

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Andreas K. Buck

Einfluss systemischer Therapeutika auf die CXCR4-Expression von Myelomzellen

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

vorgelegt von
Anna Bögelein
aus Schopfloch

Würzburg, Januar 2021

Referent: Prof. Dr. med. Andreas K. Buck

Korreferent: Prof. Dr. med. Klaus Martin Kortüm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Michael

Inhaltsverzeichnis

I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
II	TABELLENVERZEICHNIS	
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
1	EINLEITUNG	1
1.1	Multiples Myelom – eine heterogene Erkrankung	1
1.1.1	Einführung in die Erkrankung	1
1.1.2	Diagnostik des Multiplen Myeloms.....	2
1.1.3	Therapie des Multiplen Myeloms	5
1.2	CXCR4-gerichtete Theranostik beim Multiplen Myelom	7
1.2.1	Funktion und Potential von CXCR4 im Rahmen der Erkrankung.....	7
1.2.2	CXCR4-gerichtete Bildgebung beim Multiplen Myelom	8
1.2.3	CXCR4-gerichtete Therapie beim Multiplen Myelom	10
1.3	Fragestellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Ethikvotum	13
2.2	Material.....	13
2.2.1	Laborgeräte	13
2.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2.3	Reagenzien.....	14
2.2.4	Lösungen und Puffer	15
2.2.5	Zellmaterial.....	15
2.2.6	Therapeutika	17
2.2.7	Antikörper.....	18
2.2.8	Radiotracer.....	18
2.2.9	Software.....	19
2.3	Versuchsaufbau.....	19

2.4	Methoden	21
2.4.1	Zellkultur.....	21
2.4.1.1	Kulturbedingungen und -medium	21
2.4.1.2	Auftauen der Zellen	21
2.4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	21
2.4.2	Durchflusszytometrie.....	22
2.4.2.1	Hintergrund.....	22
2.4.2.2	Zellpräparation für die Dosis-Wirkungsbestimmungen mittels CFSE-Färbung	23
2.4.2.3	Zellpräparation für die Expressionsanalysen mittels CXCR4- Antikörper-Färbung.....	24
2.4.3	dSTORM-Mikroskopie	24
2.4.3.1	Hintergrund.....	24
2.4.3.2	Zellpräparation für die dSTORM-mikroskopischen Analysen	25
2.4.4	Uptake-Versuche	26
2.4.4.1	Hintergrund.....	26
2.4.4.2	Zellpräparation für die Uptake-Versuche.....	26
2.4.5	Graphische und statistische Auswertung	27
3	ERGEBNISSE.....	28
3.1	Heterogenität in der basalen CXCR4-Expression.....	28
3.1.1	CXCR4-Oberflächenexpression verschiedener MM-Zelllinien.....	28
3.1.2	CXCR4-Oberflächenexpression primärer MM-Zellen.....	28
3.2	Effekte von Monotherapieregimen in MM-Zellen	30
3.2.1	Proliferationsreduktion durch Monotherapieregime <i>in vitro</i>	30
3.2.2	Zeitabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4- Oberflächenexpression.....	35
3.2.3	Substanzabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4- Oberflächenexpression von MM-Zelllinien	38
3.2.4	Substanzabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4- Oberflächenexpression von primären MM-Zellen	43
3.3	Effekte von Kombinationstherapieregimen in MM-Zellen.....	45
3.3.1	Proliferationsreduktion durch Kombinationstherapieregime <i>in vitro</i> ...	45

3.3.2	Kombinationsabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression.....	47
3.4	Effekte der MM-Therapeutika auf das <i>in vitro</i> Uptake-Verhalten.....	49
3.4.1	[¹⁸ F]FDG-Uptake.....	49
3.4.2	[⁶⁸ Ga]Pentixafor-Uptake.....	50
4	DISKUSSION.....	52
4.1	Heterogenität der CXCR4-Oberflächenexpression – Identifikation von Einflussfaktoren	52
4.1.1	Hintergründe und Herausforderungen.....	52
4.1.2	Inkubationsdauer als Einflussfaktor der therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen.....	53
4.1.3	Substanz- und Dosisabhängigkeit der therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen.....	54
4.1.4	Einfluss von Kombinationstherapieregimen auf die CXCR4-Oberflächenexpression.....	58
4.2	Funktionalität der therapieinduzierten CXCR4-Oberflächen-expressionsänderungen	59
4.2.1	Korrelation zwischen Expressionsanalysen und Uptake-Versuchen... ..	59
4.2.2	Evaluation der eingesetzten Methoden	61
4.3	Fazit und Ausblick.....	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	66
7	ANHANG.....	73
7.1	Ergänzende Abbildungen.....	73
7.2	Ergänzende Tabellen.....	75
7.3	Urheberrechtliche Genehmigung	82

DANKSAGUNG

KONGRESSTEILNAHMEN UND VERÖFFENTLICHUNGEN

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Initiation und Progression der Myelomerkrankung.....	2
Abbildung 2: Initialtherapie der Myelomerkrankung.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der CXCR4-vermittelten Effekte in einer MM-Zelle.....	7
Abbildung 4: Interindividuelle Heterogenität der CXCR4-Oberflächenexpression bei MM-Patienten.....	9
Abbildung 5: Chemotherapie-induzierte CXCR4-Herabregulation bei einem Patienten mit fortgeschrittener Myelomerkrankung	11
Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von MM- Therapeutika auf die CXCR4-Expression von MM-Zellen.....	19
Abbildung 7: Auswertungsinstrumente der Durchflusszytometrie.....	23
Abbildung 8: Basale CXCR4-Oberflächenexpression verschiedener MM-Zelllinien ..	28
Abbildung 9: Basale CXCR4-Oberflächenexpression primärer MM-Zellen.....	29
Abbildung 10: Intraindividuelle Heterogenität der basalen CXCR4-Oberflächen- expression	30
Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven der OPM-2-Zelllinie für Monotherapieregime....	31
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der INA-6-Zelllinie für Monotherapieregime.....	32
Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurven der AMO-1-Zelllinie für Monotherapieregime....	33
Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurven der MM1.S-Zelllinie für Monotherapieregime....	34
Abbildung 15: Einfluss von Bortezomib auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf	35
Abbildung 16: Einfluss von Cyclophosphamid auf die CXCR4-Expression von OPM-2- Zellen im Zeitverlauf.....	36
Abbildung 17: Einfluss von Dexamethason auf die CXCR4-Expression von OPM-2- Zellen im Zeitverlauf.....	36
Abbildung 18: Einfluss von Doxorubicin auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf	37
Abbildung 19: Einfluss von Lenalidomid auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf	38
Abbildung 20: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von OPM-2- Zellen	39
Abbildung 21: Einfluss von Doxorubicin auf die Zellgröße im Zeitverlauf.....	40

Abbildung 22: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen	41
Abbildung 23: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von AMO-1-Zellen	42
Abbildung 24: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von MM1.S-Zellen	42
Abbildung 25: Einfluss von Bortezomib auf die CXCR4-Expression von primären MM-Zellen	44
Abbildung 26: dSTORM-mikroskopische Analyse der CXCR4-Expression behandelter primärer MM-Zellen.....	45
Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven der OPM-2-Zelllinie für Kombinationstherapie-regime.....	46
Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven der INA-6-Zelllinie für Kombinationstherapie-regime.....	47
Abbildung 29: Einfluss von Kombinationstherapie-regimen auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen.....	48
Abbildung 30: Einfluss von Kombinationstherapie-regimen auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen	49
Abbildung 31: Einfluss von MM-Therapeutika auf die [¹⁸ F]FDG-Aufnahme von OPM-2-Zellen	50
Abbildung 32: Einfluss von MM-Therapeutika auf die [⁶⁸ Ga]Pentixafor-Bindung von OPM-2-Zellen.....	51

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Säulen der Myelomdiagnostik.....	2
Tabelle 2: Laborgeräte	13
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 4: Reagenzien	14
Tabelle 5: Lösungen und Puffer	15
Tabelle 6: Charakteristika der eingesetzten Zelllinien.....	15
Tabelle 7: Eingesetzte MM-Therapeutika	17
Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie	18
Tabelle 9: Radiotracer.....	18
Tabelle 10: Software	19
Tabelle 11: Getestete Konzentrationsbereiche je Therapieregime und Zelllinie	20
Tabelle 12: IC ₅₀ -Werte der MM-Therapeutika für die verschiedenen Zelllinien.....	34
Tabelle 13: dSTORM-mikroskopische Analyse der CXCR4-Expression von behandelten OPM-2-Zellen.....	40
Tabelle 14: Zusammenfassung der durch die Monotherapieregime hervorgerufenen Effekte auf die CXCR4-Expression	43

III Abkürzungsverzeichnis

ASZT	Autologe Stammzelltransplantation
ATCC	American type culture collection
Borte	Bortezomib
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carbofluoreszein-Succinimidyl-Ester
CPM	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CT	Computertomographie
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cyclo	Cyclophosphamid
Dexa	Dexamethason
dexa-BEAM	Dexamethason, Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doxo	Doxorubicin
DPBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dSTORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
ECL	Extrazelluläre Schlaufe (extracellular loop)
EMD	Extramedulläre Erkrankung (extramedullary disease)
ERT	Endoradiotherapie
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FDG	Fluordesoxyglukose
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
IC ₅₀	Konzentration, die mit einer 50 %-igen Proliferationsreduktion assoziiert ist
ICL	Intrazelluläre Schlaufe (intracellular loop)
Ig	Immunglobulin
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL-6	Interleukin 6

IMiD	Immunmodulatorische Substanz (immunomodulatory imide drug)
ISS	Internationales Staging-System
LDH	Lactatdehydrogenase
Lena	Lenalidomid
MFI	Geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität (mean fluorescent intensity)
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiplres Myelom
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der repetitiven Versuchsdurchführungen
n.s.	Nicht signifikant
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (single photon emission computed tomography)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VZ	Verdopplungszeit

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom – eine heterogene Erkrankung

1.1.1 Einführung in die Erkrankung

Die Fortschritte in der Medizin der letzten Jahre und Jahrzehnte ermöglichen inzwischen die Heilung einer Vielzahl von Krankheiten. Das Multiple Myelom (MM) stellt eine Erkrankung dar, für die dies bislang noch nicht gelungen ist. Es gilt weiterhin als unheilbar [1]. Als Neoplasie des blutbildenden Systems zeichnet sich das MM durch eine multifokale Vermehrung terminal differenzierter B-Zellen (Plasmazellen) im Knochenmark aus, die aufgrund ihrer malignen Transformation in großen Mengen abnorme, monoklonale Immunglobuline produzieren. Ätiologisch zählt es zur Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome [2].

Mit 4-6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr ist das MM nach den Leukämien die zweithäufigste maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Es macht ca. 10 % der hämatologischen und 1 % aller Krebserkrankungen aus [3], [4]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 50 % [5]. Die individuellen Überlebenszeiten nach Diagnosestellung sind allerdings sehr unterschiedlich: Einige der Patienten versterben bereits nach wenigen Monaten, während andere eine Lebenserwartung von über zehn Jahren haben [2]. Diese Daten geben bereits erste Hinweise darauf, wie heterogen die Erkrankung des MM ist.

Grundlage der Heterogenität, die sowohl auf inter- als auch intraindividuelle Ebene zum Ausdruck kommt, bildet die komplexe Pathogenese des MM (siehe Abbildung 1): Ausgehend von einer Plasmazelle, die durch primäre genetische Ereignisse immortalisiert wird, entwickelt sich die Erkrankung infolge der Akquisition weiterer genetischer Veränderungen aus einem Kontinuum von Krankheitsstadien. Hierzu zählen die asymptomatische monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das ebenfalls asymptomatische Smoldering Myelom, die dem symptomatischen MM regelhaft vorausgehen. Ist mit weiterer Krankheitsprogression die Ausbreitung der MM-Zellen nicht mehr auf das Knochenmark beschränkt, sondern zeigen sich Organmanifestationen oder eine leukämieartige Streuung der malignen Zellen im Blut, spricht man von der sog. „extramedullary disease“ (EMD) bzw. der Plasmazelleukämie [6], [7].

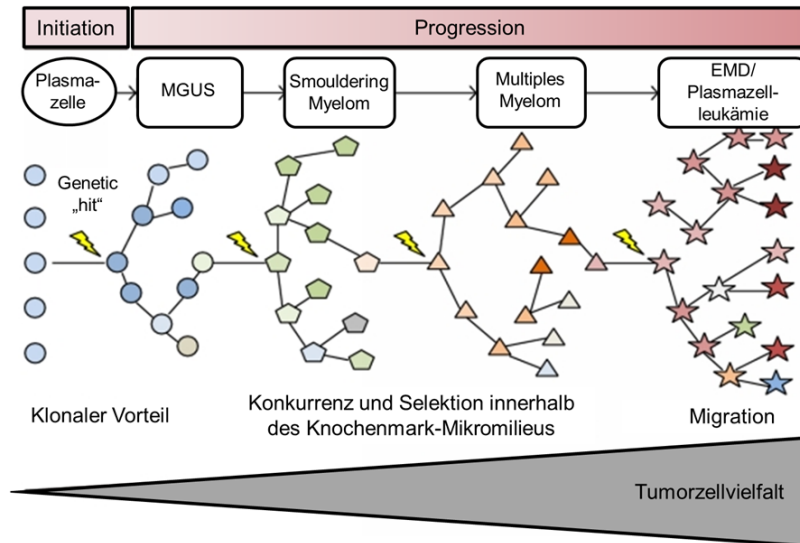


Abbildung 1: Initiation und Progression der Myelomerkrankung. Durch die Akquisition von diversen genetischen Veränderungen bilden sich verschiedene Plasmazell-Subklone, die durch Selektion im Sinne der darwinistischen Theorie die Transition zwischen den Krankheitsstadien herbeiführen. Abbildung modifiziert nach [7], Figure 1; Genehmigung liegt vor (CC BY 3.0, © 2014 Prideaux et al.).

Über die einzelnen Krankheitsstadien hinweg liegen verschiedene Plasmazell-Subklone vor. Deren Selektion aufgrund klonaler Vorteile im Sinne der darwinistischen Theorie bildet die Voraussetzung für Krankheitsprogression, Rezidive und/oder Therapieresistenzen [8]. Einen Selektionsvorteil bildet z. B. der Zugang zum schützenden Knochenmark-Mikromilieu, der durch eine erhöhte Expression des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) auf den Tumorzellen vermittelt wird [9].

1.1.2 Diagnostik des Multiplen Myeloms

Die Diagnostik des MM basiert auf vier Säulen, die in Tabelle 1 dargestellt sind: Klinik, Labordiagnostik, Knochenmarkdiagnostik und Bildgebung.

Tabelle 1: Säulen der Myelomdiagnostik. Tabelle erstellt auf Basis von [10].

Klinik	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Leitsymptome:</u> Knochenschmerzen, Fatigue, Infektneigung, Gewichtsverlust, schäumender Urin • <u>Endorganschäden nach den CRAB-Kriterien:</u> [C]: Hyperkalzämie (hypercalcemia) [R]: Niereninsuffizienz (renal disease) [A]: Anämie (anemia) [B]: Knochenläsionen (bone disease)
---------------	--

Labordiagnostik	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrolyte • Nierenretentionsparameter • Gesamteiweiß, Albumin im Serum • Serumprotein-Elektrophorese • Immunfixations-Elektrophorese im Serum & Urin • Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) im Serum, quantitativ • freie Kappa- & Lambda-Leichtketten im Serum, quantitativ • 24 h-Sammelurin • LDH, GPT • β2-Mikroglobulin im Serum
Knochenmarkdiagnostik	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirat: Zytologie, Zytogenetik, Durchflusszytometrie • Biopsie: Histologie
Bildgebung	<ul style="list-style-type: none"> • Niedrig-Dosis-CT • (konventionelles Röntgen) • MRT • [^{18}F]FDG-PET

Klinik

Die bei Anamnese und körperlicher Untersuchung erhobenen klinischen Beschwerden sind Folge der zunehmenden Ausbreitung der malignen Plasmazellen im Knochenmark sowie der massiven Immunglobulinsekretion. Im Frühstadium sind die Patienten oft asymptomatisch oder leiden unter unspezifischen Beschwerden. Hierzu zählen Knochen- und Muskelschmerzen, Erschöpfbarkeit (Fatigue), Anfälligkeit für Infektionen sowie Gewichtsverlust. Der weitere Verlauf ist geprägt von den durch den Plasmazellklon hervorgerufenen Endorganschäden. Diese sind in den sog. „CRAB“-Kriterien (hypercalcemia, renal disease, anemia, bone disease) zusammengefasst [10]. Infolge der Knochenmarkinfiltration kann es neben der Anämie auch zu einer Leuko- und/oder Thrombozytopenie kommen. Die hohe Immunglobulinkonzentration bedingt nicht nur eine Schädigung der Niere, sondern kann zudem eine periphere Polyneuropathie, ein Hyperviskositätssyndrom mit Durchblutungsstörungen sowie eine AL-Amyloidose verursachen [11]. Die bei bis zu 20 % der Patienten im Verlauf auftretende EMD führt in Abhängigkeit vom befallenen Organ zu weiteren Symptomen. Häufige Lokalisationen der EMD sind die Haut, die Leber und die Niere, grundsätzlich kann aber jedes Organ betroffen sein [12], [13].

Labordiagnostik

Zu den Standardmethoden der Labordiagnostik zählen die Serumproteinelektrophorese, die Immundefixationselektrophorese und die quantitative Bestimmung der freien Leichtketten im Serum. Sie dienen der Erfassung einer möglichen Eiweißveränderung infolge der Immunglobulinsekretion des MM. Die Erhebung weiterer Parameter wird insbesondere zur Evaluation der Endorganschäden herangezogen. Über ihre Bedeutung im Rahmen der Diagnosestellung hinaus sind die Laborparameter auch relevant für die Stadieneinteilung des MM nach dem „International Staging System“ (ISS), das drei prognostisch bedeutsame Subgruppen definiert [10], [11].

