwendung von  $^{11}\text{C}$ -MET die Möglichkeit besteht, die Paraproteinsynthese – eine Besonderheit in der Tumorbiologie des MM – durch die Darstellung eines erhöhten Aminosäuremetabolismus zu reflektieren. Weiterhin wurde der Einfluss einer möglichen

Therapie mit dem Proteasominhibitor Cz auf die Charakteristika des Radioliganden auf biologische Marker des MM beurteilt.

#### 4.1 Diagnostische Überlegenheit von $^{11}\text{C}$ -MET im Vergleich zu $^{18}\text{F}$ -FDG

Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich in dem Vergleich der  $^{18}\text{F}$ -FDG bzw.  $^{11}\text{C}$ -MET Aufnahme von verschiedenen etablierten MM-Zellen in unbehandeltem Zustand bereits nach kürzester Inkubationsdauer eine 3-3,5-fach höhere  $^{11}\text{C}$ -MET Retention. Nachfolgende Studien konnten mittlerweile eine höhere  $^{11}\text{C}$ -MET-Speicherung durch primäre CD138<sup>+</sup> Plasmazellen (MM Zellen) und im Mausmodell bestätigen (Luckerath et al., 2015; Luckerath et al., 2013). Ausgehend von diesen präklinischen Ergebnissen wurde eine prospektive klinische Studie (Lapa et al., 2016) durchgeführt, die zeigte, dass  $^{11}\text{C}$ -MET aufgrund einer erhöhten Traceraufnahme mehr Läsionen sichtbar macht und dadurch eine bessere und frühere Diagnose ermöglicht wird: im direkten Vergleich beider Tracer konnte bei 43 Patienten in verschiedenen Erkrankungsstadien (11 Patienten mit neu diagnostiziertem, 32 Patienten mit vorbehandeltem MM) für  $^{11}\text{C}$ -MET eine deutlich höhere Detektionsrate sowohl intra- als auch extramedullärer Manifestationen festgestellt werden. Weiterhin erfolgte bei 31 Patienten eine Knochenmarkbiopsie. Im Vergleich von histologisch nachgewiesener maligner Plasmazellinfiltrationen und Radiotraceraufnahme konnte sowohl für  $^{11}\text{C}$ -MET als auch für  $^{18}\text{F}$ -FDG eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Diese war für die  $^{11}\text{C}$ -MET-PET stärker ausgeprägt. Des Weiteren zeigten die Proben aus dem Knochenmark bei 13 von 15 Patienten eine LAT-1 Expression (L-Typ Aminosäuretransporter), ein Transporter, der einen wichtigen Transportmechanismus von hauptsächlich langkettigen Aminosäuren und  $^{11}\text{C}$ -MET in Myelomzellen nach intrazellulär repräsentiert. Die hohe LAT-1 Expression unterstützt die These, dass Methionin bedingt durch die Tumorbiologie dem Glukoseanalogon  $^{18}\text{F}$ -FDG in der Darstellung der Tumorlast überlegen sein könnte (Lapa et al., 2016).

Eine weitere aktuelle Studie, die in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe aus Würzburg und Navarra, Spanien, entstanden ist, bestätigt ergänzend das größere Potential von  $^{11}\text{C}$ -MET, verglichen zu  $^{18}\text{F}$ -FDG, als Marker für Tumorlast und Krankheitsaktivität beim MM. In 78 Patienten mit vorwiegend symptomatischem MM, aber auch solitärem Plasmozytom und SMM, zeigte sich sowohl patienten- als auch läsionsbezogen eine signifikante Überlegenheit des  $^{11}\text{C}$ -MET sowohl in der Detektion intra- als auch

extramedullärer Läsionen. Zudem lieferte die klinische Studie erstmalig den histologischen Beweis  $^{18}\text{F}$ -FDG-negativer, viabler MM-Läsionen, die lediglich im  $^{11}\text{C}$ -MET-PET nachweisbar waren. Die Studie stellt die These auf, dass damit  $^{11}\text{C}$ -MET möglicherweise das Potential birgt,  $^{18}\text{F}$ -FDG als Standard in der funktionellen Bildgebung zum Staging und Restaging abzulösen, da  $^{11}\text{C}$ -MET eine höhere Sensitivität und Spezifität zur Detektion von MM-Läsionen aufzeigt. Erstmals konnte eine Korrelation zwischen Traceraufnahme in der Bildgebung und im Rahmen von histologisch gesicherten Plasmazellinfiltraten in Knochenmarkbiopsien beziehungsweise –aspiraten aufgezeigt werden (Lapa et al., 2017). Ergebnisse anderer klinischer Studien stehen weitestgehend im Einklang zu den in dieser Arbeit und der klinischen Fortsetzung erhobenen Erkenntnisse (Dankerl et al., 2007; Nakamoto et al., 2013; Okasaki et al., 2015). Diese Untersuchungen wurden jedoch vor allem im klinischen Kontext durchgeführt. In einer ersten Pilotstudie schlussfolgerten Dankerl et al. zunächst auf der Basis von 19 Patienten mit diagnostiziertem MM versus 10 gesunden Kontrollprobanden, dass die Aufnahme des radioaktiv markierten Methionin der Darstellung von MM-Läsionen dient, während gesundes Knochenmark sich im Gegensatz dazu durch eine homogene geringe Aufnahme auszeichnete. Zudem beschreibt die Studie eine sensitive Detektion extramedullärer Manifestationen, was wiederum entscheidend zur Risikostratifizierung beitragen kann (Dankerl et al., 2007; Zamagni et al., 2011). Weitere Studien zeigten eine tendenzielle Überlegenheit der  $^{11}\text{C}$ -MET-PET/CT vor allem bei Vorhandensein negativer oder wenig aussagekräftiger Bildgebung mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG und hohem Verdacht auf ein MM (Nakamoto et al., 2013). Der direkte Vergleich verschiedener Tracer bei der Darstellung einer MM Manifestation wurde in vivo durch Okasaki et al. durchgeführt und zeigte sich im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen, wobei  $^{11}\text{C}$ -MET vor allem bei Patienten mit geringer Plasmazellbeteiligung (10-30%) eine Überlegenheit in der diagnostischen Detektion und der Differenzierung zwischen aktiven und inaktiven Läsionen aufwies. MGUS war jedoch, bei einem Einschluss von nur 2 Patienten, von der Detektion ausgeschlossen (Okasaki et al., 2015). Diese Studie schloss zudem extramedulläre Manifestationen aus, deren Präsenz mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben einhergeht und für deren Detektion  $^{18}\text{F}$ -FDG eine hohe Sensitivität aufweist (Blade et al., 2011; Usmani et al., 2012).