Knochenmarkdiagnostik

Die Knochenmarkuntersuchung dient der Diagnosesicherung bzw. -bestätigung [14]. Neben zytologischen und histologischen Untersuchungen ermöglicht die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) Aussagen über die Zytogenetik des Plasmazellklons und damit eine Risikostratifizierung. Prognostisch ungünstige Aberrationen sind beispielsweise die Deletion del(17p) sowie die Translokationen t(4;14) und t(14;16) [10], [15]. Mithilfe der Durchflusszytometrie gelingt anhand von myelomtypischen Oberflächenantigenen eine Identifizierung und Quantifizierung der malignen Plasmazellen innerhalb der Zellpopulationen der Knochenmarkprobe [16].

Bildgebung

Die Rolle der bildgebenden Verfahren im diagnostischen Prozess des MM besteht primär im Nachweis möglicher Osteolysen. In dieser Funktion hat die Niedrig-Dosis-Computertomographie (CT) ohne Kontrastmittel inzwischen das konventionelle Röntgen aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität weitestgehend abgelöst [17]. Zunehmend werden auch die Magnetresonanztomographie (MRT) und molekulare Bildgebungstechniken wie die [¹⁸F]Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie ([¹⁸F]FDG-PET) in der Myelomdiagnostik eingesetzt. Die Stärke dieser Verfahren liegt in der frühzeitigen Detektion der Knochenmarkinfiltration, noch bevor sich diese als Knochendestruktion in den radiologischen Verfahren darstellt. Darüber hinaus besitzen beide Modalitäten eine hohe Sensitivität für die Darstellung extramedullärer Manifestationen des MM [18].

Aussagen bezüglich der Krankheitsaktivität ermöglicht allerdings allein die [¹⁸F]FDG-PET-Untersuchung. Durch die erhöhte Aufnahme des an den Positronenstrahler Fluor-18 gekoppelten Glukoseanalogons ist es möglich, metabolisch aktive von inaktiven MM-Läsionen zu unterscheiden. In der Regel wird die PET mit einer Niedrig-Dosis-CT kombiniert. Indem mittels PET die Aktivität des Myelomherds beurteilt werden kann und in

der CT mögliche Knochendestruktionen erfasst werden, erweist sich die Hybridbildung der [^{18}F]FDG-PET/CT laut Durie et al. als ideale Methode für die Diagnostik sowie die Stadieneinteilung des MM [19]. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien die besondere Eignung der [^{18}F]FDG-PET/CT zur Abschätzung von Prognose und Therapieansprechen gezeigt werden [20], [21], [22]. Problematisch ist allerdings die fehlende Tumorspezifität von [^{18}F]FDG: Durch die Aufnahme des Radiotracers in benigne Läsionen mit erhöhtem Glukosemetabolismus wie z. B. Entzündungen und Infektionsherde kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen [23].

Ziel derzeitiger Forschung ist deshalb die Entwicklung neuer Tracer für die PET-Bildgebung des MM: Durch die Einbeziehung myelomtypischer Stoffwechsel- und Signalwege soll eine im Vergleich zu [^{18}F]FDG gesteigerte Spezifität für MM-Läsionen erreicht werden. Ein bereits in Patientenkollektiven evaluierter Tracer ist die radioaktiv markierte Aminosäure L-[Methyl- ^{11}C]Methionin, die wegen der hohen Protein-/Immunglobulinsynthese des MM als geeignet erachtet wird [24]. Ebenfalls großes Potenzial in klinischen Studien zeigte der 2015 entwickelte PET-Tracer [^{68}Ga]Pentixafor, der als hochaffiner Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4 einen auf der Oberfläche der MM-Zellen überexprimierten Rezeptor als Zielstruktur nutzt [25].

1.1.3 Therapie des Multiplen Myeloms

Aufgrund der bislang nicht möglichen Heilung ist das primäre Ziel der Myelomtherapie die rasche Krankheitskontrolle, um langfristig das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben positiv zu beeinflussen. Als Standard hat sich die Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation (ASZT) etabliert. Weitere Bestandteile dieses Hochdosiskonzepts sind die Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie mit Medikamenten aus verschiedenen Substanzgruppen [11]. Diese sind auch Bestandteil der Therapieregime für Patienten, die aufgrund von Alter und Komorbiditäten nicht für eine Stammzelltransplantation geeignet sind (siehe Abbildung 2) [10]. Dexamethason als hochwirksames Glukokortikoid ist derzeit in fast allen Therapieregimen, bei denen es sich in der Regel um Zwei- bzw. Dreifachkombinationen handelt, enthalten. Als Kombinationspartner werden klassische Chemotherapeutika wie das Alkylans Cyclophosphamid oder das Anthrazyklin Doxorubicin eingesetzt. Aber auch die sog. „neuen Substanzen“, die in den letzten Jahren zu einer signifikanten Verbesserung der Remissions- und Überlebensraten der MM-Patienten beigetragen haben, sind inzwischen fester Bestandteil der Therapie. Zu dieser

Substanzklasse zählen z. B. der Proteasom-inhibitor Bortezomib sowie der Immunmodulator (IMiD) Lenalidomid [10], [26].

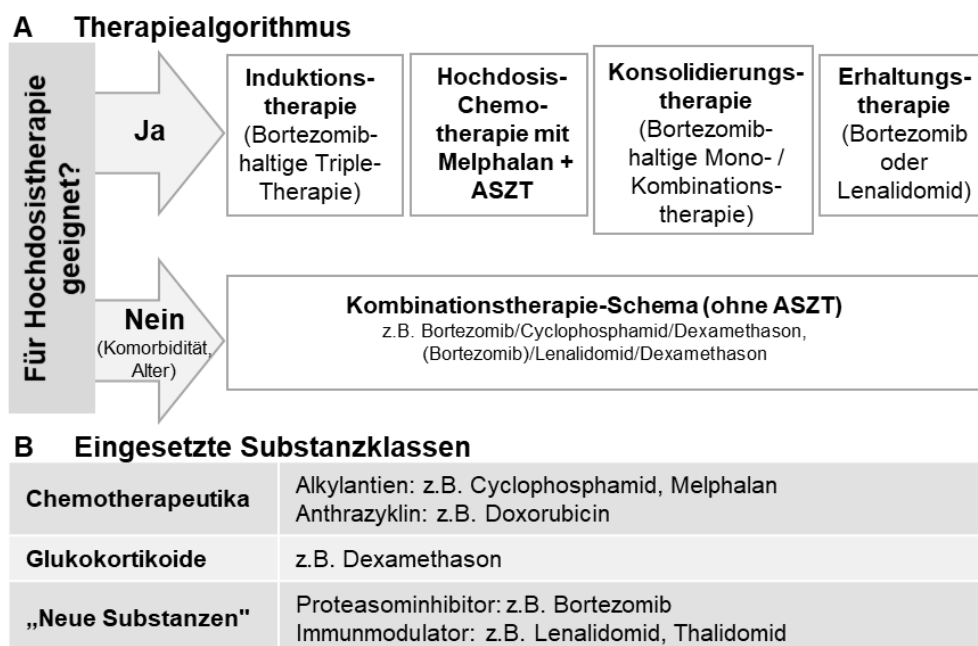


Abbildung 2: Initialtherapie der Myelomerkrankung. In Abhängigkeit von der Eignung des Patienten für eine Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation (ASZT) unterscheidet sich der Therapiealgorithmus bei Erstdiagnose (A). Die in den Therapien eingesetzten Substanzen (B) sind für beide Algorithmen gleich. Abbildung erstellt auf Basis von [10], [11].

Trotz der Fortschritte in der Initialtherapie entwickelt die Mehrheit der Patienten ein Rezidiv, das sich aggressiver und mit einem deutlich schlechteren Therapieansprechen als die Primärerkrankung präsentiert. Als eine mögliche Erklärung für diesen Verlauf gilt derzeit das im Abschnitt 1.1.1 beschriebene Vorhandensein verschiedener MM-Subklone in einem Patienten, die neben der inter- und intraindividuellen Heterogenität auch die Entwicklung einer Therapieresistenz durch Selektion bedingen können [27]. Da in diesem Krankheitsstadium auch intensiviertere Kombinationstherapien mit den „neuen Substanzen“ und wiederholte Stammzelltransplantationen nur ungenügende Ansprechraten zeigen, gilt es, neue Therapiestrategien zu finden. Der Forschungsschwerpunkt liegt dabei auf der Entwicklung von Substanzklassen, die im Sinne einer „targeted therapy“ myelom-spezifische Angriffspunkte nutzen. Großes Potenzial sieht man in den bereits in klinischen Studien getesteten Histon-Deacetylase-Inhibitoren sowie in Antikörpern gegen MM-Oberflächenstrukturen und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen und des Zellzyklus [1]. Aber auch das Tumormikromilieu und dabei insbesondere die CXCR4-CXCL12-Achse hat sich als vielversprechende therapeutische Zielstruktur herauskristallisiert [28].

1.2 CXCR4-gerichtete Theranostik beim Multiplen Myelom

1.2.1 Funktion und Potential von CXCR4 im Rahmen der Erkrankung

Neben verschiedenen anderen Tumoren sowohl solider als auch hämatologischer Art konnte auch für das MM eine vermehrte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 (CD184) nachgewiesen werden [29], [30]. Das unter physiologischen Bedingungen auf Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimierte heptahelikale Transmembranprotein aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird durch Bindung des CXC-Motiv-Chemokins 12 (CXCL12) aktiviert [31]. Abbildung 3 fasst die von CXCR4 und seinem Liganden vermittelten Effekte, die im Rahmen der Myelomerkrankung von Bedeutung sind, zusammen.

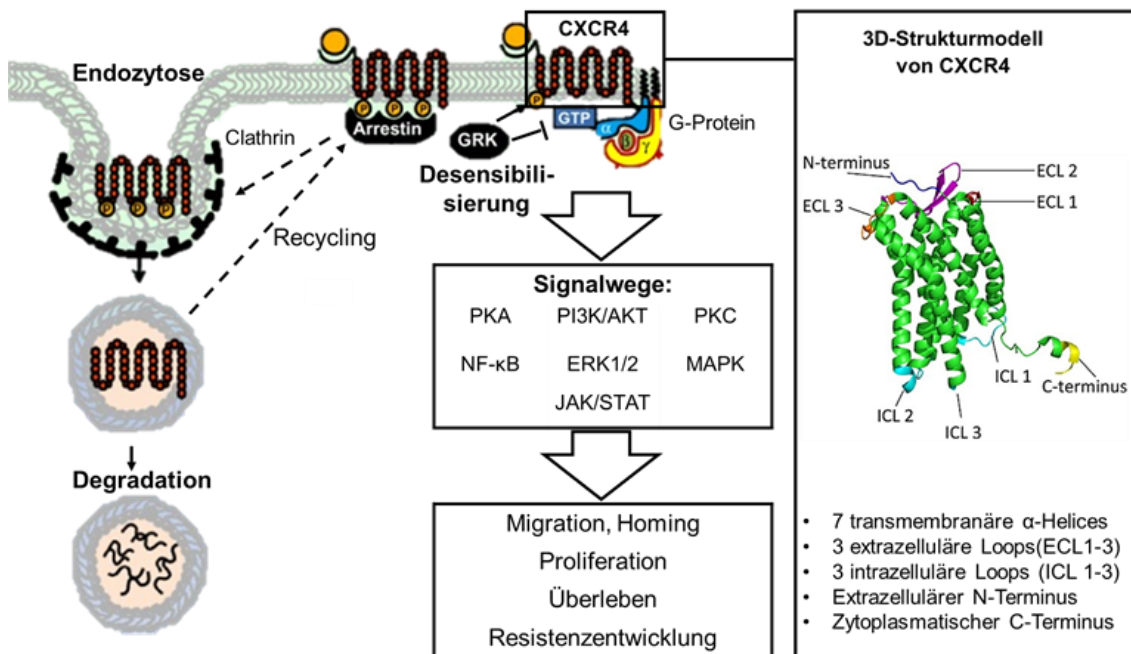


Abbildung 3: Schematische Darstellung der CXCR4-vermittelten Effekte in einer MM-Zelle. Die Bindung von CXCL12 an CXCR4 vermittelt über die Aktivierung diverser Signalwege eine Reihe von Prozessen, die für die Krankheitsprogression des MM von Bedeutung sind. Gleichzeitig mit der Ligandenbindung werden G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) aktiviert, die über Desensibilisierung, Endozytose und Degradation die Dauer des CXCR4-Signals regulieren. Abbildung modifiziert nach [32], Figure 1 und [33], Figure 1; Genehmigung liegt jeweils vor ([32]: CC BY-NC 3.0, © 2013 Cojoc et al. (Dove Medical Press Ltd); [33]: CC BY 4.0, © 2015 Pawig et al.).

Eine zentrale Rolle kommt der CXCR4-CXCL12-Achse beim sog. „Homing“ der MM-Zellen zu: Das von Stromazellen des Knochenmarks ausgeschüttete CXCL12 initiiert, analog den Prozessen bei den hämatopoetischen Stammzellen, die Migration und Adhäsion der CXCR4-exprimierenden MM-Zellen in die Sinusoide des Knochenmarks [34].

Die Interaktion der MM-Zellen mit dem Knochenmark induziert die Sekretion von Zytokinen wie IL-6, IGF1 und VEGF, die als Vermittler von Wachstum, Überleben und Resistenzentwicklung gelten [35]. Neben diesen indirekten, über das schützende Knochenmark-Mikromilieu vermittelten Effekten führt die Bindung von CXCL12 an den CXCR4 der MM-Zellen durch Aktivierung nachgeschalteter Signalwege auch auf zellulärer Ebene zu antiapoptotischen und proliferationsfördernden Signalen [36]. Die Dauer des CXCR4-Signals wird über die Prozesse der Desensibilisierung, Endozytose und Degradation streng reguliert: Mit Bindung des Liganden kommt es zur Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von CXCR4 durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Dieser Schritt initiiert über die Anlagerung von Arrestin die Entkopplung des Chemokinrezeptors vom G-Protein (Desensibilisierung) und die Clathrin-vermittelte Endozytose von CXCR4. Die in Endosomen gespeicherten Rezeptoren werden entweder in Lysosomen abgebaut (Degradation) oder können wieder an die Zelloberfläche transportiert werden (Recycling). Neben der dynamischen Modulation der CXCR4-Expression durch diese Lokalisationsveränderungen wird sie auch durch Vorgänge auf Ebene der Transkription und Translation reguliert [37]. Wegen der intrazellulären Speichermöglichkeit in Endosomen korrelieren CXCR4-Oberflächenexpression und die durch Transkriptions- und Proteinanalysen bestimmbare Gesamtrezeptorzahl allerdings nicht zwingend miteinander: Auch Zellen, die nur eine geringe CXCR4-Expression an der Zelloberfläche zeigen, besitzen zum Teil große zytoplasmatische Assimilationen des Rezeptors [38], [39].

Zusammenfassend stellt der Chemokinrezeptor CXCR4 aufgrund seiner zentralen Rolle in der Tumorgenese des MM eine attraktive Zielstruktur für eine tumorspezifische Diagnostik und Therapie dar, was ihn für ein sog. „theranostisches Konzept“ qualifiziert. Wie der Begriff bereits suggeriert ist das primäre Ziel dieses Ansatzes, eine spezifische Tumorstruktur sowohl diagnostisch als auch therapeutisch zu nutzen. Eine mögliche klinische Umsetzung des Konzepts basiert auf nuklearmedizinischen Methoden: Die tumorspezifische Zielstruktur wird mittels *in vivo* PET-Bildgebung zunächst visualisiert und im Anschluss mit einem Radiopharmakon therapeutisch adressiert. Auf diese Weise gelingt eine krankheitsspezifische Charakterisierung der malignen Zellen auf molekularer Ebene, was eine gezielte und personalisierte Tumortherapie ermöglicht.

1.2.2 CXCR4-gerichtete Bildgebung beim Multiplen Myelom

Um das theranostische Konzept für CXCR4 in die Klinik transferieren zu können, bedurfte es zunächst der Entwicklung eines Radionuklid-gekoppelten Tracers, der mit

hoher Spezifität an den Oberflächenrezeptor bindet und auf diese Weise eine *in vivo* Quantifizierung der CXCR4-Oberflächenexpression ermöglicht. Hierfür wurden in den letzten Jahren einige Radiotracer etabliert [40], [41]. Klinisch am häufigsten zum Einsatz kommt [⁶⁸Ga]Pentixafor ([⁶⁸Ga]CPCR4.2): ein cyclisches Pentapeptid mit hoher Affinität zu CXCR4, welches an den Positronenstrahler Gallium-68 gekoppelt ist [42].

Experimente in präklinischen Modellen bescheinigten dem Tracer eine hohe Sensitivität und Spezifität für die CXCR4-Darstellung [25]. Lapa et al. konnten durch Untersuchungen an Patienten mit fortgeschrittener Myelomerkrankung auch dessen klinische Eigenschaft bestätigen. Aufgrund der hohen inter- und intraindividuellen Heterogenität der CXCR4-Expression verschiedener MM-Läsionen scheint das Potenzial der [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET allerdings weniger in der diagnostische Bildgebung zu liegen als vielmehr in der Krankheitscharakterisierung und der Selektion von Patienten, die von einer CXCR4-basierten Therapie profitieren. Es wird zudem empfohlen, den [⁶⁸Ga]Pentixafor- um einen [¹⁸F]FDG-PET-Scan zu ergänzen [43], [44]. Letzterer soll als Referenz herangezogen werden, um ein Überwiegen metabolisch aktiver, CXCR4-negativer MM-Läsionen auszuschließen (siehe Abbildung 4).

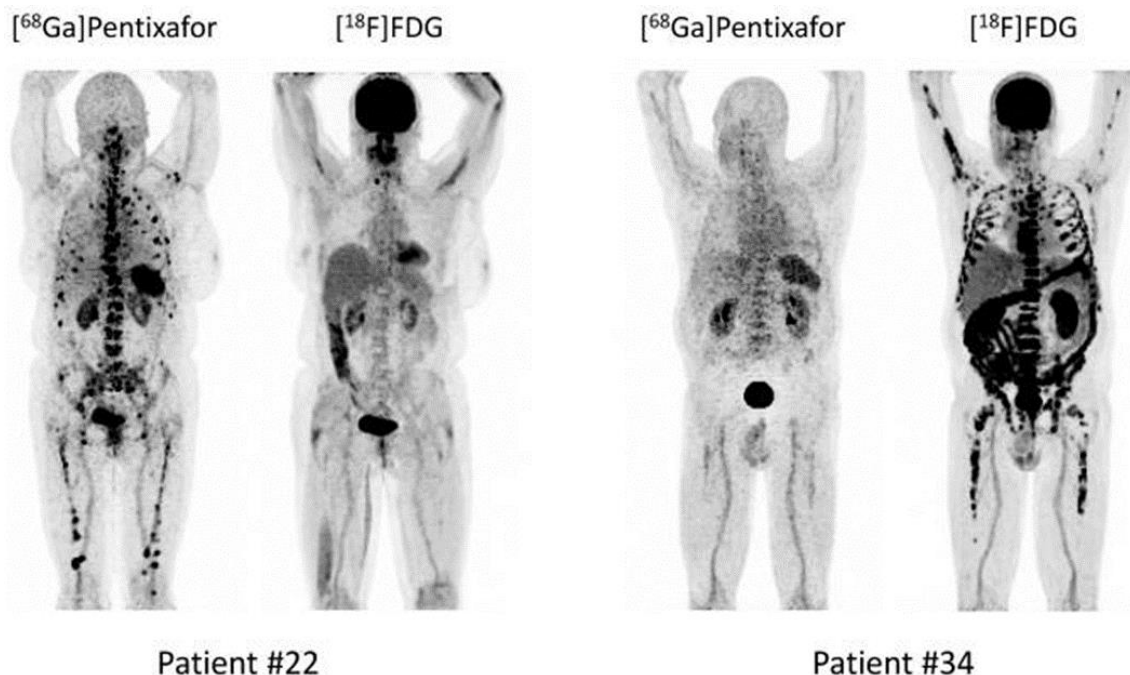


Abbildung 4: Interindividuelle Heterogenität der CXCR4-Oberflächenexpression bei MM-Patienten. Die PET/CT-Aufnahmen (jeweils [⁶⁸Ga]Pentixafor und als Referenzstandard [¹⁸F]FDG) von zwei Patienten mit aktiver Myelomerkrankung demonstrieren die Heterogenität des MM anhand der Extreme einer ausschließlich CXCR4-positiven Erkrankung (Patient #22) sowie einer komplett CXCR4-negativen Erkrankung (Patient #34). Abbildung aus [43], Figure 3; Genehmigung liegt vor (CC BY-NC 4.0, © 2017 Ivyspring International Publisher).

1.2.3 CXCR4-gerichtete Therapie beim Multiplen Myelom

Das therapeutische Pendant des CXCR4-gerichteten theranostischen Konzepts basiert auf einer Endoradiotherapie (ERT) mit dem an die Betastrahler Lutetium-177 bzw. Yttrium-90 gekoppelten CXCR4-Liganden Pentixather. Pentixather ist ebenso wie das in der PET-Bildgebung eingesetzte Pentixafor ein Peptid-Analoga und auch strukturell eng mit diesem verwandt, lediglich geringe Modifikationen am Peptid-Grundgerüst waren aufgrund der Kopplung mit den therapeutischen Radionukliden erforderlich. Nachdem in präklinischen Analysen eine hohe Affinität, Selektivität und Spezifität für den humanen CXCR4 belegt werden konnte, wurde die CXCR4-gerichtete ERT im Rahmen einer „proof-of-concept“-Serie auch im klinischen Bereich getestet [45], [46].

Die therapeutische Sequenz der ERT beinhaltet dabei mehrere Schritte: Nach Bestätigung einer ausreichend hohen CXCR4-Expression mittels [⁶⁸Ga]Pentixafor- und [¹⁸F]FDG-PET/CT erfolgt zunächst die Durchführung einer prätherapeutischen Dosimetrie mittels SPECT/CT und planarer Szintigraphie. Als Tracer wird dabei [¹⁷⁷Lu]Pentixather eingesetzt, da Lutetium-177 im Gegensatz zu Yttrium-90 neben Beta- auch Gammastrahlung emittiert. Hintergrund dieser Maßnahme ist neben der Abschätzung der erreichbaren Tumordosis auch der Ausschluss einer relevanten Speicherung des Tracers in kritischen Organen wie den Nieren. Drei bis sieben Tage nach der Dosimetrie folgt die therapeutische Injektion von [¹⁷⁷Lu]- bzw. [⁹⁰Y]Pentixather mit dem Ziel, CXCR4-positive Tumorkompartimente sowie über den strahlungsinduzierten „Bystander“-Effekt auch CXCR4-negative MM-Klone zu eliminieren. Die durch die ERT induzierte Knochenmarksuppression wird als Teil des Konditionierungsschemas der Stammzelltransplantation genutzt und durch eine nachfolgende Hochdosischemotherapie komplettiert. Die ASZT folgt frühestens 14 Tage nach der ERT [44].

Die Ergebnisse für die ersten Anwendungen der ERT nach diesem Protokoll sind positiv. Sie bestätigen eine deutliche Antitumoraktivität der ERT in einem Kollektiv von Patienten mit therapierefraktärem Myelomrezidiv. In Anbetracht der aktuellen Studienlage scheint die CXCR4-gerichtete ERT eine nebenwirkungsarme Therapieoption zu sein, die als gut verträglicher Bestandteil der Konditionierungstherapie vor geplanter SZT eingesetzt werden kann [46], [47].

Aufgrund der fortgeschrittenen Krankheitsstadien ist es allerdings nicht selten notwendig, während der Vorbereitungsphase der ERT eine begleitende bzw. überbrückende Chemotherapie einzuleiten. Dass diese die CXCR4-Expression beeinflussen kann, zeigen die von Lapa et al. publizierten Daten [48]. Sie beschreiben den Fall eines MM-Patienten, bei dem infolge eines Chemotherapiezyklus mit dexamethason (DEXA) und BEAM (Bendamustin, Etoposid, Ara-C, Mithramycin) die CXCR4-Expression

Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Melphalan) die initial hohe Rezeptorexpression nicht mehr nachweisbar war (siehe Abbildung 5), was die Durchführung der geplanten ERT ausschloss. Über die Vorgänge auf zellulärer Ebene, die diesem Effekt der chemotherapeutischen Begleittherapie auf die Rezeptorexpression zugrunde lagen, ist bislang allerdings wenig bekannt. Um künftig den Einsatz CXCR4-gerichteter Verfahren in der Myelomdiagnostik und -therapie zu optimieren und auszubauen, bedarf es deshalb weiterer Studien, die die therapieinduzierte Ab- sowie vorzugsweise Zunahme der CXCR4-Expression näher untersuchen.

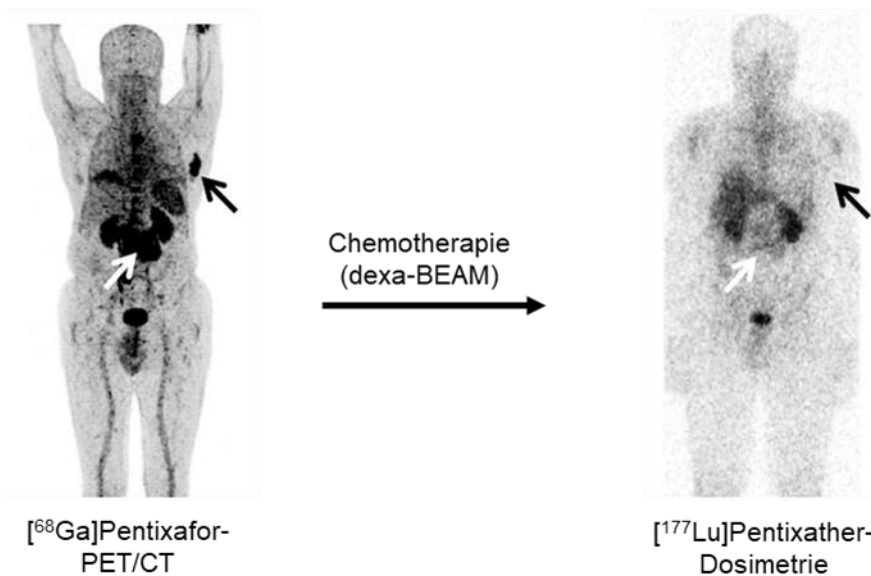


Abbildung 5: Chemotherapie-induzierte CXCR4-Herabregulation bei einem Patienten mit fortgeschrittener Myelomerkkrankung. Die $[^{68}\text{Ga}]$ Pentixafor-PET-Aufnahme zeigt eine hohe CXCR4-Expression der intra- (schwarzer Pfeil) und extramedullären (weißer Pfeil) MM-Läsionen. Diese ist in der nach einem Chemotherapie-Zyklus mit dexta-BEAM durchgeführten $[^{177}\text{Lu}]$ Pentixather-Dosimetrie nicht mehr nachweisbar. Abbildung modifiziert nach [44], Figure 7; Genehmigung liegt vor (© 2017 Elsevier).

1.3 Fragestellung

Die Variabilität der CXCR4-Expression, die sowohl auf inter- als auch intraindividuellem Ebene zum Tragen kommt, stellt bislang eine der Hauptlimitationen des effektiven Einsatzes CXCR4-gerichteter Verfahren in der Diagnostik und Therapie (= Theranostik) des MM dar. Dabei scheint die CXCR4-Oberflächenexpression ein höchst dynamischer Prozess zu sein, der neben einer Vielzahl anderer Faktoren auch durch eine begleitende Chemotherapie beeinflusst werden kann.

Ob die therapieinduzierten Expressionsveränderungen das Potenzial besitzen, die Rezeptorzahl gezielt zu steuern und so die Effektivität der CXCR4-gerichteten Strategien

zu steigern, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden. Hierfür wird der Einfluss verschiedener, in der Myelomtherapie häufig eingesetzter Substanzen sowie Substanzkombinationen auf die CXCR4-Expression von MM-Zellen in *in vitro* Experimenten systematisch untersucht.

Zur Analyse der CXCR4-Expression wurde neben der Durchflusszytometrie das Verfahren der dSTORM-Mikroskopie genutzt. Um die Funktionalität der Expressionsänderungen zu evaluieren, wurde das Bindungsverhalten des auch in der klinischen PET-Bildgebung eingesetzten CXCR4-Liganden [⁶⁸Ga]Pentixafor mittels Gammacounter in Uptake-Versuchen analysiert. Diese wurden, analog dem Vorgehen im klinischen Setting, um Uptake-Versuche mit dem Standardtracer [¹⁸F]FDG ergänzt.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Alle Versuche, bei denen primäre, von Patienten stammende MM-Zellen eingesetzt wurden, erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg (AZ-18/09) und unter Einhaltung des Datenschutzes sowie der vorgegebenen ethischen Richtlinien für den Umgang mit Patientenmaterial. Das Einverständnis der Patienten zur Verwendung der Proben lag jeweils vor.

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav <i>MELA 6, Autoklav 23</i>	MELAG Medizintechnik, Berlin
Brutschrank <i>HERA cell</i>	Heraeus Holding, Hanau
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Gammacounter <i>2480 Wizard2</i>	PerkinElmer Corporation, Waltham
Gefrierschrank <i>HERA Safe, freeze kendo laboratory products</i>	Heraeus Holding, Hanau
Kühlschrank <i>Öko Super glass line</i>	LIEBHERR International, Bulle
Lichtmikroskop <i>AXIO ZEISS, Vert. A1</i>	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen
Membran-Vakuumpumpe <i>LABOPORT® N86KN.18</i>	KNF Neuberger, Freiburg
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
SLR-Digitalkamera <i>EOS 1000 D (Objektiv: EF-S 18-55mm 1:3,5-5,6 IS II)</i>	Canon, Tokio
Pipettierhelfer <i>accu-jet® pro</i>	BRAND, Wertheim
Thermostatschrank <i>AL 186</i>	Aqualytic, Dortmund
Tischzentrifuge <i>Heraeus Fresco 21</i>	Thermo Electron LED, Osterode am Harz
Stepper <i>HandyStep®</i>	BRAND, Wertheim
Sterilbank <i>HERA Safe, Laminar-Airflow- Kabine</i>	Heraeus Holding, Hanau
Stoppuhr <i>Timer</i>	TFA Dostmann, Wertheim-Reicholzheim

Gerät	Hersteller
Wasserbad <i>WB 14</i>	Memmert, Schwabach
Zellzähler <i>Scepter 2.0 Cell Counter</i>	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifuge <i>Megafuge 2.0 R</i>	Heraeus Holding, Hanau

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Durchflusszytometrie-Röhrchen <i>5 ml</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Kammerobjektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Mikrotierplatte <i>96 Well</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotierplatte <i>4 Well</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Pasteurpipetten	BRAND, Wertheim
Pipettenspitzen (mit & ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß <i>1,5 ml, 15 ml, 50 ml</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Spülsubstanzen Durchflusszytometer <i>FACSClean, FACSRinse, FACSTFlow</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Serologische Pipetten <i>5 ml, 10 ml, 25 ml</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen <i>CELLSTAR®, Filter- schraubverschluss, 25 cm², 75 cm²</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.2.3 Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Bestellnr.
Carbofluoreszein-Succinimidyl-Ester-Trockenfarbstoff (CFSE)	Thermo Fisher Scientific, Waltham	C34554
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	D2650
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham	14190-094
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham	10270-106

Reagenzien	Hersteller	Bestellnr.
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	47608
Interleukin-6 (IL-6)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	130095-365
GlutaMAX-I (L-Alanyl-L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific, Waltham	A12860-01
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham	11360-039
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham	15140-122
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham	21875-034

2.2.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Lagerung
CFSE-Färbelösung	5 mM, in DMSO	-20 °C, lichtgeschützt
FACS-Puffer	DPBS + 3 % FCS	4 °C
PBS-Puffer	DPBS + 5 % FCS	4 °C

2.2.5 Zellmaterial

Zelllinien

Es wurden vier humane MM-Zelllinien verwendet: OPM-2, INA-6, AMO-1 und MM1.S. Deren Charakteristika sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Charakteristika der eingesetzten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Wachstumsverhalten, Verdopplungszeit (VZ)	Artikelnummer
OPM-2	peripheres Blut einer 42-jährigen Frau mit MM-Rezidiv (IgG λ)	in Suspension einzeln wachsende, runde bis polygonale Zellen, VZ: 50-60 h	DSMZ, ACC 50

Zelllinie	Herkunft	Wachstumsverhalten, Verdopplungszeit (VZ)	Artikelnummer
INA-6	Pleuraerguss eines 80-jährigen Mannes mit Plasmazelleukämie (IgG κ)	in Suspension einzeln wachsende, runde Zellen, IL-6 abhängiges Wachstum [49], VZ: 72-90 h	Bereitstellung durch die Abteilung für Hämatologie & Onkologie, Universitätsklinikum Würzburg (Prof. Dr. med. F. Jundt)
AMO-1	Aszites einer 64-jährigen Frau mit duodenalem Plasmocytom (IgA κ)	in Suspension einzeln wachsende, runde Zellen, VZ: 70-90 h	DSMZ, ACC 538
MM1.S	peripheres Blut einer 56-jährigen Frau mit MM (IgA λ), S: Steroid sensible Variante der Zelllinie	partiell adhärent wachsende, runde Zellen, VZ: 72 h	ATCC, CRL-2974

Primäre MM-Zellen

Die primären MM-Zellen stammten aus Knochenmarkaspiraten von Patienten, die im Zeitraum von Juli 2017 bis Februar 2018 in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Würzburg betreut wurden.

Die Isolierung der MM-Zellen aus den Aspiraten anhand des Oberflächenmarkers CD138⁺ erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten Stühmer (Lehrstuhl für Translationale Onkologie des Universitätsklinikums Würzburg) gemäß dem in der Literatur beschriebenen Procedere [50]. Die in Nährmedium suspendierten Zellen wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen übergeben.

2.2.6 Therapeutika

Tabelle 7: Eingesetzte MM-Therapeutika

Therapeutikum	Substanz- klasse	Hersteller, Bestellnr.	Lotnr.	Stammlö- sung
Bortezomib (PS-341, Borte)	Proteasom- inhibitor	Selleck Chemi- cals, München, S1013	S101314	1 mM, in DMSO
Cyclophosphamid- Monohydrat (Cyclo)	Alkylans (Prodrug)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkir- chen, C0768-1G	MKBX1822V	100 mM, in H ₂ O
Dexamethason (Dexa)	Glukokortikoid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkir- chen, D4902-25MG	BCBT5644	10 mM, in DMSO
Doxorubicin- Hydrochlorid (Doxo)	Anthrazyklin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkir- chen, 44583-1MG	0000007763	10 mM, in H ₂ O
Lenalidomid (Lena)	Immunmodu- lator (IMiD)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkir- chen, CDS022536- 100MG	0001605378	10 mM, in DMSO

Die Stammlösungen der eingesetzten Therapeutika wurden jeweils in Aliquots eingefroren. Für Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid war dabei eine Temperatur von -20 °C ausreichend, Bortezomib erforderte eine Lagerung bei -80 °C. Der DMSO-Gehalt der für die Experimente eingesetzten Bortezomib-, Dexamethason- und Lenalidomid-Lösungen betrug maximal 1 %. Unter diesen Bedingungen konnten relevante Auswirkungen des Lösungsmittels auf die Zellproliferation sowie auf die CXCR4-Expression ausgeschlossen werden (siehe Anhang-Abbildung A1, A2).