Die erhöhte Speicherung von  $^{11}\text{C}$ -MET lässt sich dabei möglicherweise durch die Myelombiologie erklären. Eine vermehrte Aufnahme der radioaktiv markierten Aminosäure durch MM-Zellen, als Basis der Bildgebung, soll eine Erhöhung der zellulären Proliferation und insbesondere der erhöhten Proteinsynthese im Rahmen der überschießenden Produktion von M-Protein, widerspiegeln (Hammerton et al., 1978; Okasaki et al., 2015). Dabei soll, zumindest teilweise, eine schnelle Aufnahme und metabolische Inkorporation von Aminosäuren in neu synthetisierte Immunglobuline erfolgen. Dies wurde durch Hammerton et al. mit der radioaktiv markierten Aminosäure Leucin ( $^3\text{H}$ -Leucin) dargestellt (Hammerton et al., 1978). Konkret nachgewiesen wurde dies in den durchgeführten Versuchen nicht, jedoch konnte in der klinischen Studie von Lapa et al. gezeigt werden, dass die  $^{11}\text{C}$ -MET Aufnahme mit dem histologisch bestimmten prozentualen Anteil an Plasmazellen im Knochenmark korreliert und damit einen guten Marker der tatsächlichen Tumorlast darstellen könnte (Lapa et al., 2017; Lapa et al., 2016). Die Annahme erhärten könnte weiterhin ein in der Arbeitsgruppe durchgeführter Versuch mit Cycloheximid. Die Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors zum Versuchsansatz hatte die Folge einer  $^{11}\text{C}$ -MET Retentionsabnahme, während  $^{18}\text{F}$ -FDG unverändert aufgenommen wurde (Luckerath et al., 2015).

#### 4.2 Therapieevaluierung mittels $^{11}\text{C}$ -MET

Sowohl die  $^{18}\text{F}$ -FDG als auch  $^{11}\text{C}$ -MET Retention nahm in den durchgeführten *in vitro* Versuchen nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor Cz ab. Hierbei war die  $^{11}\text{C}$ -MET Aufnahme nach Behandlung insgesamt geringfügig höher, wobei die Retentionsmaxima, die sich je nach Zelllinie zeitlich unterschieden, ähnlich hoch waren. Während sich die Traceraufnahme von  $^{11}\text{C}$ -MET in allen drei Zelllinien signifikant reduzierte, ließ sich für  $^{18}\text{F}$ -FDG lediglich für OPM-2 eine signifikante Abnahme der Tracerspeicherung verzeichnen. Die Reduktion der Tracerspeicherung könnte jedoch auch durch die Cz-induzierte Verminderung der Proliferationsrate bedingt sein. Aufgrund mangelnder kurativer Therapieansätze des MM und der hohen Rezidivrate nach Therapie ist die Detektion auch minimaler aktiver Restherde essentiell für das therapeutische Vorgehen (Mesguich et al., 2016). Bislang wurde für  $^{18}\text{F}$ -FDG ein prognostischer Wert vor und nach Behandlung publiziert (Derlin & Bannas, 2014; Durie et al., 2002; Lapa et al., 2014; Zamagni et al., 2011), der dem prognostischen Wert der MRT überlegen ist

(Bartel et al., 2009; Zamagni et al., 2011). In einer Studie von 2013 konnte bei einem Einschluss von 107 Patienten mit MM gezeigt werden, dass mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT-Staging, 3 Monate nach Therapie mit autologer Stammzelltransplantation sowie anschließend alle 6-12 Monate, ein negatives posttherapeutisches  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT mit einem langen krankheitsfreien Überleben korreliert und vice versa (Nanni et al., 2013). Zamagni et al. untersuchten weiterhin 192 Patienten mit neu diagnostiziertem MM zu Beginn sowie nach autologer Stammzelltransplantation mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT. Sowohl der Nachweis extramedullärer Manifestationen als auch eine erhöhte  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme zu Beginn und die Persistenz nach Stammzelltransplantation konnten als unabhängige Variablen für eine Abnahme des progressionsfreien Intervall konstatiert werden (Zamagni et al., 2011).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wiederum weisen darauf hin, dass  $^{11}\text{C}$  MET für eine aussagekräftige Prognose sogar besser als  $^{18}\text{F}$ -FDG geeignet sein könnte. Indem  $^{11}\text{C}$ -MET eine höhere Aufnahme in MM-Zellen vor und nach Behandlung aufweist und die Differenz zwischen unbehandeltem und behandeltem Zustand größer ist, könnte es sich als sensitiver sowohl für die Detektion von MM Läsionen als auch für das Erfassen von intra- und posttherapeutischen Veränderungen der Krankheitsaktivität erweisen. Nicht nur MM Herde mit geringem Metabolismus, die durch eine Bildgebung mit  $^{18}\text{F}$ -FDG nicht erfasst werden würden, sondern auch Veränderungen einer Myelommanifestation könnten so visualisiert und im Verlauf aufeinanderfolgender Therapien beobachtet werden. Somit wäre eine Evaluation im Sinne eines Therapiemonitoring möglich. Basierend auf dieser Hypothese wurde die Eignung der  $^{11}\text{C}$ -MET-PET zur Therapieevaluation und Prognose mittlerweile im Mausmodell bestätigt. Im Gegensatz zu der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT konnte bereits 24 h nach Verabreichung eines Proteasominhibitors ein signifikanter Abfall der  $^{11}\text{C}$ -MET-Speicherung beobachtet werden. Die Reduktion der  $^{11}\text{C}$ -MET-Aufnahme ist ein prognostischer Faktor für die Überlebenszeit (Luckerath et al., 2015). Eine auf diesen Ergebnissen aufbauende, prospektive klinische Studie zur Beurteilung des Therapieansprechens mittels  $^{11}\text{C}$ -MET ist aktuell in Planung und wurde bereits genehmigt.