2.2.7 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie

Antigen	Wirts- spezies, Klon	Fluoreszenz- markierung	Hersteller, Bestellnr.	Verdün- nung
<u>Durchflusszytometrie</u>				
CXCR4 (CD184)	Maus, 12G5	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 130-098-354	1:10
IgG2a.k Isotyp- Kontrolle	Maus, G155-178	PE	Becton Dickinson, Heidelberg, 555574	1:10
<u>dSTORM-Mikroskopie</u>				
CXCR4 (CD184)	Ratte, 2B11	AlexaFluor 647	Thermo Fisher Scientific, Waltham, 14-9991-82	5 µg/ml

Die Aufbewahrung der Antikörper erfolgte jeweils lichtgeschützt bei 4 °C.

2.2.8 Radiotracer

Tabelle 9: Radiotracer

Radiotracer	Halbwertszeit $t_{1/2}$	Maximale Energie des Positrons $E\beta^+_{\max}$
[¹⁸ F]FDG	110 min	1,9 MeV
[⁶⁸ Ga]Pentixafor	68 min	0,6 MeV

Die verwendeten Radiotracer wurden von den Mitarbeitern der Radiopharmazie der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg hergestellt. Die Übergabe der mit PBS-Puffer verdünnten Eluate erfolgte in sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen.

2.2.9 Software

Tabelle 10: Software

Programm	Hersteller
BD CellQuest Research Software	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond

2.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 zusammengefasst. Alle Experimente wurden unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt.

Die methodische Durchführung wird in Abschnitt 2.4 erläutert.

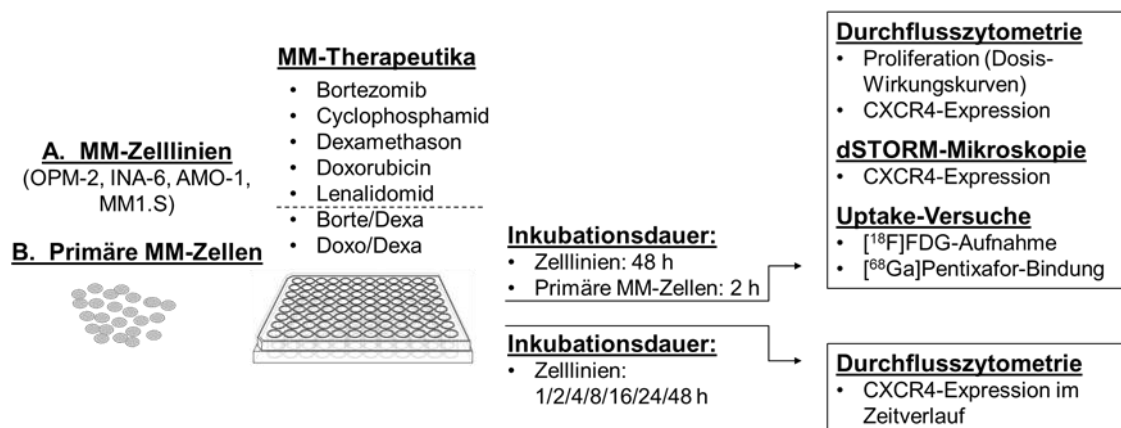


Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von MM-Zellen

Dosis-Wirkungsbestimmungen

Zunächst wurde der proliferationshemmende Effekt der eingesetzten MM-Therapeutika in den verschiedenen Zelllinien durchflusszytometrisch quantifiziert, indem Dosis-Wirkungskurven erstellt wurden. Die je Zelllinie getesteten Substanzkonzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurden für die einzelnen Substanzen und Zelllinien die Konzentrationen, die mit einer 50 %-igen Proliferationsreduktion assoziiert waren (IC_{50}), ermittelt. Auch für die in den Zelllinien OPM-2 und INA-6 untersuchten Kombinationstherapieregime Bortezomib/Dexamethason und Doxorubicin/Dexamethason wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Hierfür wurden je Zelllinie konstante Konzentrationen an Bortezomib bzw. Doxorubicin, die mit einer relativen Proliferation von 60-80 % assoziiert waren, mit aufsteigenden Konzentrationen von

Dexamethason kombiniert (siehe Tabelle 11). Dies ermöglichte die Definition von IC₅₀-Werten für die Kombinationstherapieregime.

Tabelle 11: Getestete Konzentrationsbereiche je Therapieregime und Zelllinie

Substanz	Getesteter Konzentrationsbereich			
<u>Monotherapieregime</u>				
	OPM-2	INA-6	AMO-1	MM1.S
Borte	1-5 nM	3-10 nM	2,5-10 nM	2,5-12,5 nM
Cyclo	1-50 µM	0,5-5 mM	0,5-5 mM	50-800 µM
Dexa	50-100 µM	25-100 µM	25-100 µM	50-100 µM
Doxo	0,3-5 µM	0,5-10 µM	1-10 µM	0,5-20 µM
Lena	10-100 µM	25-100 µM	25-100 µM	50-100 µM
<u>Kombinationstherapieregime</u>				
	OPM-2		INA-6	
Borte/Dexa	3,5 nm Borte	+ 25/50/75/100 µM Dexa		6 nM Borte
Doxo/Dexa	2 µM Doxo			2 µM Doxo

CXCR4-Expressionsanalysen

Im Anschluss an die Dosis-Wirkungsbestimmungen folgten verschiedene Experimente, die den Einfluss der Therapeutika auf die CXCR4-Expression untersuchten. Mit den MM-Zelllinien wurden durchflusszytometrische und dSTORM-mikroskopische Analysen sowie Uptake-Versuche durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen jeweils in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Well-Platten bzw. 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Für ihre Behandlung wurden die ermittelten IC₅₀-Konzentrationen verwendet. Bei einzelnen Experimenten wurden zusätzliche Konzentrationen eingesetzt, diese sind an den entsprechenden Stellen genannt. Als Inkubationszeit wurde 48 h gewählt. Eine Ausnahme bildete die durchflusszytometrische Untersuchung zum Einfluss der Monosubstanzen auf die CXCR4-Expression im Zeitverlauf. Hier wurde nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h und 48 h Inkubationsdauer die Rezeptorexpression bestimmt.

Die primären MM-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie untersucht. Die Konzentration der in Well-Platten ausgesäten Zellsuspensionen betrug in Abhängigkeit von der Größe der Patientenprobe zwischen $1,5 \cdot 3 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Bei der Wahl der für die Behandlung der primären MM-Zellen eingesetzten Bortezomib-Konzentration von 10 nM wurde sich an den in den MM-Zelllinien ermittelten IC₅₀-Werten

orientiert, die gewählte Dexamethason-Konzentration von 40 nM stammt aus der Literatur [51]. Die für die primären MM-Zellen definierte Inkubationszeit betrug 2 h.

2.4 Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Kulturbedingungen und -medium

Die Kultur der Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen bei 37 °C, 5,5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet, welchem 10 % FCS, 2 mM GlutaMAX-I, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Aufgrund der IL-6-abhängigen Proliferation der INA-6-Zelllinie wurde deren Mediumansatz um die Zugabe von 2,7 ng/ml IL-6 ergänzt.

Die primären MM-Zellen wurden maximal zwei Tage kultiviert. Die MM-Zelllinien wurden mehrere Wochen in Kultur gehalten. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des Zellwachstums mit dem Lichtmikroskop. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen gesplittet, indem ein Teil der Suspension in eine neue Kulturflasche umgesetzt und mit Kulturmedium aufgefüllt wurde. Die partiell adhärennten MM1.S-Zellen wurden vor dem Splitten mittels Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst.

2.4.1.2 Auftauen der Zellen

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Für den Auftauvorgang wurden die in Einfriermedium suspendierten Zellen im Wasserbad angetaut und anschließend in eine Kulturflasche, in der Kulturmedium vorgelegt war, übergeführt. Nach 12-14 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das zytotoxische DMSO des Einfriermediums aus der Zellsuspension zu entfernen.

2.4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die für die Versuche erforderliche Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem vollautomatischen Zellzähler Scepter 2.0 Cell Counter. Das Gerät basiert auf dem Coulter-Prinzip: Durch die Erfassung von Änderungen des elektrischen Widerstands zwischen zwei Elektroden lassen sich Aussagen über die Zellzahl, die durchschnittliche Zellgröße sowie die Vitalität einer Zellsuspension treffen. Die Ausgabe dieser Parameter erfolgt über ein in den Zellzähler integriertes Display [52].

Zur Durchführung der Zellzählung wurde durch die Zugabe von Medium eine im Messbereich des Systems (10.000-500.000 Zellen/ml) liegende Verdünnung der Zellsuspension hergestellt. Mit einem Probenvolumen von 300-500 µl erfolgte anschließend die Bestimmung der Zellzahl in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß.

2.4.2 Durchflusszytometrie

2.4.2.1 Hintergrund

Die Analyse von molekularen und physikalischen Eigenschaften von Zellen unter Einsatz eines fokussierten Lichtstrahls bildet das Grundprinzip der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting = FACS). Die zu analysierende Zellsuspension wird mithilfe eines Hüllstroms vereinzelt und im rechten Winkel an der Lichtquelle vorbeigeführt [53]. Durch Detektion des Vorwärtsstreulichts (forward scatter = FSC, Maß für Zellgröße) und des Seitwärtsstreulichts (sideward scatter = SSC, Maß für Zellgranularität) wird eine Unterscheidung verschiedener Populationen innerhalb der Zellsuspension möglich (Gating). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip genutzt, um die Population der vitalen MM-Zellen anhand ihrer charakteristischen Position im Dichtediagramm von Zelltrümmern und -aggregaten abzugrenzen (siehe Abbildung 7, A). Der Einsatz von Fluoreszenzmarkern ermöglicht es, die Zellpopulation näher zu klassifizieren. So wurde in dieser Arbeit der CFSE-Farbstoff zur Analyse der Zellproliferation und der an den CXCR4-Antikörper gekoppelte Farbstoff Phycoerythrin (PE) zur Quantifizierung der CXCR4-Oberflächenexpression eingesetzt. Das CFSE-Signal wurde im Fluoreszenzkanal FL1 erfasst, das PE-Signal im FL2-Kanal.

Die Auswertung aller durchflusszytometrischer Rohdaten erfolgte mit der Cell-Quest Research-Software. Als Maß für die Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescent intensity) der einzelnen Proben wurde jeweils das geometrische Mittel herangezogen, welches die im Histogramm dargestellte Häufigkeitsverteilung der Messsignale als Zahlenwert zusammenfasst (siehe Abbildung 7, B+C). Um bei der CXCR4-Antikörper-Färbung den Einfluss unspezifischer Antikörperbindungen auszuschließen, wurde der um das Fluoreszenzsignal der Isotyp-Kontrolle bereinigte Wert verwendet.

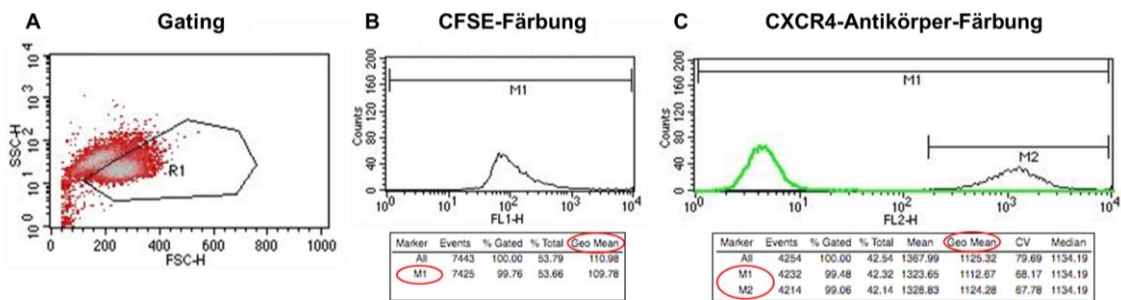


Abbildung 7: Auswertungsinstrumente der Durchflusszytometrie. (A) zeigt das Dichtediagramm mit den Parametern FSC und SSC, das zur Identifikation (Gating) der vitalen MM-Zellen (Gate R1) herangezogen wurde. Unter (B) und (C) sind exemplarisch Histogramme (x-Achse: Fluoreszenzintensität der Einzelmessung, y-Achse: Anzahl der Fluoreszenzsignale) und die zugehörigen Auswertungen sowohl der CFSE- als auch der CXCR4-Antikörper-Färbung dargestellt. Der Balken M1 definiert die innerhalb des Gates R1 erfassten Fluoreszenzsignale, M2 enthält die Fluoreszenzsignale von M1 abzüglich denen der Isotyp-Kontrolle. Als Maß für die Fluoreszenzintensität wurde jeweils das geometrische Mittel verwendet.

2.4.2.2 Zellpräparation für die Dosis-Wirkungsbestimmungen mittels CFSE-Färbung

Die CFSE-Färbung wurde für die Proliferationsanalysen der Zelllinien, die zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven für die Mono- und Kombinationstherapieregime erforderlich waren, genutzt. Als membrangängiger Farbstoff durchdringt CFSE die Zellmembran und bindet zytoplasmatische Proteine. Mit jeder Zellteilung halbiert sich die Farbstoffmenge in den Zellen. Die daraus resultierende Reduktion des Fluoreszenzsignals ermöglicht eine Aussage über die Proliferation der Zellpopulation: Je höher die Fluoreszenzintensität, desto geringer die Proliferationsrate [54].

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS-Puffer auf die Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 4 min, bei Raumtemperatur) und Absaugen des Überstands folgte die Resuspendierung mit PBS-Puffer (0,5 ml pro ml Zellsuspension) sowie die Zugabe der CFSE-Färbelösung (1,0 μ l pro ml Zellsuspension). Die Inkubation erfolgte für drei Minuten bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen. Um ungebundenes CFSE vollständig aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde der Ansatz im Anschluss mit PBS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, bei Raumtemperatur) und der Überstand abgenommen. Die Ausführung dieses Waschschrittes erfolgte insgesamt drei Mal. Nach dem letzten Waschen wurde das gefärbte Pellet in Kulturmedium aufgenommen und mit einem Volumen von 200 μ l/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Es folgte die Zugabe der Substanzen. Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen aus den einzelnen Wells jeweils in Durchflusszytometrie-Röhrchen pipettiert. Ein abschließender

Waschschritt mit FACS-Puffer sowie die Zugabe von je 300 µl FACS-Puffer bildeten die letzten Arbeitsschritte vor der Messung am Durchflusszytometer.

Im Rahmen der Auswertung wurde der durch die Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen hervorgerufene Einfluss auf die Proliferation quantifiziert, indem jeweils die relative Proliferationsrate (% , bezogen auf unbehandelte Zellen) berechnet wurde:

$$\text{Proliferationsrate [\%]} = \frac{\text{MFI (unbehandelte Zellen)}}{\text{MFI (behandelte Zellen)}} * 100$$

2.4.2.3 Zellpräparation für die Expressionsanalysen mittels CXCR4-Antikörper-Färbung

Die CXCR4-Antikörper-Färbung wurde für die Analysen zum Einfluss der Mono- und Kombinationstherapieregime auf die Rezeptorexpression der Zelllinien sowie der primären MM-Zellen genutzt. Auch für die Untersuchungen zur CXCR4-Oberflächenexpression im Zeitverlauf wurde sie herangezogen.

Anders als die CFSE-Färbung erfolgte die CXCR4-Antikörper-Färbung erst nach Ablauf der Inkubationszeit. Hierfür wurden die Zellsuspensionen (200 µl/Well) aus den Vertiefungen der 96-Well-Platte, in denen sie jeweils mit den verschiedenen Substanzen inkubiert worden waren, zunächst in Durchflusszytometrie-Röhrchen pipettiert. Es folgte die Zugabe der CXCR4-Antikörper- bzw. Isotyp-Kontroll-Lösung. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen für 20 min lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die einzelnen Proben danach jeweils mit FACS-Puffer gewaschen. Nach der abschließenden Zugabe von 300 µl FACS-Puffer folgte die Messung der Proben am Durchflusszytometer.

2.4.3 dSTORM-Mikroskopie

2.4.3.1 Hintergrund

dSTORM steht für „direct stochastic optical reconstruction microscopy“. Diese Art der Mikroskopie nutzt herkömmliche, an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, um Strukturen an der Zelloberfläche im Größenordnungsbereich von 20-30 nm zu lokalisieren und zu quantifizieren. Voraussetzung ist eine räumlich getrennte Detektion der Fluoreszenzsignale. Diese wird durch den mittels Laserbestrahlung gezielt steuerbaren Wechsel der Fluorochrome zwischen den beiden Zuständen „fluoreszent“ und „dunkel“

erreicht. Mit dem Ziel jedes Fluorochrom mindestens einmal im „fluoreszenten“ Zustand zu erfassen, wird eine Serie von mikroskopischen Einzelaufnahmen generiert. Die Einzelaufnahmen werden letztlich zu einem Gesamtbild zusammengesetzt, das in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der CXCR4-Zahl der MM-Zellen genutzt wurde [55]. Das verwendete dSTORM-Setup entsprach dabei dem von van de Linde et al. beschriebenen Aufbau [56].

Im Rahmen der Auswertung der dSTORM-mikroskopischen Aufnahmen wurde für eine gewisse Anzahl von Zellen der Zelldurchmesser (d) sowie die Zahl der Rezeptoren je μm^2 (R_F) ermittelt. Anhand dieser Parameter konnte die Rezeptorzahl pro Zelle (R_Z) berechnet werden:

$$R_Z = \pi * d^2 * R_F$$

2.4.3.2 Zellpräparation für die dSTORM-mikroskopischen Analysen

Die dSTORM-mikroskopischen Analysen, einschließlich der Zellpräparation, führte Patrick Eiring (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg) durch. Die Genehmigung zur Verwendung seiner Daten liegt vor.