### 4.3 Einfluss von Charakteristika der Pathogenese des Multiplen Myeloms auf die Traceraufnahme im Kontext der Behandlung mit Carfilzomib

#### 4.3.1 CD138

Die Versuche zeigten, dass die Anzahl der CD138 exprimierenden Myelomzellen prä- und posttherapeutisch nahezu identisch war, die relative CD138 Expression jedoch sank: Das Verhältnis zwischen „viele Zellen mit hoher CD138 Expression“ und „wenig Zellen mit niedriger CD138 Expression“ vor Therapie kehrte sich nach Therapie mit Cz um. Allerdings zeigte sich hierbei lediglich ein Zusammenhang mit der <sup>18</sup>F-FDG Aufnahme: nicht nur die Höhe der CD138-Expression unbehandelter Zellen zeigte einen starken positiven Zusammenhang zur Aufnahme, auch die Reduktion der Speichermenge unter Cz-Behandlung war umso höher, je weniger CD138 posttherapeutisch exprimiert wurde. <sup>11</sup>C-MET hingegen wies keine Tendenz zwischen Tracerreduktion und Reduktion der Oberflächenexpression auf. Es bleibt jedoch bisher noch unverstanden, welche Implikationen dieses Resultat hat. Zudem zeigte sich in diesem Punkt eine Diskrepanz zu weiteren an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin erhobenen Daten: bei der Behandlung mit den Proteasom-inhibitoren Bortezomib und Ixazomib wurde eine Tendenz zwischen erhöhter CD138 Expression und erhöhter <sup>11</sup>C-MET Aufnahme beobachtet (Doktorarbeit Leilah Omert).

#### 4.3.2 CXCR4

Der Chemokinrezeptor 4 (CXCR4; CD184) und dessen Ligand (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) sowie deren pathologische Überexpression sind beim MM Teil des Zellhomings, der Aktivierung und Zellmigration von Plasmazellen in das Knochenmark (Alsayed et al., 2007; Bao et al., 2013) und spielen eine Rolle bei Chemotaxis, Invasion, Angiogenese und Proliferation (Zhao et al., 2015).

Dabei dient der Ligand CXCL12/SDF1 $\alpha$  der Anlockung CXCR4 exprimierender Zellen und der Proliferation (Alsayed et al., 2007; Domanska et al., 2013). Der Rezeptor kann als prognostischer Faktor gewertet werden, wobei aktuelle Metaanalysen zeigen, dass die Überexpression von CXCR4 ein Biomarker für eine schlechte Prognose ist. Ob der Rezeptor und dessen Ligand jedoch abhängige oder unabhängige prognostische Marker darstellen, ist nicht abschließend geklärt (Bao et al., 2013; Zhao et al., 2015). In den durchgeführten Versuchen zeigte sich keine signifikante Abnahme nach Behandlung mit

Cz und auch in der Bewertung mit  $^{11}\text{C}$ -MET zeigte sich kein tendentieller Zusammenhang zwischen Reduktion der Traceraufnahme und Abnahme der CXCR4 Expression. Die Expression von CXCR4 in MM-Zellen könnte jedoch neben der Funktion als prognostischer Marker auch als Angriffspunkt genutzt werden um zielgerichtete Therapien zu etablieren. Eine CXCR4-gerichtete Endoradiotherapie mit radioaktiv ( $^{177}\text{Lu}$  oder  $^{90}\text{Y}$ ) markiertem Pentixather, dem therapeutischen Analogon des PET-Tracers („theranostic twin“), zeigte in einer Pilotstudie mit drei Patienten bereits vielversprechende Ergebnisse (Herrmann et al., 2016). Vor dem Hintergrund, den Rezeptor als Zielstruktur für Therapien zu nutzen, könnte sich die Tatsache, dass CXCR4 durch die Behandlung mit Cz, wie gezeigt, nahezu unverändert bleibt, als sinnvoll erweisen. Durch den Einsatz anderer Chemotherapeutika, die eine Reduktion der Rezeptorexpression bewirken, würde man möglicherweise die Option einer CXCR4-gerichteten Therapie verlieren (Lapa et al., 2016). Auf Basis der ersten Daten wurde eine von der Deutschen Krebshilfe geförderte Phase I/II Studie genehmigt, welche das Potential der kombinierten, CXCR4-gerichteten, diagnostischen und therapeutischen Radiotracer evaluieren soll (Studiename COLPRIT).

#### 4.3.3 Immunglobuline

Die Annahme, dass radioaktiv markiertes Methionin zumindest partiell in zelluläre Proteine eingebaut wird (Jager et al., 2001), stellt die Grundlage für folgende Hypothese dar: Die überschießende Paraproteinsynthese der MM-Zellen führt zu einer erhöhten Retention des radioaktiv markierten Methionins. Dementsprechend wird eine Korrelation zwischen Höhe der Traceraufnahme und Vorhandensein von intrazellulären Ig angenommen. Dieser potentielle Zusammenhang konnte jedoch in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass ein größerer Anteil an Methionin zellulär aufgenommen wird als letztlich der Proteinsynthese zugeführt wird (Jager et al., 2001). Weiterhin wäre es möglich, dass sich im Rahmen der Proteasominhibition mehr Immunglobuline in der Zelle anstauen und somit zwar weniger Aminosäure aufgenommen wird, insgesamt aber vermehrt Ig vorliegt. Zudem wurde in den vorliegenden Versuchen, im Rahmen der intrazellulären Färbungen, die Sekretion von IgG durch die Zelle (M-Protein) nicht näher betrachtet. In der Betrachtung von  $^{18}\text{F}$ -

FDG konnte eine höhere Aufnahme des Tracers mit einer erhöhten Ig Expression tendenziell dargestellt werden.

#### 4.3.4 Proliferation

Die hohe Zellproliferation stellt ein generelles Kennzeichen der Malignomaktivität dar. Die Plasmazellen des MM zeigen indessen häufig und insbesondere in den Vorläuferstadien einen geringen Proliferationsindex (Matsui et al., 2004). Dennoch geht eine hohe Proliferationsrate mit einer erhöhten Aggressivität und einem erhöhten Stadium einher und ist Teil der Diagnosekriterien und der Stadieneinteilung (Rajkumar, 2016a). Das Ausmaß der Veränderungen in der  $^{11}\text{C}$ -MET Traceraufnahme nach Cz Behandlung konnte nicht mit der Abnahme der Proliferation in Zusammenhang gebracht werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Proliferation zu früh evaluiert wurde, sodass eventuell zunächst eine Reduktion der Tracerspeicherung und erst dann eine geminderte Proliferation evident waren. Auch für  $^{18}\text{F}$ -FDG zeigt sich hierzu keine Tendenz.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche ließ sich keine Verbindung hinsichtlich der untersuchten Marker mit der Aufnahme von radioaktiv markiertem Methionin herstellen, um Tumorbilologie und MM Heterogenität darzustellen.  $^{18}\text{F}$ -FDG hingegen zeigte potenzielle Zusammenhänge zur Immunglobulin-CXCR4- und CD138 Expression sowie deren Abnahme nach Behandlung. Somit liegt die Möglichkeit der  $^{18}\text{F}$ -FDG Anwendung sowohl in der Reflektion des Krankheitsgeschehens als auch in der Bewertung des Therapieansprechens. Damit zeigen, zumindest in Hinblick auf die untersuchten Biomarker, die Ergebnisse dieser Arbeit eine Überlegenheit des Glukoseanalogons gegenüber  $^{11}\text{C}$ -MET.

In der klinischen Studie von Lapa et al. von 2016 zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen detektierten Herden in der  $^{11}\text{C}$ -MET-PET noch in der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET und dem Vorhandensein beziehungsweise dem Ausmaß des M-Proteins sowie der freien Leichtketten (Lapa et al., 2016). Jedoch wurde ein Zusammenhang zwischen anderen Markern und der  $^{11}\text{C}$ -MET Speicherung beobachtet. Die bildmorphologische  $^{11}\text{C}$ -MET Aufnahme im Darmbein korrelierte stark mit dem Ausmaß der mittels Knochenmarkpunktion untersuchten malignen Plasmazellinfiltration. Demnach zeigt die

Traceraufnahme eine hohe Korrelation zur Knochenmarkbeteiligung und damit zur Tumorlast und übertrifft hierbei  $^{18}\text{F}$ -FDG (Lapa et al., 2017). Somit weisen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten eine Diskrepanz zur klinischen Studie auf, wenn man von CD138 zur Tumorlast extrapoliert. Weitere Versuche sind dennoch notwendig um mögliche Biomarker zur individualisierten Risikobewertung heranzuziehen und darauf basierend eine Therapieinitiierung und eine Überwachung des Therapieansprechens mittels PET/CT durchzuführen.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die radioaktiv markierte Aminosäure Methionin eine deutlich höhere Retention in unbehandelten MM Zellen aufweist.  $^{11}\text{C}$ -MET hat somit möglicherweise das Potential, durch die höhere Sensitivität für die Detektion von Myelommanifestationen, zu einem früheren Zeitpunkt die Konversion von einem SMM in ein MM zu diagnostizieren und eine bessere Beurteilung eines Krankheitsprogresses zu ermöglichen. Dadurch besteht wiederum die Chance zu einem früheren Zeitpunkt die Therapie einzuleiten. Weitere Studien sind notwendig um zu prüfen, ob eine Identifikation von Patienten am Übergang von asymptomatischen Vorstufen zu frühen therapieempfindlichen Formen des MM möglich ist. So könnte  $^{11}\text{C}$ -MET ggf. neben laborchemischen Markern und der MRT in die Definition des Hochrisiko SMM eingebunden werden. Ebenso sollte der Nutzen von  $^{11}\text{C}$ -MET in der Bildgebung beim solitären Plasmozytom weiter untersucht werden. Ein wesentlicher Anteil der Patienten mit Plasmozytom entwickelt innerhalb von zwei Jahren nach Radiotherapie ein MM.  $^{11}\text{C}$ -MET könnte dazu beitragen, viable Läsionen zu erkennen und diesen Patienten frühzeitig eine systemische Therapie zu verabreichen. Des Weiteren führt die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Cz in allen verwendeten Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der  $^{11}\text{C}$ -MET-Aufnahme. Eine größere Differenz zwischen prä- und posttherapeutischer Radiotracerretention könnte ein bedeutsames prognostisches Kriterium darstellen, falls damit eine zuverlässige Beurteilung der Krankheitsaktivität bzw. der Wirksamkeit der verabreichten Therapie möglich sein sollte.

Während die bessere Detektion von MM Läsionen mittlerweile in klinischen Studien gezeigt werden konnte, steht die Untersuchung des möglichen Nutzens für das

Therapiemonitoring noch aus. Jedoch ist diese bereits geplant und angelaufen. Ebenso ist derzeit eine weitere Studie in Planung, in der Läsionen mit differentem  $^{11}\text{C}$ -MET/ $^{18}\text{F}$ -FDG Speicherverhalten gezielt biopsiert werden sollen. Möglicherweise kann dadurch die Frage beantwortet werden, wie sich diese Myelommanifestationen metabolisch und biologisch voneinander unterscheiden.

CD138 und CXCR4 sind wichtige Marker der MM-Pathologie und könnten in Zukunft eine Rolle in Diagnostik und Therapie des MM spielen. Diese zwei Faktoren bilden mögliche Angriffspunkte für individualisierte Therapieoptionen beim MM. Mit der Einführung von radioaktiv markierten Antikörpern, zum Beispiel einem Anti-CD138-Antikörper (Cherel et al., 2013; Rousseau et al., 2012) oder Radiotraceren wie dem CXCR-4 Liganden  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor (Kuhne et al., 2013; Lapa et al., 2017; Philipp-Abbrederis et al., 2015; Wester et al., 2015) könnte der Nutzen für patientenspezifische Therapiekonzepte evaluiert werden. Es bietet sich zudem die Möglichkeit diese Biomarker neben der Diagnostik auch als therapeutischen Angriffspunkt zu verwenden (COLPRIT Studie, siehe oben). Hierfür ist es von Vorteil, dass die CXCR4-Expression der Myelomzellen nicht maßgeblich beeinflusst, was in dieser Arbeit nachgewiesen wurde.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit sind Teil einer präklinischen Versuchsreihe der Arbeitsgruppe von Dr. Katharina Lückerath, welche die Grundlage für die folgenden Versuche am Mausmodell und anschließend für die klinische Anwendung am Menschen bildeten (Lapa et al., 2016; Luckerath et al., 2015). Dabei wurde bestätigt, dass die  $^{11}\text{C}$ -MET Bildgebung besser als  $^{18}\text{F}$ -FDG dafür geeignet ist, sowohl die intra- als auch die extramedulläre Tumormasse darzustellen. In Kooperation mit einer Arbeitsgruppe aus Navarra, Spanien konnten kürzlich  $^{18}\text{F}$ -FDG-negative, viable Myelommanifestationen histologisch gesichert werden, welche zuvor mittels  $^{11}\text{C}$ -MET PET nachgewiesen wurden.