Die dSTORM-Mikroskopie wurde genutzt, um die CXCR4-Expression von unbehandelten und behandelten OPM-2-Zellen sowie primären MM-Zellen zu untersuchen. Für die Behandlung wurden die Zellen in 4-Well-Platten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen aus den Vertiefungen der Well-Platte jeweils in die Kammern eines mit Poly-D-Lysin beschichteten Kammerobjektträgers pipettiert. Bevor der an den Farbstoff AlexaFluor 647 gekoppelte CXCR4-Antikörper in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben wurde, mussten 15 min abgewartet werden, um die Adhärenz der Zellen an den Objektträger zu gewährleisten. Die einstündige Inkubation mit dem Antikörper erfolgte unter lichtgeschützten Bedingungen bei 4 °C. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, schlossen sich zwei Waschschriffe mit PBS-Puffer an. Zur Fixierung der Zellen wurde das Substanzgemisch 4 % Formaldehyd + 0,2 % Glutaraldehyd genutzt, mit dem die Zellen für 15 min inkubiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit PBS-Puffer konnte die dSTORM-mikroskopische Analyse der Zellen durchgeführt werden.

2.4.4 Uptake-Versuche

2.4.4.1 Hintergrund

Uptake-Versuche erlauben eine Analyse der Traceraufnahme *in vitro*. Durch Messung im Gammacounter wird die Quantifizierung der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität möglich. Gammacounter basieren auf dem Prinzip der Szintillationsdetektion: Radioaktiv markierte Proben werden einzeln an einem abgeschirmten Detektor, der einen Natrium-Iodid-Szintillationskristall enthält, vorbeigeführt. Die infolge des radioaktiven Zerfalls von den Proben emittierte Gammastrahlung führt im Szintillationskristall zur Aussendung von Lichtsignalen. Diese werden mittels Photomultiplier verstärkt und in einen Stromimpuls, dessen Amplitude mit der Energie der einfallenden Strahlung korreliert, umgewandelt [57].

Bei dem eingesetzten Gammacounter 2480 Wizard2 erfolgt die Ausgabe der Ergebnisse in Form einer Microsoft Excel-Tabelle. Diese listet als Maß für die Traceraufnahme der Einzelproben, die jeweils in Triplikaten gemessen wurden, die Anzahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute = CPM) auf. Bei den Werten handelt es sich bereits um die hinsichtlich Hintergrundaktivität und radioaktiven Zerfalls korrigierten Zahlen.

Für die statistische Auswertung der Uptake-Versuche wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jeweils die referenzangepassten Mittelwerte der CPM-Werte je Triplikat herangezogen.

2.4.4.2 Zellpräparation für die Uptake-Versuche

Die Uptake-Versuche mit den Tracern [¹⁸F]FDG und [⁶⁸Ga]Pentixafor wurden jeweils mit der Zelllinie OPM-2 durchgeführt. Für die Behandlung mit den MM-Therapeutika wurden die Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen aus den einzelnen Kulturflaschen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße übergeführt, zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, bei Raumtemperatur) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet so in PBS-Puffer aufgenommen, dass jede Probe 2*10⁵ Zellen in einem Volumen von 500 µl enthielt. Dabei wurden die einzelnen Proben jeweils in Form von Triplikaten pipettiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Tracer-Lösung, welche mit PBS-Puffer auf 1*10⁶ CPM eingestellt worden war. Als Referenz wurde zusätzlich ein Triplikat mitgeführt, das ausschließlich 50 µl radioaktive Lösung beinhaltete. Für die Bindungsreaktion wurden die Proben für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben zum Reaktionsstopp für zwei Minuten auf Eis gestellt. Um ungebundenen Radiotracer zu entfernen, folgten zwei Waschschriffe. Diese bestanden jeweils

aus der Zugabe von 200 µl PBS-Puffer, Zentrifugation (2500 rpm, 3 min, 4 °C) und der Entfernung des Überstands. Unmittelbar daran schloss sich die Analyse im Gamma-counter an.

2.4.5 Graphische und statistische Auswertung

Sowohl die graphische als auch die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 8 durchgeführt.

Graphische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Punkt- und Liniendiagrammen überwiegend Säulendiagramme zur Veranschaulichung der Ergebnisse verwendet. Die Linienpunkte bzw. die oberen Säulenabschlüsse repräsentieren dabei jeweils den Mittelwert (MW), die Fehlerbalken zeigen abhängig vom Versuchsaufbau entweder die Standardabweichung (SD) oder den Standardfehler (SEM).

Statistische Auswertung

Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungskonditionen bezüglich ihres Effekts auf die CXCR4-Expression statistisch auszuwerten, wurde der One-way-ANOVA-Test mit nachfolgendem Bonferroni-Post-Test gewählt. Die Experimente zum Einfluss der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression im Zeitverlauf erforderten einen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierfür wurde der Two-way-ANOVA-Test mit nachfolgendem Bonferroni-Post-Test herangezogen. Als signifikant galten jeweils p-Werte von $p < 0,05$ (*). Die weitere Staffelung der Signifikanzniveaus umfasste $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (**).

3 Ergebnisse

3.1 Heterogenität in der basalen CXCR4-Expression

3.1.1 CXCR4-Oberflächenexpression verschiedener MM-Zelllinien

Um der Heterogenität der Myelomerkrankung gerecht zu werden, wurden in dieser Arbeit vier verschiedene MM-Zelllinien eingesetzt (OPM-2, INA-6, AMO-1, MM1.S). Diese zeigten deutliche Unterschiede in ihrem basalen Expressionsniveau, welches durchflusszytometrisch bestimmt wurde (siehe Abbildung 8): Während in unbehandelten OPM-2- und INA-6-Zellen eine hohe CXCR4-Oberflächenexpression nachweisbar war (OPM-2: $154,4 \pm 31,8$ bzw. INA-6: $115,0 \pm 16,1$; jeweils MW \pm SD), präsentierte sich diese in der AMO-1- und MM1.S-Zelllinie deutlich geringer ausgeprägt (AMO-1: $12,9 \pm 4,1$ bzw. MM1.S: $14,3 \pm 3,3$; jeweils MW \pm SD).

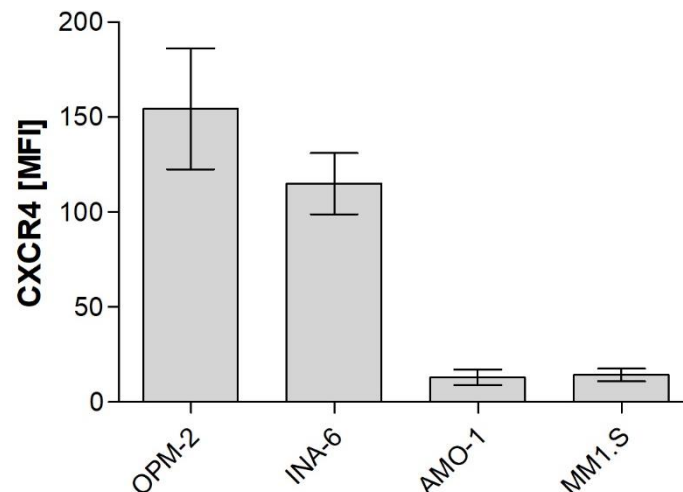


Abbildung 8: Basale CXCR4-Oberflächenexpression verschiedener MM-Zelllinien. Die durchflusszytometrische Analyse der basalen CXCR4-Expression zeigte deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von MW \pm SD; n = 5-6.

3.1.2 CXCR4-Oberflächenexpression primärer MM-Zellen

Zusätzlich zu den Zelllinien wurden auch primäre MM-Zellen hinsichtlich ihrer basalen CXCR4-Oberflächenexpression untersucht. Dabei zeigten sich in den durchflusszytometrischen Analysen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patientenproben, die sich in Fluoreszenzintensitäten von 4,2 bis 509,4 ausdrückten (siehe Abbildung 9, A). Diese interindividuelle Heterogenität ließ sich auch optisch bestätigen, indem mittels dSTORM-Mikroskopie die einzelnen Rezeptoren auf den MM-Zellen von zwei

verschiedenen Patientenproben (P1, P7) sichtbar gemacht wurden (siehe Abbildung 9, B).

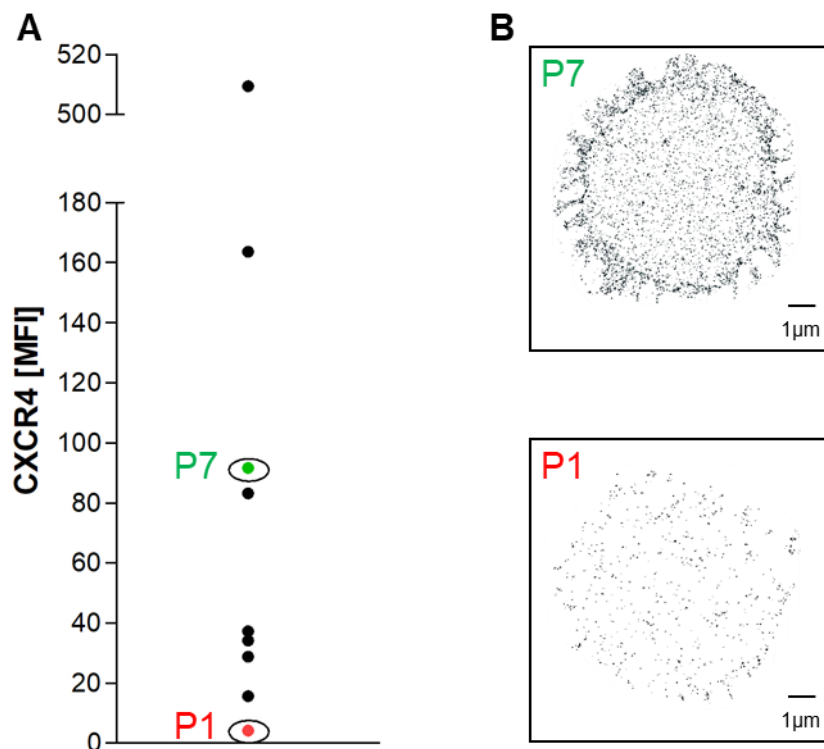


Abbildung 9: Basale CXCR4-Oberflächenexpression primärer MM-Zellen. Sowohl die durchflusszytometrische (A) als auch die dSTORM-mikroskopische Analyse (B) der basalen CXCR4-Expression zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Zellproben verschiedener MM-Patienten. In (A) sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) je Patient dargestellt. In den unter (B) abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen von Zellen der Patienten P1 und P7 entspricht ein kolorierter Punkt einem CXCR4-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Die dSTORM-mikroskopischen Aufnahmen, einschließlich der Zellfärbung, wurden von Patrick Eiring (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik) angefertigt; Genehmigung liegt vor.

Neben der interindividuellen Heterogenität demaskierte die dSTORM-Mikroskopie auch intraindividuelle Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen den Zellen einer Patientenprobe. Abbildung 10 zeigt dies exemplarisch für Patient P1. Das Zellmaterial dieses Patienten bestand überwiegend aus Zellen mit geringer CXCR4-Expression (siehe Abbildung 10, A), vereinzelt ließen sich aber auch Zellen mit deutlich höherer Rezeptorexpression nachweisen (siehe Abbildung 10, B).

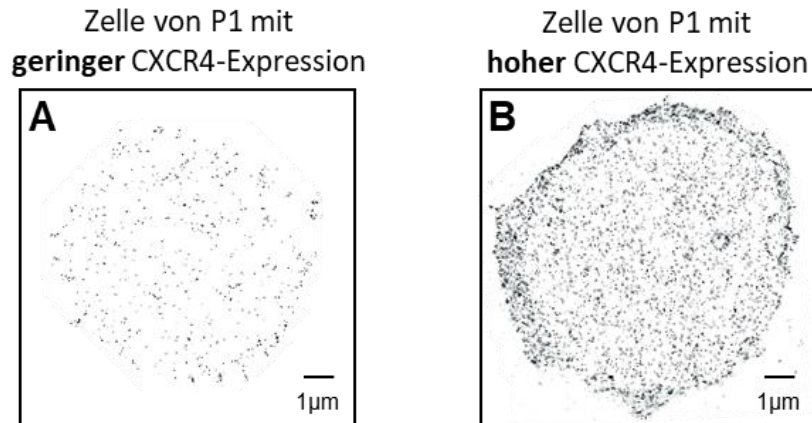


Abbildung 10: Intraindividuelle Heterogenität der basalen CXCR4-Oberflächenexpression. In den dSTORM-mikroskopischen Analysen des Zellmaterials von Patient P1 ließen sich neben MM-Zellen mit geringer CXCR4-Expression (A), die zahlenmäßig überwogen, auch einzelne MM-Zellen mit deutlich höherer Rezeptorexpression (B) nachweisen. In den abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen entspricht ein kolierter Punkt einem CXCR4-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Die dSTORM-mikroskopischen Aufnahmen, einschließlich der Zellfärbung, wurden von Patrick Eiring (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik) angefertigt; Genehmigung liegt vor.

3.2 Effekte von Monotherapieeregimen in MM-Zellen

3.2.1 Proliferationsreduktion durch Monotherapieeregime *in vitro*

Um die mittlere proliferationsinhibitorische Konzentration (IC_{50}) der eingesetzten MM-Therapeutika zu bestimmen, wurden je Zelllinie Dosis-Wirkungskurven für die einzelnen Substanzen erstellt.

Die Konzentrationsbereiche, die zum Erreichen erkennbarer Effekte auf die Proliferation der Zellen erforderlich waren, unterschieden sich deutlich zwischen den Substanzen.

Für die **OPM-2-Zelllinie** sind diese in Abbildung 11 dargestellt. Bei Bortezomib waren Dosierungen im Nanomol-Bereich ausreichend (1 nM, 2,5 nM, 3,5 nM, 5 nM), um eine konzentrationsabhängige Proliferationsreduktion zu erzielen. Als IC_{50} wurde eine Konzentration von 5 nM festgelegt. Durch die für Doxorubicin getesteten Konzentrationen von 0,3 µM, 0,5 µM, 1 µM und 5 µM konnte die proliferationshemmende Wirkschwelle dieser Substanz im einstelligen Mikromol-Bereich verordnet werden. Der IC_{50} -Wert wurde bei einer Konzentration von 5 µM erreicht. Nochmals deutlich höhere Konzentrationen waren bei Dexamethason (50 µM, 100 µM) und Lenalidomid (10 µM, 50 µM, 100 µM) erforderlich, deren Dosis-Wirkungskurven eine große Ähnlichkeit aufwiesen. Für beide Substanzen konnte unter den untersuchten Konzentrationen das IC_{50} -Niveau nicht erreicht werden. Eine weitere Konzentrationssteigerung war aufgrund des verwendeten Lösungsmittels DMSO nicht möglich: Nur bis zu einem DMSO-Gehalt von 1 %,

der in 100 μM Dexamethason- bzw. Lenalidomid- Lösung enthalten war, konnten relevante Effekte des Lösungsmittels auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden (siehe Anhang-Abbildung A1). Deshalb wurden sowohl für Dexamethason als auch Lenalidomid die Konzentrationen von 75 μM und 100 μM , die jeweils den größten Effekt auf die Proliferation zeigten, für die weiteren Experimente herangezogen. Keine signifikanten Effekte auf die Proliferation konnten durch die getesteten Cyclophosphamid-Konzentrationen 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM erreicht werden.

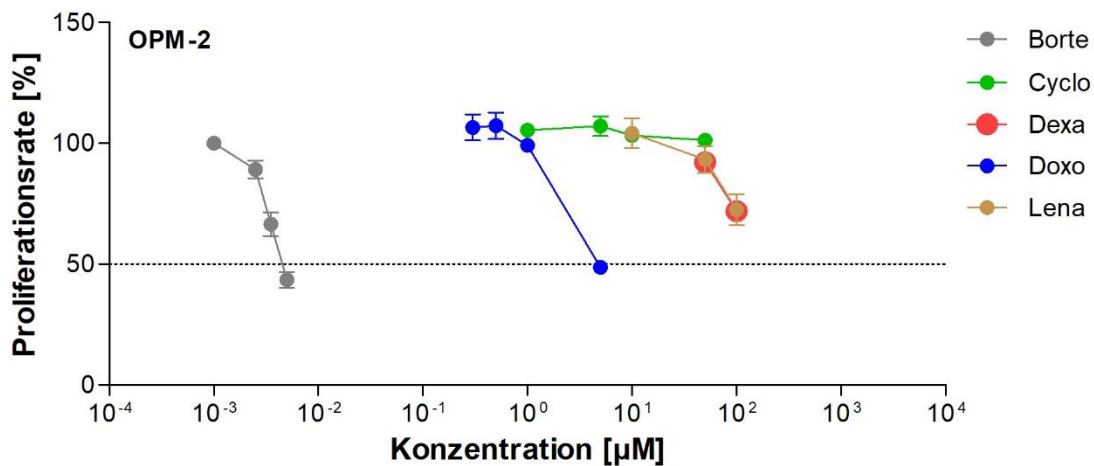


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven der OPM-2-Zelllinie für Monotherapieeregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%), bezogen auf unbehandelte Zellen als $\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 3-4$.

Auch die **INA-6-Zelllinie** zeigte die substanzabhängige Staffelung der zur Proliferationsreduktion erforderlichen Konzentrationsbereiche (siehe Abbildung 12). Indem eine Spanne von 3 nM bis 10 nM getestet wurde, konnte für die Bortezomib-Behandlung 7,5 nM als IC_{50} -Wert ermittelt werden. Der IC_{50} -Wert für Doxorubicin wurde durch die Inkubation der INA-6-Zellen mit einer Konzentration von 5 μM erzielt. Hierfür wurde der proliferationshemmende Einfluss der Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , und 10 μM untersucht. Die für Dexamethason getesteten Konzentrationen 25 μM , 50 μM , 75 μM und 100 μM führten zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellproliferation, welche allerdings nicht die 50 %-Grenze erreichte. Die mit einer relativen Proliferationsrate von 84,6 % bzw. 71,3 % assoziierten Dexamethason-Konzentrationen 75 μM und 100 μM wurde in diesem Fall für die nachfolgenden Experimente herangezogen. Die gleiche Konzentrationsspanne wie bei Dexamethason wurde auch für die Dosis-Wirkungskurve der Lenalidomid-Behandlung angewendet. Der hervorgerufene Effekt auf

die Proliferation war jedoch gering, unter der Behandlung mit 100 μM Lenalidomid betrug die relative Proliferationsrate im Mittel noch 98,5 %. Analog dem Vorgehen bei Dexamethason wurden die Konzentrationen mit dem größten Effekt auf die Proliferation, 75 μM und 100 μM , in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Durch den Einsatz von Konzentrationen im Millimol-Bereich (0,5 mM, 0,8 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM) konnte für Cyclophosphamid eine Reduktion des Zellwachstums erzielt werden. Als IC_{50} wurde die Konzentration von 5 mM ermittelt.

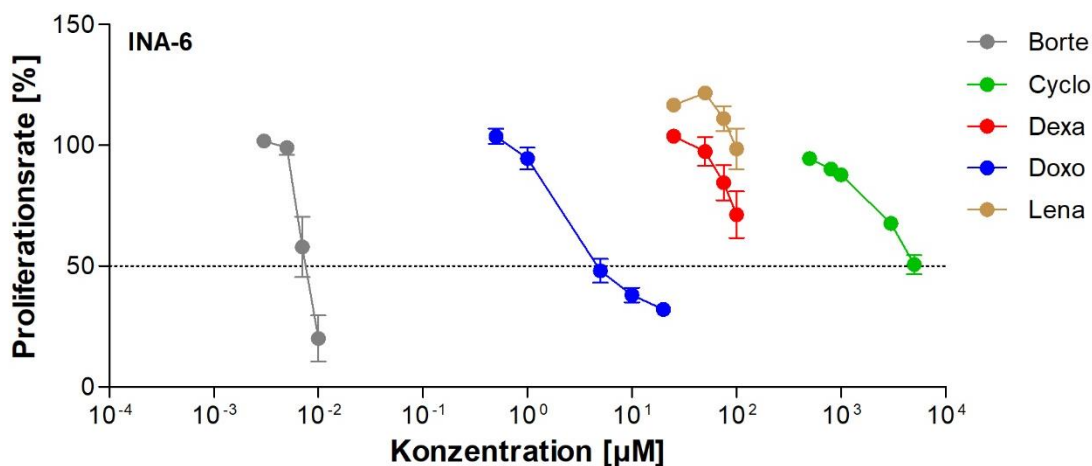


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der INA-6-Zelllinie für Monotherapieeregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%), bezogen auf unbehandelte Zellen als $\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 3-4$.

Die Dosis-Wirkungskurven der **AMO-1-Zelllinie** sind in Abbildung 13 dargestellt. Auch in dieser Zelllinie zeigte Bortezomib die niedrigste Wirkschwelle. Als IC_{50} wurde eine Konzentration von 5 nM determiniert, nachdem ein Konzentrationsbereich von 2,5 nM bis 10 nM Bortezomib hinsichtlich seines proliferationsreduzierenden Einflusses untersucht worden war. Anhand der getesteten Konzentrationen 1 μM , 3 μM , 5 μM und 10 μM konnte 10 μM als IC_{50} -Wert für die Doxorubicin-Behandlung ermittelt werden. Die Dosis-Wirkungskurven von Dexamethason und Lenalidomid, die jeweils die Konzentrationen 25 μM , 50 μM , 75 μM und 100 μM umfassten, zeigten in der AMO-1-Zelllinie einen ähnlichen Verlauf. Da bei beiden Substanzen unter den getesteten Konzentrationen keine 50 %-ige Proliferationsreduktion erzielt werden konnte, wurde jeweils die Konzentration mit dem größten Effekt auf die Proliferation, 100 μM , als IC_{50} -Wert festgesetzt. Bei der Dexamethason-Behandlung war diese mit einer relativen Proliferationsrate von 69,1 % und bei der Lenalidomid-Behandlung mit einer Rate von 66,9 % assoziiert. Indem ein

Konzentrationsbereich von 0,5 mM, 1 mM, 3 mM und 5 mM getestet wurde, konnte 5 mM als IC_{50} für Cyclophosphamid ermittelt werden.

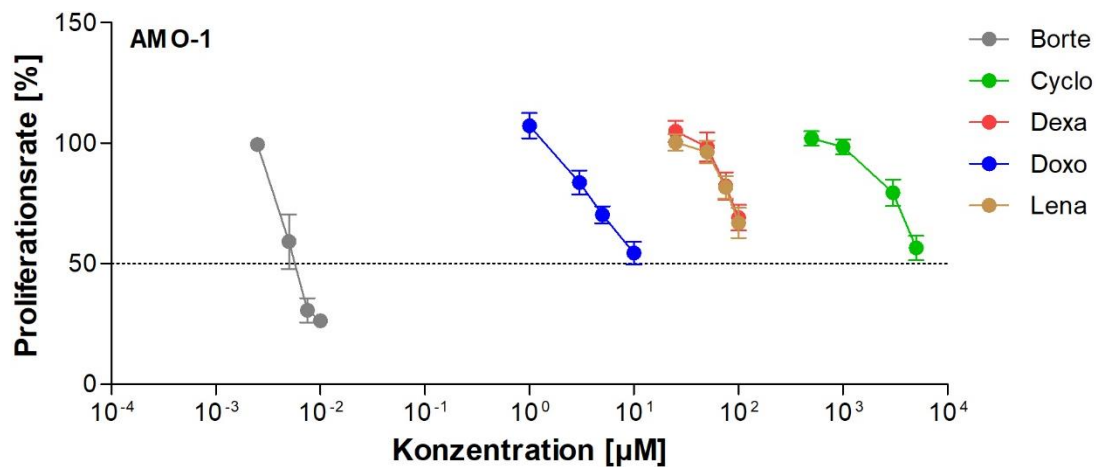


Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurven der AMO-1-Zelllinie für Monotherapieeregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%), bezogen auf unbehandelte Zellen als $MW \pm SD$; $n = 3-4$.

Bei den in der **MM1.S-Zelllinie** getesteten Konzentrationsbereichen für die einzelnen Substanzen konnte nur bei Bortezomib die IC_{50} -Schwelle erreicht werden (siehe Abbildung 14). Mit einer relativen Proliferationsrate von 54,6 % wurde die Bortezomib-Konzentration von 5 nM als IC_{50} definiert, nachdem eine Spanne von 2,5 nM bis 12,5 nM getestet worden war. Die unter den niedrigeren Konzentrationen des für Doxorubicin getesteten Bereichs (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM) nachweisbare konzentrationsabhängige Proliferationsreduktion zeigte sich durch höhere Konzentrationen nicht weiter steigerbar. Die relative Proliferationsrate stagnierte auf einem Niveau von 70 %. Als IC_{50} wurde in diesem Fall eine Konzentration von 10 µM festgesetzt. Ebenfalls keine 50 %-ige Proliferationsreduktion konnte unter der Behandlung mit den für Dexamethason getesteten Konzentrationen 50 µM und 100 µM erzielt werden. Hier wurden 50 µM mit einer relativen Proliferationsrate von 78,2 % als IC_{50} definiert, die Behandlung mit der höher konzentrierten Dexamethason-Lösung war mit einem geringeren Effekt auf die Proliferation (86,1 %) assoziiert. Auch im Rahmen der Dosis-Wirkungskurve von Lenalidomid wurden die Konzentrationen 50 µM und 100 µM untersucht. Die Effekte auf die Zellproliferation waren jedoch gering, die relative Proliferationsrate konnte maximal auf 95,2 % gesenkt werden. Erreicht wurde dieser Effekt durch die 100 µM Lenalidomid-Lösung, weshalb diese Konzentration als IC_{50} festgesetzt wurde. Ebenfalls keine

signifikanten Effekte auf die Proliferation konnten durch die getesteten Cyclophosphamid-Konzentrationen 50 μM , 100 μM , 500 μM , 800 μM erreicht werden.

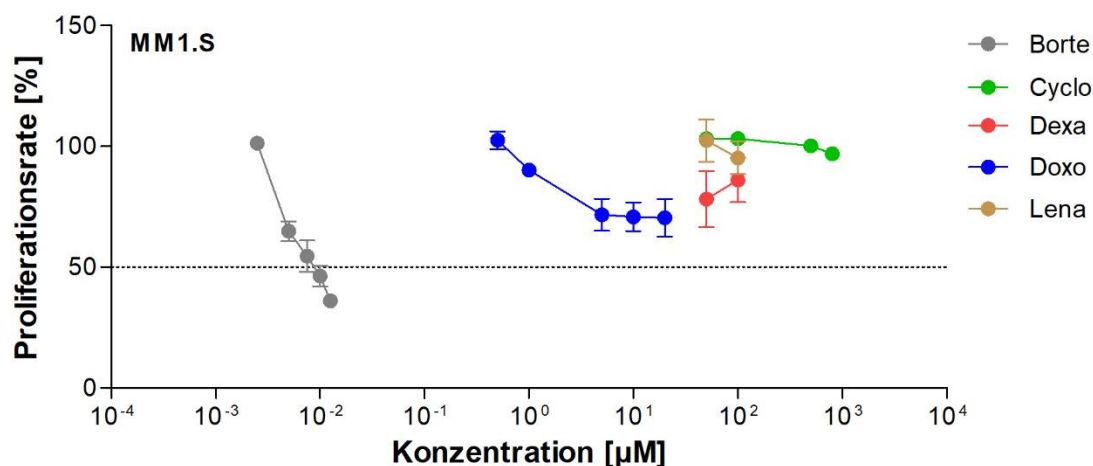


Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurven der MM1.S-Zelllinie für Monotherapieregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%), bezogen auf unbehandelte Zellen) als $\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 3-4$.

Die anhand der Dosis-Wirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen sind für die verschiedenen Zelllinien in Tabelle 12 zusammengefasst. Sie bildeten die Grundlage für die systematischen Untersuchungen zum Einfluss der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression. Falls bei Experimenten zusätzliche Konzentrationen eingesetzt wurden, werden diese an den entsprechenden Stellen genannt.

Tabelle 12: IC_{50} -Werte der MM-Therapeutika für die verschiedenen Zelllinien. Unter der Behandlung mit den kursiv formatierten Konzentrationswerten konnte keine 50 %-ige Proliferationsreduktion erzielt werden, stattdessen wurden die Konzentrationen verwendet, die mit dem größten Effekt auf die Proliferation assoziiert waren.

	OPM-2	INA-6	AMO-1	MM1.S
Bortezomib	5 nM	7,5 nM	5 nM	5 nM
Cyclophosphamid	50 μM	5 mM	5 mM	50 μM
Dexamethason	75/100 μM	75/100 μM	100 μM	50 μM
Doxorubicin	5 μM	5 μM	10 μM	10 μM
Lenalidomid	75/100 μM	75/100 μM	100 μM	100 μM

3.2.2 Zeitabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression

Mit dem Ziel, eine geeignete Inkubationszeit für die nachfolgenden Experimente festzulegen, wurde der Einfluss der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression im Zeitverlauf untersucht. Hierfür wurde zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h und 48 h nach Substanzzugabe die Rezeptorexpression der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und jeweils mit dem Expressionsniveau unbehandelter Zellen verglichen. Aufgrund ihrer hohen basalen CXCR4-Oberflächenexpression wurde die OPM-2-Zelllinie als Modellzelllinie für dieses Experiment herangezogen.

Unter der **Bortezomib**-Behandlung zeigten die OPM-2-Zellen innerhalb der ersten Stunden nach Substanzzugabe keine Veränderung der CXCR4-Oberflächenexpression, sie folgten den im Zeitverlauf beobachteten geringen Schwankungen der Rezeptorexpression der unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 15). Nach 16 h Behandlungsdauer setzte eine signifikante Herabregulation der CXCR4-Expression ein, die auch für Inkubationszeiten von 24 h und 48 h bestätigt werden konnte (jeweils $p < 0,001$).

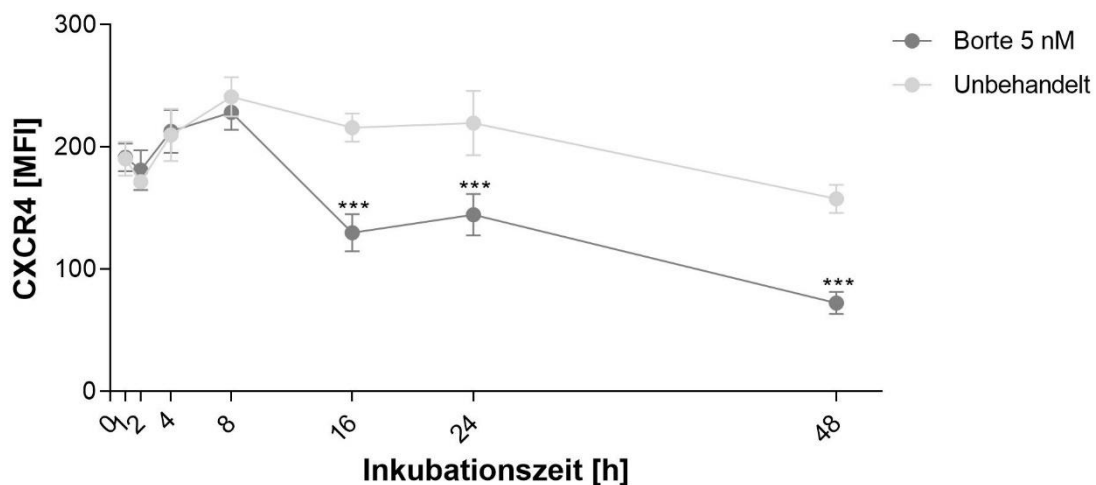


Abbildung 15: Einfluss von Bortezomib auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf.

Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation der Zellen mit Bortezomib. Je Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Referenz mitgeführt. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 3$. Test auf Signifikanz mittels Two-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** $p < 0,001$).

Auch auf die Zugabe von **Cyclophosphamid** reagierten die Zellen nicht sofort (siehe Abbildung 16). Erstmalig 8 h nach Substanzzugabe manifestierte sich eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikante Abnahme der Rezeptorexpression, welche auch bei Inkubationszeiten von 16 h und 24 h nachweisbar blieb (jeweils $p < 0,001$).

Nach 48 h Behandlungsdauer war dieser Effekt nicht mehr detektierbar, das Expressionsniveau der behandelten Zellen entsprach dem der unbehandelten Zellen ($p > 0,999$).

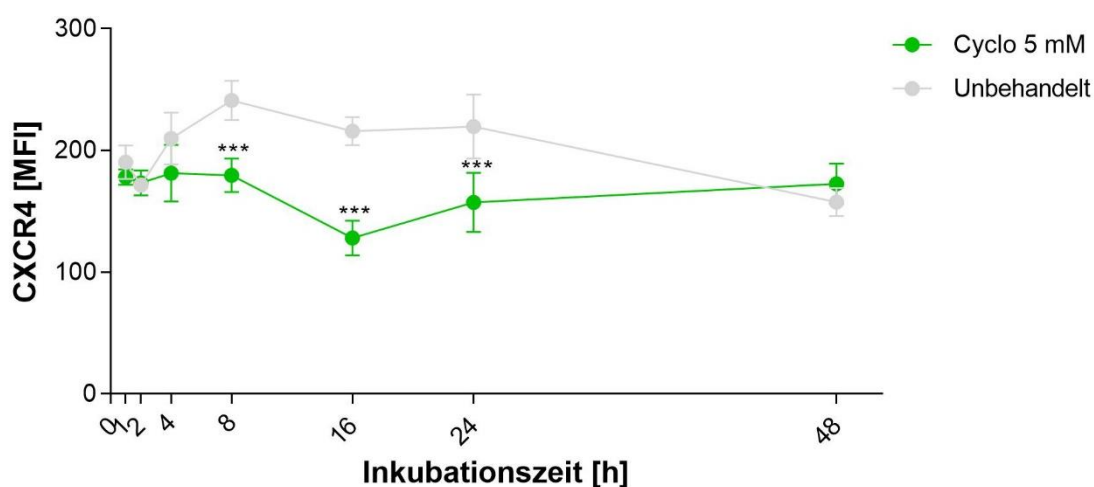


Abbildung 16: Einfluss von Cyclophosphamid auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation der Zellen mit Cyclophosphamid. Je Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Referenz mitgeführt. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 3$. Test auf Signifikanz mittels Two-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$.

Der Einfluss der **Dexamethason**-Behandlung auf die CXCR4-Oberflächenexpression im Zeitverlauf ist in Abbildung 17 dargestellt.

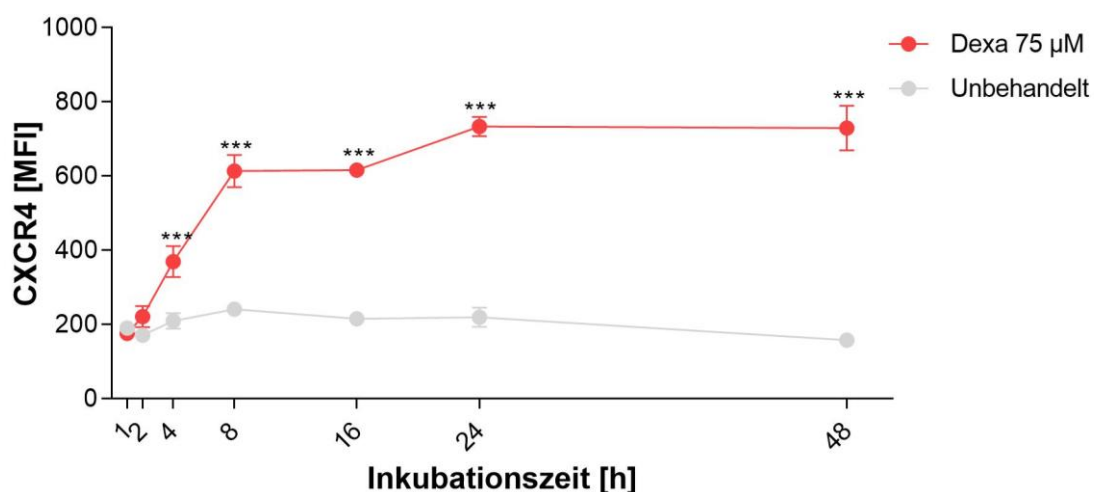


Abbildung 17: Einfluss von Dexamethason auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation der Zellen mit Dexamethason. Je Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Referenz mitgeführt. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 3$. Test auf Signifikanz mittels Two-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$.