## 5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine hämatologische Erkrankung, die durch die Proliferation von Plasmazellen und – in der Regel – durch die Produktion von Antikörpern oder deren Leichtketten gekennzeichnet ist. Eine frühe Diagnosestellung und Detektion sowohl von intra- als auch extramedullären Manifestationen ist für die Einleitung einer effektiven Therapie von entscheidender Bedeutung. So kann zum Beispiel ein rechtzeitiger Therapiebeginn der Entstehung von Endorganschäden vorbeugen oder diese deutlich verzögern. Ebenso bedeutsam ist ein wirksames Therapiemonitoring. Wichtige diagnostische Modalitäten sind bei beiden Fragestellungen tomografische, bildgebende Verfahren. So wurde die Effektivität der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT im Rahmen der Diagnose, des Stagings und der Prognoseabschätzung bereits nachgewiesen. Dennoch ist ihr klinischer Nutzen durch die niedrige Detektionsrate bei diffusem Knochenmarksbefall und die Detektion falsch positiver Befunde, u.a. im Rahmen entzündlicher Prozesse, limitiert.

Die vorliegende Arbeit hat untersucht, ob der aminosäurebasierte Tracer  $^{11}\text{C}$ -MET über spezifische Eigenschaften verfügt, die eine höhere Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Myelomzellen ermöglichen und ob der Radioligand hierbei dem etablierten Glukoseanalogon  $^{18}\text{F}$ -FDG überlegen ist.

Hierfür wurden drei etablierte humane Myelomzelllinien sowohl nativ als auch nach 48-stündiger Therapie mit dem Proteasominhibitor Cz mit  $^{18}\text{F}$ -FDG und  $^{11}\text{C}$ -MET inkubiert und mithilfe eines Gammastrahlungszählers beurteilt. Zudem wurde untersucht, ob die Traceraufnahme mit spezifischen Charakteristika der Tumorbiologie korreliert. So wurde die Oberflächenexpression von CD138 und CXCR4, die intrazelluläre Expression der Leichtketten  $\kappa/\lambda$  und die Proliferation der Zelllinien mittels Durchflusszytometrie vor und nach Cz-Behandlung eruiert.

Die unbehandelten Zellen zeigten, verglichen zu  $^{18}\text{F}$ -FDG, bereits nach kürzester Inkubationsdauer eine 3-3,5-fach höhere  $^{11}\text{C}$ -MET Retention. Weiterhin zeigte sich die  $^{11}\text{C}$ -MET-Aufnahme nach Behandlung aller Zellreihen mit Cz insgesamt marginal höher als die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme, während die Reduktion der  $^{11}\text{C}$ -MET-Anreicherung im prä- zu posttherapeutischen Vergleich für alle drei Zelllinien signifikant war.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liefert die Myelombiologie: eine erhöhte Aufnahme der radioaktiv markierten Aminosäure durch MM-Zellen könnte durch eine Zunahme der Zellproliferation und insbesondere durch eine Steigerung der

Proteinsynthese im Rahmen der überschießenden Produktion von M-Protein bedingt sein. Für den klinischen Einsatz bietet die – verglichen zu  $^{18}\text{F}$ -FDG – größere Differenz der  $^{11}\text{C}$ -MET-Retention zwischen prä- und posttherapeutischer Messung die Möglichkeit einer besseren Beurteilbarkeit des Therapieansprechens. Bei  $^{18}\text{F}$ -FDG zeigte sich eine Tendenz zwischen Tracerverhalten und Abnahme der Oberflächenmarker CD138 und CXCR4 sowie der Ig-Produktion vor und nach Behandlung mit Cz, welche die Tumoraktivität darstellen und somit durch diesen Tracer beurteilt werden könnten. Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Biomarkern und der  $^{11}\text{C}$ -MET Retention bzw. deren Abnahme nach Behandlung konnte jedoch nicht gezeigt werden. Somit sollten für  $^{11}\text{C}$ -MET andere Biomarker herangezogen werden um diese mit der Bildgebung zu korrelieren und zu bewerten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alsayed, Y., Ngo, H., Runnels, J., Leleu, X., Singha, U. K., Pitsillides, C. M., Ghobrial, I. M. (2007). Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*, *109*(7), 2708-2717.
- Bao, L., Lai, Y., Liu, Y., Qin, Y., Zhao, X., Lu, X., Huang, X. (2013). CXCR4 is a good survival prognostic indicator in multiple myeloma patients. *Leuk Res*, *37*(9), 1083-1088.
- Barille, S., Bataille, R., Amiot, M. (2000). The role of interleukin-6 and interleukin-6/interleukin-6 receptor-alpha complex in the pathogenesis of multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw*, *11*(4), 546-551.
- Bartel, T. B., Haessler, J., Brown, T. L., Shaughnessy, J. D., Jr., van Rhee, F., Anaissie, E., Barlogie, B. (2009). F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood*, *114*(10), 2068-2076.
- Bredella, M. A., Steinbach, L., Caputo, G., Segall, G., Hawkins, R. (2005). Value of FDG PET in the assessment of patients with multiple myeloma. *AJR Am J Roentgenol*, *184*(4), 1199-1204.
- Brown, L. M., Gridley, G., Check, D., Landgren, O. (2008). Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*, *111*(7), 3388-3394.
- Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., Bernand, S., Baum, W., Gramatzki, M. (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.
- Caers, J., Withofs, N., Hillengass, J., Simoni, P., Zamagni, E., Hustinx, R., Beguin, Y. (2014). The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica*, *99*(4), 629-637.
- Cherel, M., Gouard, S., Gaschet, J., Sai-Maurel, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Davodeau, F. (2013). 213Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J Nucl Med*, *54*(9), 1597-1604.
- Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. (2003). *Br J Haematol*, *121*(5), 749-757.
- Dankerl, A., Liebisch, P., Glatting, G., Friesen, C., Blumstein, N. M., Kocot, D., Reske, S. N. (2007). Multiple Myeloma: Molecular Imaging with 11C-Methionine PET/CT--Initial Experience. *Radiology*, *242*(2), 498-508.
- Demo, S. D., Kirk, C. J., Aujay, M. A., Buchholz, T. J., Dajee, M., Ho, M. N., Bennett, M. K. (2007). Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Res*, *67*(13), 6383-6391.
- Derlin, T., Bannas, P. (2014). Imaging of multiple myeloma: Current concepts. *World J Orthop*, *5*(3), 272-282.