Bereits die vierstündige Inkubation mit Dexamethason führte zu einer signifikanten Zunahme der CXCR4-Expression ($p < 0,001$). Dieser Effekt zeigte sich durch eine Behandlungsdauer von 8 h deutlich steigerbar. Das Ausmaß der Expressionssteigerung infolge der 16-stündigen Inkubation mit Dexamethason entsprach dem der 8 h-Behandlung (jeweils $p < 0,001$). Die 24-stündige Inkubation der Zellen war mit einem weiteren Anstieg des Rezeptorexpressionsniveaus verbunden, welches auch bei einer Inkubationsdauer von 48 h wieder erreicht wurde (jeweils $p < 0,001$).

Das Expressionsniveau der mit **Doxorubicin** behandelten Zellen entsprach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h nach Substanzzugabe dem der unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 18). Die 24-stündige Inkubation war mit einem signifikanten Anstieg der CXCR4-Expression verbunden, der auch bei den für 48 h mit Doxorubicin inkubierten Zellen nachweisbar blieb (jeweils $p < 0,001$).

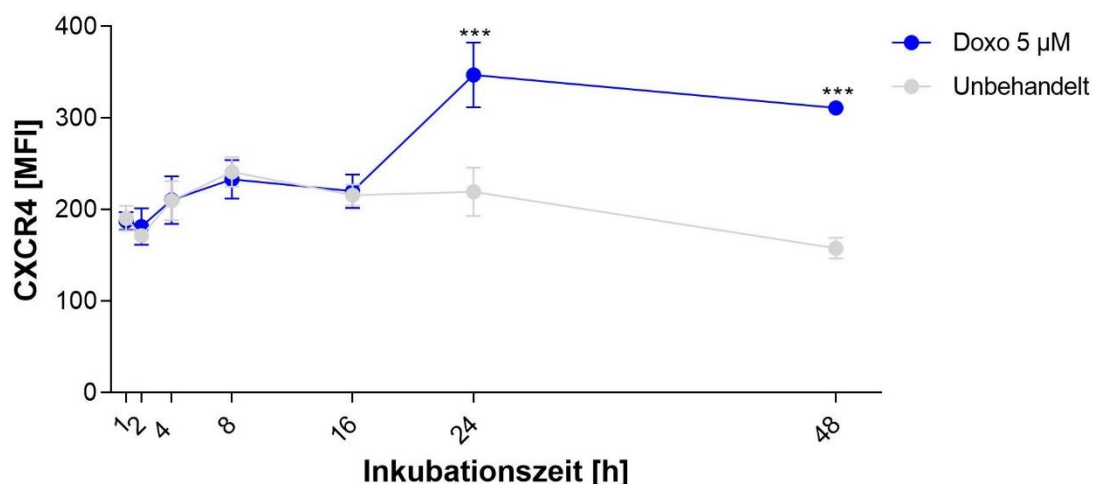


Abbildung 18: Einfluss von Doxorubicin auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation der Zellen mit Doxorubicin. Je Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Referenz mitgeführt. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 3$. Test auf Signifikanz mittels Two-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$.

Die Behandlung mit **Lenalidomid** bewirkte 24 h nach Substanzzugabe eine signifikante Änderung der CXCR4-Oberflächenexpression, die auch bei 48 h Inkubationszeit noch nachweisbar war (jeweils $p < 0,001$) (siehe Abbildung 19). Das Rezeptorexpressionsniveau der kürzer inkubierten Zellen unterschied sich dagegen nicht signifikant von dem der unbehandelten Zellen.

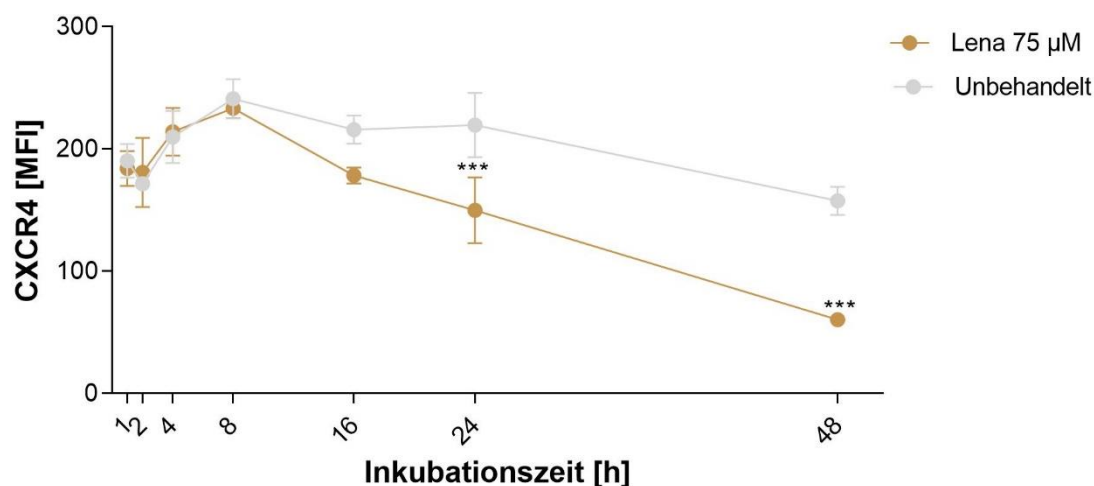


Abbildung 19: Einfluss von Lenalidomid auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen im Zeitverlauf. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 1, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h Inkubation der Zellen mit Lenalidomid. Je Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Referenz mitgeführt. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 3$. Test auf Signifikanz mittels Two-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** $p < 0,001$).

Auf Basis dieser Daten wurde die Inkubationszeit von 48 h, die bei allen untersuchten Substanzen mit dem stabilsten Effekt hinsichtlich der CXCR4-Expressionsänderung assoziiert war, als Standard für die nachfolgenden Zelllinien-Experimente festgelegt.

3.2.3 Substanzabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression von MM-Zelllinien

Aufbauend auf den Voruntersuchungen zur Ermittlung der Substanzkonzentrationen und der Inkubationszeit folgten in einem nächsten Schritt die systematischen Analysen zum Einfluss der verschiedenen MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression. Hierfür wurden unbehandelte und behandelte Zellen der MM-Zelllinien OPM-2, INA-6, AMO-1 und MM1.S durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse für die **OPM-2-Zelllinie** sind in Abbildung 20 dargestellt (Rohdaten siehe Anhang-Tabelle A1). Die OPM-2-Zellen reagierten auf die 48-stündige Bortezomib-Behandlung mit einer signifikanten Abnahme der CXCR4-Expression ($p = 0,007$). Dagegen zeigte die Inkubation mit Cyclophosphamid keinen relevanten Effekt auf die Rezeptorexpression der Zellen. Dies galt sowohl für die getestete Konzentration von $50 \mu\text{M}$ als auch die deutlich höhere Konzentration von 5 mM (jeweils $p > 0,999$). Zu einer signifikanten Steigerung der CXCR4-Expression führte die Behandlung mit Dexamethason ($75 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$; jeweils $p < 0,001$). Ebenfalls in einer Zunahme der CXCR4-Expression

resultierte die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin ($p < 0,001$). Die Zellen, die mit Lenalidomid (75 μM , 100 μM) inkubiert worden waren, wiesen eine signifikant reduzierte Rezeptorexpression auf ($p_{75\mu\text{M}} = 0,001$, $p_{100\mu\text{M}} = 0,002$).

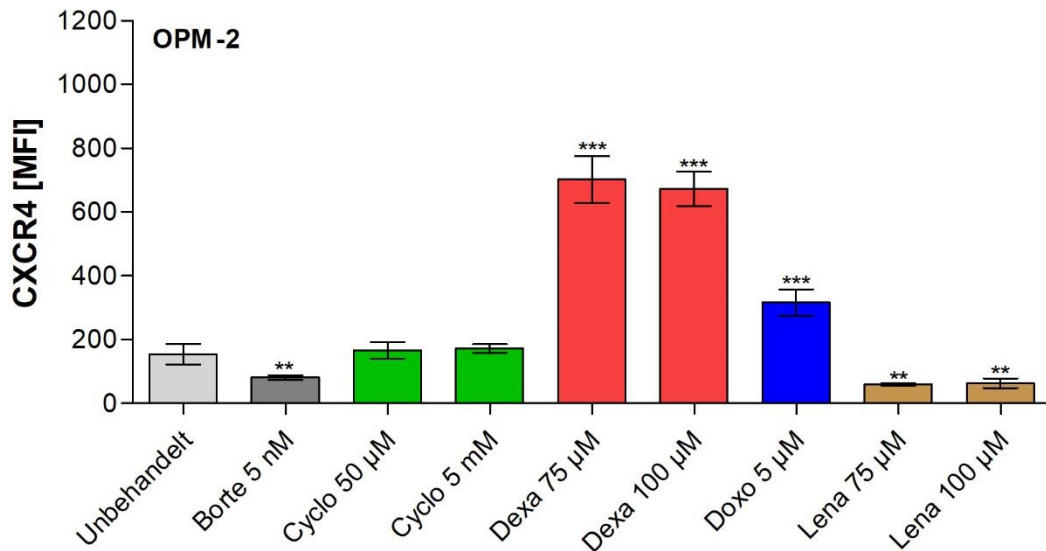


Abbildung 20: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 4-6$. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Der Einfluss von Dexamethason und Doxorubicin auf die CXCR4-Oberflächenexpression der OPM-2-Zellen wurde zusätzlich mittels dSTORM-Mikroskopie untersucht. Dabei bestätigten die mikroskopischen Analysen die durchflusszytometrischen Daten (siehe Tabelle 13): Infolge der Dexamethason-Behandlung zeigte sich bei annähernd gleichbleibendem Zelldurchmesser ein Anstieg der Rezeptorzahl pro Flächeneinheit als auch pro Zelle. Dieser war unter der Konzentration von 40 nM deutlich ausgeprägter als unter der IC_{50} -Konzentration von 75 μM . Auch die unter der Doxorubicin-Behandlung festgestellte CXCR4-Expressionszunahme konnte dSTORM-mikroskopisch erfasst werden. Bei einem im Vergleich zu unbehandelten Zellen vergrößerten Zelldurchmesser (12,1 μm vs. 16,7 μm) ließ sich eine Zunahme der Rezeptorzahl pro Zelle nachweisen, die Rezeptorzahl pro Flächeneinheit blieb hingegen annähernd konstant.

Tabelle 13: dSTORM-mikroskopische Analyse der CXCR4-Expression von behandelten OPM-2-Zellen. Übersicht über die dSTORM-mikroskopisch bestimmten Parameter Zelldurchmesser, Rezeptorzahl pro μm^2 sowie pro Zelle von unbehandelten und behandelten OPM-2-Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW \pm SD. Je Behandlungsmodalität wurden 13-15 Zellen untersucht. Die dSTORM-mikroskopischen Analysen, einschließlich der Zellfärbung und der Auswertung, wurden von Patrick Eiring (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik) durchgeführt; Genehmigung liegt vor.

	Zelldurchmesser (μM)	Rezeptorzahl/ μm^2	Rezeptorzahl/Zelle
Unbehandelt	11,0 \pm 3,0	6,0 \pm 4,1	2266,9 \pm 1562,6
Dexa 40 nM	10,9 \pm 1,4	17,0 \pm 5,4	6339,0 \pm 1993,1
Dexa 75 μM	10,5 \pm 1,3	9,7 \pm 3,8	3377,6 \pm 1324,1
Doxo 5 μM	15,6 \pm 3,5	8,1 \pm 4,6	6220,8 \pm 3551,7

Um den beobachteten Effekt von Doxorubicin auf den Zelldurchmesser zu verifizieren, wurden zusätzlich lichtmikroskopische Analysen durchgeführt. Diese bestätigten eine zeitabhängige Zunahme der Zellgröße infolge der Doxorubicin-Behandlung (siehe Abbildung 21).

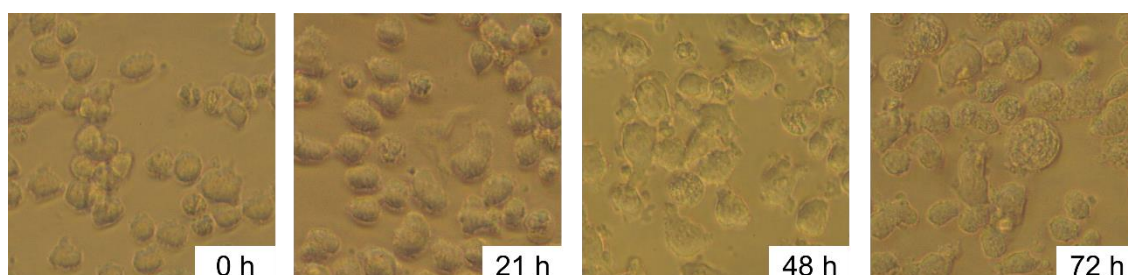


Abbildung 21: Einfluss von Doxorubicin auf die Zellgröße im Zeitverlauf. Lichtmikroskopische Aufnahmen von OPM-2-Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 21 h, 48 h und 72 h nach der Zugabe von 5 μM Doxorubicin. Es zeigt sich eine optisch fassbare Zunahme des Zelldurchmessers im Zeitverlauf.

Die in der **INA-6-Zelllinie** ermittelten Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression sind in Abbildung 22 zusammengefasst (Rohdaten siehe Anhang-Tabelle A2). Infolge der Behandlung mit Bortezomib zeigten die INA-6-Zellen die Tendenz einer reduzierten CXCR4-Expression, welche allerdings nicht signifikant war. Auch die Inkubation mit Cyclophosphamid (50 μM , 5 mM) war mit keinem signifikanten Effekt auf die Rezeptorexpression verbunden. Im Gegensatz dazu führte die Dexamethason-Behandlung (10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM) zu einem deutlichen Anstieg der CXCR4-Expression (jeweils $p < 0,001$). Indem verschiedene Dexamethason-Konzentrationen getestet wurden, konnte zudem eine Konzentrationsabhängigkeit des expressionssteigernden Effekts dieser Substanz identifiziert werden. Im Konzentrationsbereich von 25 μM bis 75 μM ließ sich eine kontinuierliche Zunahme der Rezeptor-

expression nachweisen (p_1, p_2 jeweils $< 0,001$), die sich bei Erhöhung der Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ Dexamethason wieder rückläufig zeigte. Keine relevante Veränderung der CXCR4-Oberflächenexpression bewirkte die Behandlung der INA-6-Zellen mit Doxorubicin ($p > 0,999$). Die Inkubation der Zellen mit Lenalidomid in einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ führte zu einer signifikant gesteigerten CXCR4-Expression ($p = 0,008$). Unter der Behandlung mit einer geringeren ($17 \mu\text{M}$, $p > 0,999$) als auch einer höheren Lenalidomid-Konzentration ($100 \mu\text{M}$, $p = 0,283$) war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

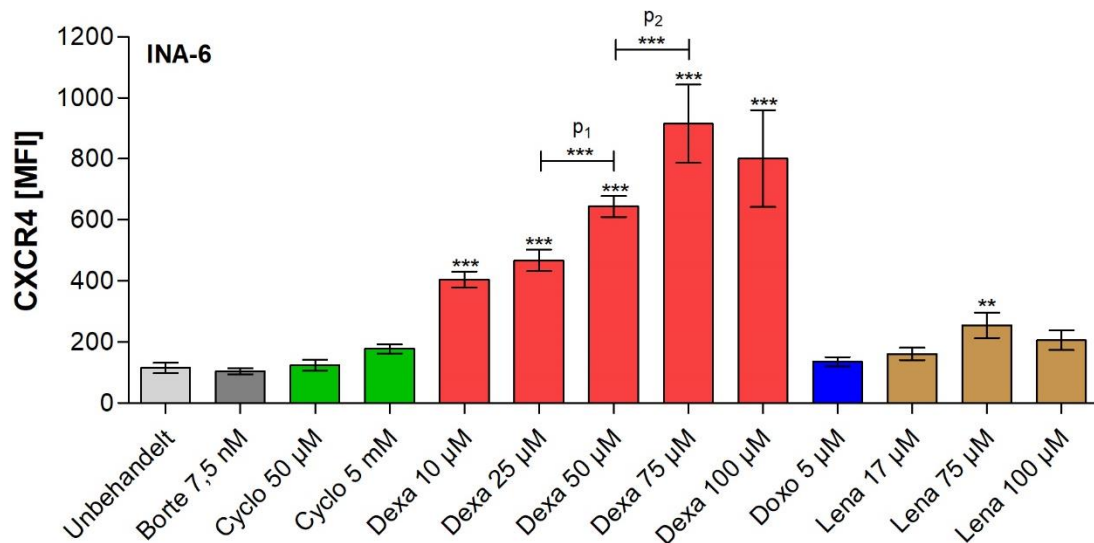


Abbildung 22: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 4-6$. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die **AMO-1-Zelllinie** zeigte ausschließlich unter der Behandlung mit Doxorubicin eine signifikante Änderung der CXCR4-Oberflächenexpression (siehe Abbildung 23; Anhang-Tabelle A3). Diese präsentierte sich in Form einer Rezeptorhochregulation ($p < 0,001$). Bei den anderen vier getesteten Substanzen deutete sich jeweils eine Änderung der Rezeptorexpression an, die allerdings in keinem der Fälle signifikant war. So zeigten die mit Bortezomib und Lenalidomid behandelten Zellen eine tendenziell reduzierte CXCR4-Expression, während sich bei den mit Cyclophosphamid und Dexamethason inkubierten Zellen der Trend einer gesteigerten Rezeptorexpression abzeichnete.