- Dimopoulos, M., Terpos, E., Comenzo, R. L., Tosi, P., Beksac, M., Sezer, O., Durie, B. G. (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.
- Dispenzieri, A., Stewart, A. K., Chanan-Khan, A., Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Fonseca, R., Kumar, S. K. (2013). Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? *Blood*, 122(26), 4172-4181.
- Domanska, U. M., Kruizinga, R. C., Nagengast, W. B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E. G., Walenkamp, A. M. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*, 49(1), 219-230.
- 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.
- Durie, B. G., Waxman, A. D., D'Agnolo, A., Williams, C. M. (2002). Whole-body (18)F-FDG PET identifies high-risk myeloma. *J Nucl Med*, 43(11), 1457-1463.
- Dutoit, J. C., Vanderkerken, M. A., Verstraete, K. L. (2013). Value of whole body MRI and dynamic contrast enhanced MRI in the diagnosis, follow-up and evaluation of disease activity and extent in multiple myeloma. *Eur J Radiol*, 82(9), 1444-1452.
- Edelstyn, G. A., Gillespie, P. J., Grebbell, F. S. (1967). The radiological demonstration of osseous metastases. Experimental observations. *Clin Radiol*, 18(2), 158-162.
- Engelhardt, M., Terpos, E., Kleber, M., Gay, F., Wasch, R., Morgan, G., Palumbo, A. (2014). European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 99(2), 232-242.
- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., Knop, S. (2016). The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int*, 113(27-28), 470-476.
- Gomzina, N. A., Kuznetsova, O. F. (2011). [L-[methyl-(11C)]-methionine of high enantiomeric purity production via on-line 11C-methylation of L-homocysteine thiolactone hydrochloride]. *Bioorg Khim*, 37(2), 216-222.
- Greenstein, S., Krett, N.L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Rosen, S. T. (2003). Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol*, 31(4), 271-282.
- Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Blade, J., Westin, J. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23(15), 3412-3420.
- Hammerton, K., Cooper, D. A., Duckett, M., Penny, R. (1978). Biosynthesis of immunoglobulin in human immunoproliferative diseases. I. Kinetics of synthesis and secretion of immunoglobulin and protein by bone marrow cells in myeloma. *J Immunol*, 121(2), 409-417.
- Healy, C. F., Murray, J. G., Eustace, S. J., Madewell, J., O'Gorman, P. J., O'Sullivan, P. (2011). Multiple myeloma: a review of imaging features and radiological techniques. *Bone Marrow Res*, 2011, 583439.

- Herndon, T. M., Deisseroth, A., Kaminskas, E., Kane, R. C., Koti, K. M., Rothmann, M. D., Pazdur, R. (2013). U.S. Food and Drug Administration Approval: Carfilzomib for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 19(17), 4559-4563.
- Herneth, A. M., Friedrich, K., Weidekamm, C., Schibany, N., Krestan, C., Czerny, C., Kainberger, F. (2005). Diffusion weighted imaging of bone marrow pathologies. *Eur J Radiol*, 55(1), 74-83.
- Herrmann, K., Schottelius, M., Lapa, C., Osl, T., Poschenrieder, A., Hanscheid, H., Knop, S. (2016). First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *J Nucl Med*, 57(2), 248-251.
- Jager, P. L., Vaalburg, W., Pruim, 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.
- Juweid, M. E., Cheson, B. D. (2006). Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N Engl J Med*, 354(5), 496-507.
- 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.
- Kisselev, A. F., Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, 8(8), 739-758.
- Kuehl, W. M., Bergsagel, P. L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*, 122(10), 3456-3463.
- Kuhne, M. R., Mulvey, T., Belanger, B., Chen, S., Pan, C., Chong, C., Cardarelli, P. M. (2013). BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, 19(2), 357-366.
- Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Buadi, F. K., Pandey, S., Rajkumar, S. V. (2014). Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 28(5), 1122-1128.
- Kyle, R. A., Durie, B. G., Rajkumar, S. V., Landgren, O., Blade, J., Merlini, G., Boccadoro, M. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*, 24(6), 1121-1127.
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78(1), 21-33.
- Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. (2007). Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20(4), 637-664.
- Kyle, R. A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M., Rajkumar, S. V. (2007). Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*, 356(25), 2582-2590.

- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., Offord, J. R., Melton, L. J., 3rd. (2006). Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354(13), 1362-1369.
- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Rajkumar, S. V. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22), 5412-5417.
- 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., Garcia-Velloso, M. J., Luckerath, K., Samnick, S., Schreder, M., Otero, P. R., Kortum, K. M. (2017). 11C-Methionine-PET in Multiple Myeloma: A Combined Study from Two Different Institutions. *Theranostics*, 7(11), 2956-2964.
- Lapa, C., Knop, S., Schreder, M., Rudelius, M., Knott, M., Jorg, G., Luckerath, K. (2016). 11C-Methionine-PET in Multiple Myeloma: Correlation with Clinical Parameters and Bone Marrow Involvement. *Theranostics*, 6(2), 254-261.
- Lapa, C., Luckerath, K., Malzahn, U., Samnick, S., Einsele, H., Buck, A. K., Knop, S. (2014). 18 FDG-PET/CT for prognostic stratification of patients with multiple myeloma relapse after stem cell transplantation. *Oncotarget*, 5(17), 7381-7391.
- Lapa, C., Luckerath, K., Rudelius, M., Schmid, J. S., Schoene, A., Schirbel, A., Herrmann, K. (2016). [68Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer--initial experience. *Oncotarget*, 7(8), 9288-9295.
- Lapa, C., Schreder, M., Schirbel, A., Samnick, S., Kortum, K. M., Herrmann, K., Luckerath, K. (2017). [68Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [18F]FDG and laboratory values. *Theranostics*, 7(1), 205-212.
- López-Corral, L., Gutiérrez, N. C., Vidriales, M. B., Mateos, M. V., Rasillo, A., García-Sanz, R., San Miguel, J. F. (2011). The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells. *Clinical Cancer Research*, 17(7), 1692-1700.
- Luckerath, K., Lapa, C., Albert, C., Herrmann, K., Jorg, G., Samnick, 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.
- Luckerath, K., Lapa, C., Spahmann, A., Jorg, G., Samnick, S., Rosenwald, A., Buck, A. K. (2013). Targeting paraprotein biosynthesis for non-invasive characterization of myeloma biology. *PLoS ONE*, 8(12), e84840.
- Lutje, S., de Rooy, J. W., Croockewit, S., Koedam, E., Oyen, W. J., Raymakers, R. A. (2009). Role of radiography, MRI and FDG-PET/CT in diagnosing, staging and therapeutical evaluation of patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*, 88(12), 1161-1168.
- Lütje, S., de Rooy, J. W. J., Croockewit, S., Koedam, E., Oyen, W. J. G., Raymakers, R. A. (2009). Role of radiography, MRI and FDG-PET/CT in diagnosing, staging and therapeutical evaluation of patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*, 88(12), 1161.

- Magrangeas, F., Nasser, V., Avet-Loiseau, H., Loriaud, B., Decaux, O., Granjeaud, S., Minvielle, S. (2003). Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood*, *101*(12), 4998-5006.
- Mahnken, A. H., Wildberger, J. E., Gehbauer, G., Schmitz-Rode, T., Blaum, M., Fabry, U., Günther, R. W. (2002). Multidetector CT of the Spine in Multiple Myeloma: Comparison with MR Imaging and Radiography. *American Journal of Roentgenology*, *178*(6), 1429-1436.
- Matsui, W., Huff, C. A., Wang, Q., Malehorn, M. T., Barber, J., Tanhehco, Y., Jones, R. J. (2004). Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, *103*(6), 2332-2336.
- Mesguich, C., Fardanesh, R., Tanenbaum, L., Chari, A., Jagannath, S., Kostakoglu, L. (2014). State of the art imaging of multiple myeloma: comparative review of FDG PET/CT imaging in various clinical settings. *Eur J Radiol*, *83*(12), 2203-2223.
- Mesguich, C., Zanotti-Fregonara, P., Hindie, E. (2016). New Perspectives Offered by Nuclear Medicine for the Imaging and Therapy of Multiple Myeloma. *Theranostics*, *6*(2), 287-290.
- Messiou, C., Kaiser, M. (2015). Whole body diffusion weighted MRI – a new view of myeloma. *Br J Haematol*, *171*(1), 29-37.
- Middela, S., Kanse, P. (2009). Nonsecretory multiple myeloma. *Indian Journal of Orthopaedics*, *43*(4), 408-411.
- Mihailovic, J., Goldsmith, S. J. (2015). Multiple myeloma: 18F-FDG-PET/CT and diagnostic imaging. *Semin Nucl Med*, *45*(1), 16-31.
- Mikhael, J. R., Dingli, D., Roy, V., Reeder, C. B., Buadi, F. K., Hayman, S. R., Lacy, M. Q. (2013). Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*, *88*(4), 360-376.
- Moreau, P., Joshua, D., Chng, W. J., Palumbo, A., Goldschmidt, H., Hajek, R., Dimopoulos, M. A. (2016). Impact of prior treatment on patients with relapsed multiple myeloma treated with carfilzomib and dexamethasone vs bortezomib and dexamethasone in the phase 3 ENDEAVOR study. *Leukemia*.
- Nakamoto, Y. (2014). Clinical contribution of PET/CT in myeloma: from the perspective of a radiologist. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, *14*(1), 10-11.
- Nakamoto, Y., Kurihara, K., Nishizawa, M., Yamashita, K., Nakatani, K., Kondo, T., Togashi, K. (2013). Clinical value of (1)(1)C-methionine PET/CT in patients with plasma cell malignancy: comparison with (1)(8)F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *40*(5), 708-715.
- Nanni, C., Zamagni, E., Farsad, M., Castellucci, P., Tosi, P., Cangini, D., Fanti, S. (2006). Role of 18F-FDG PET/CT in the assessment of bone involvement in newly diagnosed multiple myeloma: preliminary results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *33*(5), 525-531.
- Nanni, C., Zamagni, E., Celli, M., Caroli, P., Ambrosini, V., Tacchetti, P., Fanti, S. (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), e74-79.
- Ocio, E. M., Richardson, P. G., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Mateos, M. V., Orłowski, R., Miguel, J. F. (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.
- Okasaki, M., Kubota, K., Minamimoto, R., Miyata, Y., Morooka, M., Ito, K., Miwa, A. (2015). Comparison of (11)C-4'-thiothymidine, (11)C-methionine, and (18)F-FDG PET/CT for the detection of active lesions of multiple myeloma. *Ann Nucl Med*, 29(3), 224-232.
- 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.
- Palumbo, A., Anderson, K. (2011). Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 364(11), 1046-1060.
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Moreau, P. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33(26), 2863-2869.
- Perez-Persona, E., Vidriales, M. B., Mateo, G., Garcia-Sanz, R., Mateos, M. V., de Coca, A. G., San Miguel, J. F. (2007). New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110(7), 2586-2592.
- Phekoo, K. J., Schey, S. A., Richards, M. A., Bevan, D. H., Bell, S., Gillett, D., Moller, H. (2004). A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK. *Br J Haematol*, 127(3), 299-304.
- Philipp-Abbrederis, K., Herrmann, K., Knop, S., Schottelius, M., Eiber, M., Luckerath, K., Keller, U. (2015). In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma. *EMBO Mol Med*, 7(4), 477-487.
- Plathow, C., Weber, W. A. (2008). Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med*, 49 Suppl 2, 43s-63s.
- Prideaux, S. M., Conway O'Brien, E., Chevassut, T. J. (2014). The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*, 2014, 864058.
- Rajkumar, S. V. (2016a). Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 91(7), 719-734.
- Rajkumar, S. V. (2016b). Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol*, 91(1), 90-100.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538-e548.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Miguel, J. F. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12), e538-548. doi:10.1016/s1470-2045(14)70442-5
- Rajkumar, S. V., Kumar, S. (2016). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 91(1), 101-119.
- Rajkumar, S. V., Merlini, G., San Miguel, J. F. (2012). Haematological cancer: Redefining myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(9), 494-496.

- Regelink, J. C., Minnema, M. C., Terpos, E., Kamphuis, M. H., Raijmakers, P. G., Pieters-van den Bos, I. C., Zweegman, S. (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.
- Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Anderson, K. C. (2003). A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 348(26), 2609-2617.
- Rollig, C., Knop, S., & Bornhauser, M. (2015). Multiple myeloma. *Lancet*, 385(9983), 2197-2208.
- Rousseau, C., Ferrer, L., Supiot, S., Bardies, M., Davodeau, F., Faivre-Chauvet, A., Cherel, M. (2012). Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol*, 33(3), 679-688.
- Ruschak, A. M., Slassi, M., Kay, L. E., Schimmer, A. D. (2011). Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst*, 103(13), 1007-1017.
- Shammas, M. A., Koley, H., Bertheau, R. C., Neri, P., Fulciniti, M., Tassone, P., Munshi, N. C. (2008). Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Leukemia*, 22(7), 1410-1418.
- Sharma, R., Souza, M., Jaimini, A., Hazari, P., Saw, S., Pandey, S., Mondal, A. (2016). A comparison study of [11] C-methionine and [18] F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography scans in evaluation of patients with recurrent brain tumors. *Indian Journal of Nuclear Medicine*, 31(2), 93-102.
- Snozek, C. L. H., Katzmann, J. A., Kyle, R. A., Dispenzieri, A., Larson, D. R., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V. (2008). Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*, 22(10), 1933-1937.
- Steele, J. M. (2013). Carfilzomib: A new proteasome inhibitor for relapsed or refractory multiple myeloma. *J Oncol Pharm Pract*, 19(4), 348-354.
- Stewart, A. K., Bergsagel, P. L., Greipp, P. R., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Hayman, S. R., Fonseca, R. (2007). A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia*, 21(3), 529-534.
- Terpos, E., Moulopoulos, L. A., Dimopoulos, M. A. (2011). Advances in imaging and the management of myeloma bone disease. *J Clin Oncol*, 29(14), 1907-1915.
- Terpos, E., Moulopoulos, L. A., Dimopoulos, M. A. (2011). Advances in Imaging and the Management of Myeloma Bone Disease. *Journal of Clinical Oncology*, 29(14), 1907-1915.
- Turesson, I., Kovalchik, S. A., Pfeiffer, R. M., Kristinsson, S. Y., Goldin, L. R., Drayson, M. T., Landgren, O. (2014). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*, 123(3), 338-345.
- Vij, R., Fowler, K. J., Shokeen, M. (2016). New Approaches to Molecular Imaging of Multiple Myeloma. *J Nucl Med*, 57(1), 1-4.
- Walker, R., Jones-Jackson, L., Rasmussen, E., Miceli, M., Anaissie, E., Epstein, J., Barlogie, B. (2004). Diagnostic Imaging of Multiple Myeloma - FDG PET and

- MRI Complementary for Tracking Short Vs. Long Term Tumor Response. *Blood*, 104(11), 758-758.
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148-163.
- Weinstock, M., Aljawai, Y., Morgan, E. A., Laubach, J., Gannon, M., Roccaro, A. M., Ghobrial, I. M. (2015). Incidence and clinical features of extramedullary multiple myeloma in patients who underwent stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 169(6), 851-858.
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S., Kuehl, W. M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113(22), 5418-5422.
- Wester, H. J., Keller, U., Schottelius, M., Beer, A., Philipp-Abbrederis, K., Hoffmann, F., Schwaiger, M. (2015). Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging. *Theranostics*, 5(6), 618-630.
- Zamagni, E., Nanni, C., Patriarca, F., Englaro, E., Castellucci, P., Geatti, O., Cavo, M. (2007). A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica*, 92(1), 50-55.
- Zamagni, E., Patriarca, F., Nanni, C., Zannetti, B., Englaro, E., Pezzi, A., Cavo, M. (2011). Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*, 118(23), 5989-5995.
- Zhao, H., Guo, L., Zhao, H., Zhao, J., Weng, H., Zhao, B. (2015). CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*, 6(7), 5022-5040.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Charakteristika der untersuchten humanen Myelomzelllinien.....	23
Abbildung 1	Dosis-Wirkungs-Kurven für Carfilzomib.....	24
Abbildung 2	Vergleich der Radiotraceraufnahme von unbehandelten und behandelten Zellen.....	26
Abbildung 3	CD138 Oberflächenexpression .....	29
Abbildung 4	Darstellung der Reduktion von CD138 Expression und Radiotraceraufnahme.....	30
Abbildung 5	CXCR4 Expressionslevel der MM-Zelllinien .....	31
Abbildung 6	Darstellung der Reduktion von CXCR4 Expression und Radiotraceraufnahme.....	31
Abbildung 7	Expression intrazellulärer Ig $\kappa$ und Ig $\lambda$ Leichtketten.....	32
Abbildung 8	Zusammenhang der Reduktion intrazellulärer Ig $\kappa$ - (INA-6) / Ig $\lambda$ - (MM.1S, OPM-2) Leichtketten und Radiotraceraufnahme.....	33
Abbildung 9	Darstellung der Zellproliferation .....	34
Abbildung 10	Darstellung der Reduktion von Proliferation und Radiotraceraufnahme	34

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
Bz	Bortezomib
CXCR4	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CFSE	Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester
<sup>11</sup> C-MET	[ <sup>11</sup> C-methyl]-L-Methionin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	Ereignisse pro Minute (counts per minute)
CT	Computertomographie
Cz	Carfilzomib
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum
<sup>18</sup> F-FDG	[ <sup>18</sup> F]- 2-Fluor-2-desoxy-D-glukose
FL	Fluorochrom
GeoMean	Geometrisch gemittelte Fluoreszenzaktivität
HWZ	Halbwertszeit
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IL-6	Interleukin 6
IMWG	International Myeloma Working Group
Ig	Immunglobulin
ISS	International Staging System
κ/λ	Kappa / Lambda
KM	Knochenmark
n	Anzahl
MeV	Megaelektronenvolt
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
Min.	Minuten
MM	Multiples Myelom

MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PI	Propidiumiodid
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SMM	Schwelendes Myelom (Smoldering Multiple Myeloma)

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg, Professor Dr. A. Buck, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt vor allem Dr. K. Lückerath, die mich hervorragend bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift betreute und mir in allen fachlichen und praktischen Fragen zur Seite stand. Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Frau C. Albert für die praktische Unterstützung im Labor bedanken.