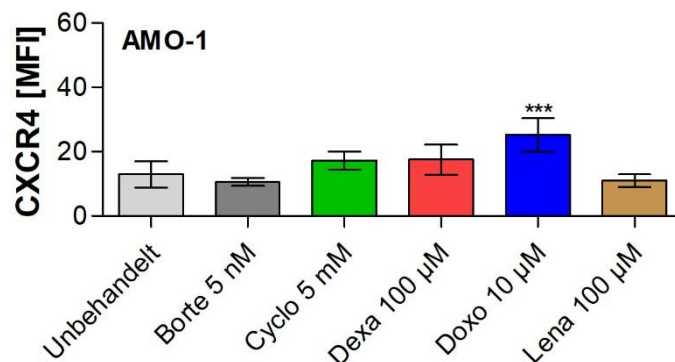


Abbildung 23: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von AMO-1-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin, und Lenalidomid. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 4-6$. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$.

Eine signifikante Veränderung der CXCR4-Expression konnte in der **MM1.S-Zelllinie** durch zwei Substanzen erreicht werden (siehe Abbildung 24; Anhang-Tabelle A4).

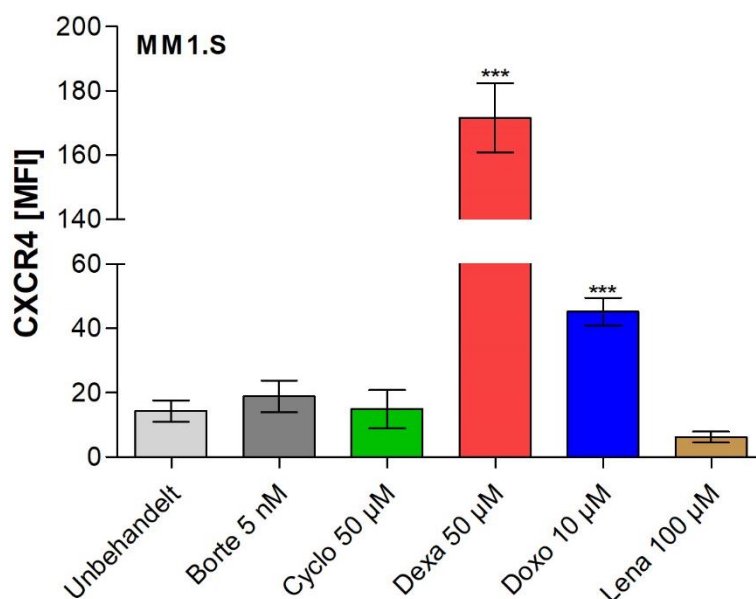


Abbildung 24: Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von MM1.S-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Lenalidomid. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 4-6$. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$.

Auf die Behandlung mit Dexamethason reagierten die MM1.S-Zellen mit einem 12-fach erhöhten Anstieg des Expressionsniveaus ($p < 0,001$). Auch die mit Doxorubicin behandelten Zellen zeigten eine signifikant erhöhte CXCR4-Expression ($p < 0,001$). Infolge der Inkubation mit den Substanzen Bortezomib, Cyclophosphamid und Lenalidomid ließen

sich dagegen keine relevanten Veränderungen des Expressionsniveaus nachweisen (jeweils $p > 0,999$, außer $p_{\text{Lena}} = 0,254$).

Tabelle 14 fasst die durch die einzelnen MM-Therapeutika hervorgerufenen Effekte auf die CXCR4-Oberflächenexpression der MM-Zelllinien zusammen. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib führte mehrheitlich zu einer Reduktion der Rezeptorexpression, welche jedoch nur bei den OPM-2-Zellen signifikant war. Das Alkylans Cyclophosphamid erzielte trotz der hohen eingesetzten Konzentrationen bei keiner der getesteten Zelllinien eine signifikante Veränderung der CXCR4-Expression. Mit Ausnahme der AMO-1-Zellen reagierten alle Zelllinien mit einem deutlichen Anstieg der Rezeptorexpression auf die Dexamethason-Behandlung. Auch die Inkubation mit Doxorubicin resultierte bei drei der vier getesteten Zelllinien in einer signifikanten Hochregulation von CXCR4. Weniger konstant präsentierte sich der Einfluss des IMiD Lenalidomid auf die CXCR4-Expression: Während für die Zelllinien AMO-1 und MM1.S keine signifikanten Effekte nachweisbar waren, führte die Lenalidomid-Behandlung bei den OPM-2-Zellen zu einem Abfall und bei den INA-6-Zellen zu einem Anstieg der CXCR4-Expression.

Tabelle 14: Zusammenfassung der durch die Monotherapie regime hervorgerufenen Effekte auf die CXCR4-Expression

	OPM-2	INA-6	AMO-1	MM1.S
Bortezomib	↓	=	=	=
Cyclophosphamid	=	=	=	=
Dexamethason	↑	↑	=	↑
Doxorubicin	↑	=	↑	↑
Lenalidomid	↓	↑	=	=

3.2.4 Substanzabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression von primären MM-Zellen

Da der Proteasominhibitor Bortezomib zentraler Bestandteil vieler MM-Therapie regime ist, wurde dessen Effekt auf die CXCR4-Oberflächenexpression nicht nur in MM-Zelllinien, sondern auch in primären MM-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 25).

Sechs der acht Patientenproben reagierten mit einer Reduktion der Rezeptorexpression auf die zweistündige Behandlung mit Bortezomib. Die Effekte in den anderen zwei Proben zeigten kein einheitliches Muster: Für das Zellmaterial von Patient P1, das generell

eine sehr niedrige basale Expression aufwies, konnte kein relevanter Effekt der Bortezomib-Behandlung auf die CXCR4-Expression nachgewiesen werden. Die von Patient P5 stammenden Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Expressionszunahme infolge der Substanzinkubation.

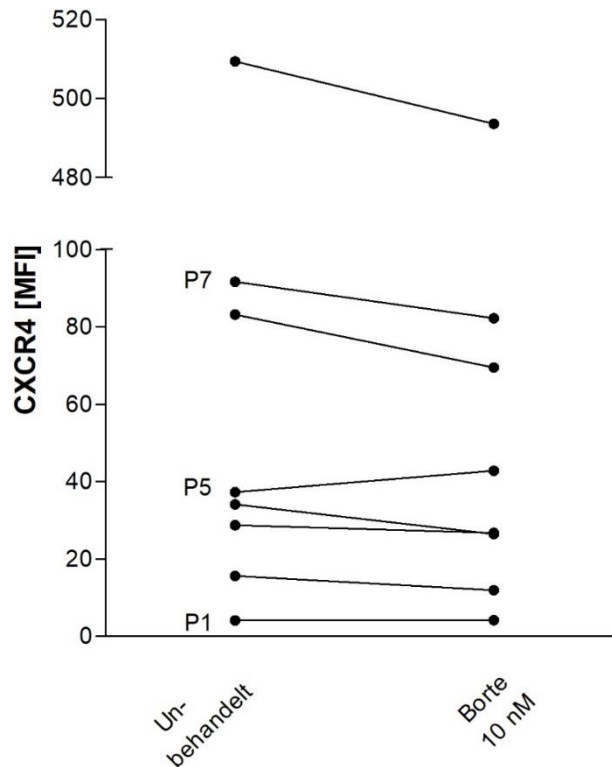


Abbildung 25: Einfluss von Bortezomib auf die CXCR4-Expression von primären MM-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach zweistündiger Inkubation der Patientenproben mit 10 nM Bortezomib. Die Zellen reagierten mehrheitlich mit einem Abfall der Rezeptorexpression auf die Behandlung. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) je Patient.

Ergänzend zu den durchflusszytometrischen Analysen wurden behandelte Zellen von Patient P7 auch dSTORM-mikroskopisch untersucht. Neben Bortezomib (10 nM) wurde dabei auch Dexamethason (40 nM) hinsichtlich seines Effekts auf die CXCR4-Expression analysiert (siehe Abbildung 26). Während die infolge der Bortezomib-Behandlung erwartete Abnahme der Rezeptorexpression dSTORM-mikroskopisch kaum fassbar war, ließ sich auf den mit Dexamethason behandelten Zellen eine deutliche Zunahme der Rezeptorzahl an der Zelloberfläche nachweisen ($p < 0,001$).

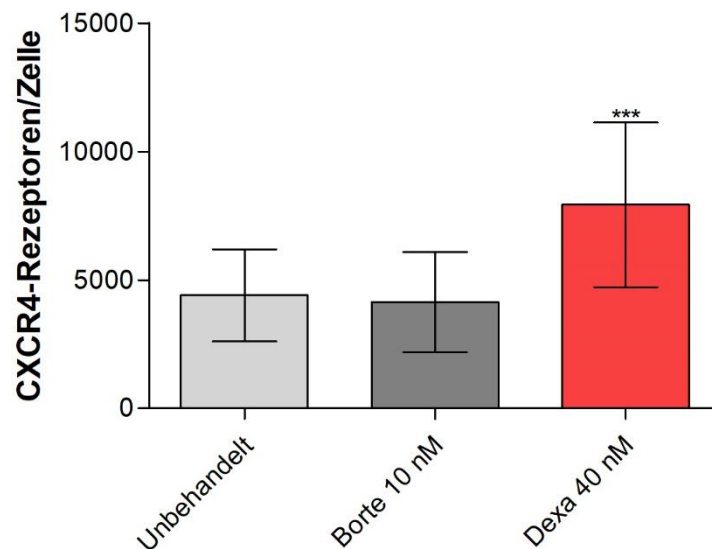


Abbildung 26: dSTORM-mikroskopische Analyse der CXCR4-Expression behandelter primärer MM-Zellen. Graphische Aufarbeitung der dSTORM-mikroskopisch bestimmten Rezeptorzahl pro Zelle von unbehandelten und behandelten Zellen der Patientenprobe P7. Je Behandlungsmodalität wurden 10-24 Zellen untersucht. Die Daten sind in Form von MW \pm SD dargestellt. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$). Die dSTORM-mikroskopischen Analysen, einschließlich der Zellfärbung und der Auswertung, wurden von Patrick Eiring (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik) durchgeführt; Genehmigung liegt vor.

3.3 Effekte von Kombinationstherapieregimen in MM-Zellen

3.3.1 Proliferationsreduktion durch Kombinationstherapieregime *in vitro*

Aufgrund des überwiegenden Einsatzes von Kombinationstherapieregimen in der Myelombehandlung wurde auch deren Einfluss auf die CXCR4-Oberflächenexpression von MM-Zellen untersucht. Getestet wurden die Zweifachkombinationen Bortezomib/Dexamethason und Doxorubicin/Dexamethason, die Bestandteil vieler Therapiekonzepte sind. Wegen ihrer hohen basalen CXCR4-Expression wurden die Zelllinien OPM-2 und INA-6 für die Analysen herangezogen.

Analog dem Vorgehen bei den Monotherapieregimen wurden für die beiden Kombinationstherapieregime zunächst die IC_{50} -Konzentrationen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit Substanzlösungen behandelt, die Bortezomib bzw. Doxorubicin in konstanter Konzentration und Dexamethason in aufsteigender Konzentration (0/25/50/75/100 μ M) enthielten.

Die daraus resultierenden Dosis-Wirkungskurven der **OPM-2-Zelllinie** sind in Abbildung 27 dargestellt. Im Therapieregime Bortezomib/Dexamethason zeigte sich die infolge der Bortezomib-Monotherapie hervorgerufene Proliferationsreduktion durch

Kombination mit Dexamethason konzentrationsabhängig steigerbar. Da in der Kombination Bortezomib + 100 μM Dexamethason kaum noch vitale Zellen in der Zellsuspension vorhanden waren, wurde als IC_{50} die Kombination Bortezomib + 75 μM Dexamethason gewählt.

Der Zusatz von 25 μM Dexamethason führte auch in der Kombination Doxorubicin/Dexamethason zu einer im Vergleich zur Doxorubicin-Monotherapie gesteigerten Proliferationsreduktion bei den OPM-2-Zellen. Die weitere Eskalation der Dexamethason-Konzentration war jedoch nur mit geringgradig additiven Effekten auf das Proliferationsniveau verbunden, welches bei einer Proliferationsrate von ca. 60 % stagnierte und damit die IC_{50} -Schwelle nicht erreichte. Den größten proliferationsreduzierenden Effekt zeigte die Kombination Doxorubicin + 75 μM Dexamethason, sie wurde als IC_{50} definiert.

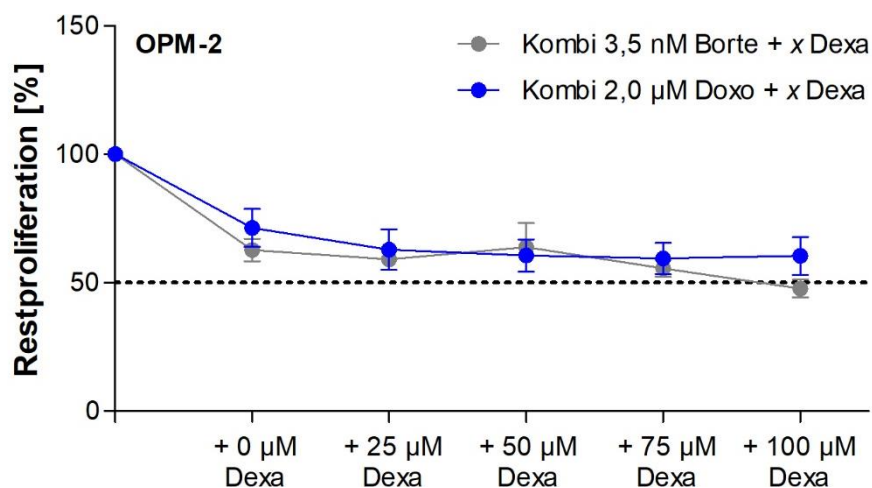


Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven der OPM-2-Zelllinie für Kombinationstherapieregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason (25/50/75/100 μM) kombiniert mit konstanten Konzentrationen von Bortezomib (3,5 nM) bzw. Doxorubicin (2 μM). Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%; bezogen auf unbehandelte Zellen) als MW \pm SD; n = 3-4.

Bei der **INA-6-Zelllinie** konnte der IC_{50} -Wert für beide Substanzkombinationen erreicht werden (siehe Abbildung 28). Sowohl bei Bortezomib als auch bei Doxorubicin resultierte die Kombination mit Dexamethason in einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Proliferationsreduktion. Als IC_{50} wurde jeweils die Kombination Bortezomib bzw. Doxorubicin + 50 μM Dexamethason gewählt.

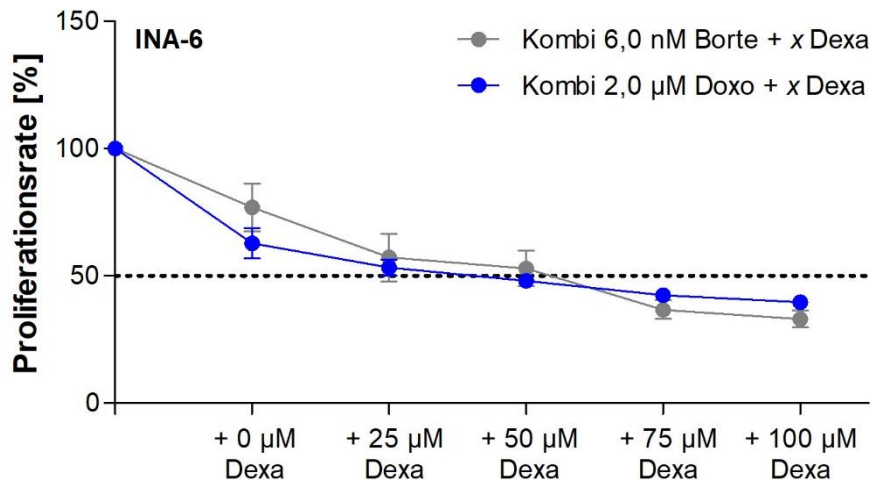


Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven der INA-6-Zelllinie für Kombinationstherapieregime. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason (25/50/75/100 µM) kombiniert mit konstanten Konzentrationen von Bortezomib (6 nM) bzw. Doxorubicin (2 µM). Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (%), bezogen auf unbehandelte Zellen) als MW ± SD; n = 3-4.

3.3.2 Kombinationsabhängige Effekte der MM-Therapeutika auf die CXCR4-Oberflächenexpression

Im nächsten Schritt folgten durchflusszytometrische Analysen zum Einfluss der Kombinationstherapieregime auf die CXCR4-Oberflächenexpression von OPM-2- und INA-6-Zellen. Um die hervorgerufenen Effekte besser quantifizieren zu können, wurden zusätzlich Zellen, deren Behandlung aus den Einzelkomponenten bestand, mitgeführt.

Die Ergebnisse für die **OPM-2-Zelllinie** sind in Abbildung 29 dargestellt (Rohdaten siehe Anhang-Tabelle A5). Infolge der Kombinationsbehandlung bestehend aus dem expressionsreduzierenden Bortezomib und dem expressionssteigernden Dexamethason zeigten die OPM-2-Zellen ein CXCR4-Expressionsniveau, das sich zwischen den Niveaus der mit den Einzelsubstanzen behandelten Zellen einordnete: Einerseits war es signifikant höher als das der allein mit Bortezomib inkubierten Zellen, andererseits deutlich geringer als das der lediglich mit Dexamethason behandelten Zellen (p_1 , p_2 jeweils $< 0,001$).

Die Inkubation der OPM-2-Zellen mit der Kombination Doxorubicin/Dexamethason führte dagegen zu einer überadditiven Steigerung der CXCR4-Expression. Das Ausmaß der nachgewiesenen Expressionsänderung war nicht nur signifikant größer als die nur marginal ausgeprägte Expressionszunahme infolge der Doxorubicin-Einzelbehandlung, sondern übertraf auch die hochgradige Expressionssteigerung der alleinigen Dexamethason-Behandlung (p_3 , p_4 jeweils $< 0,001$).

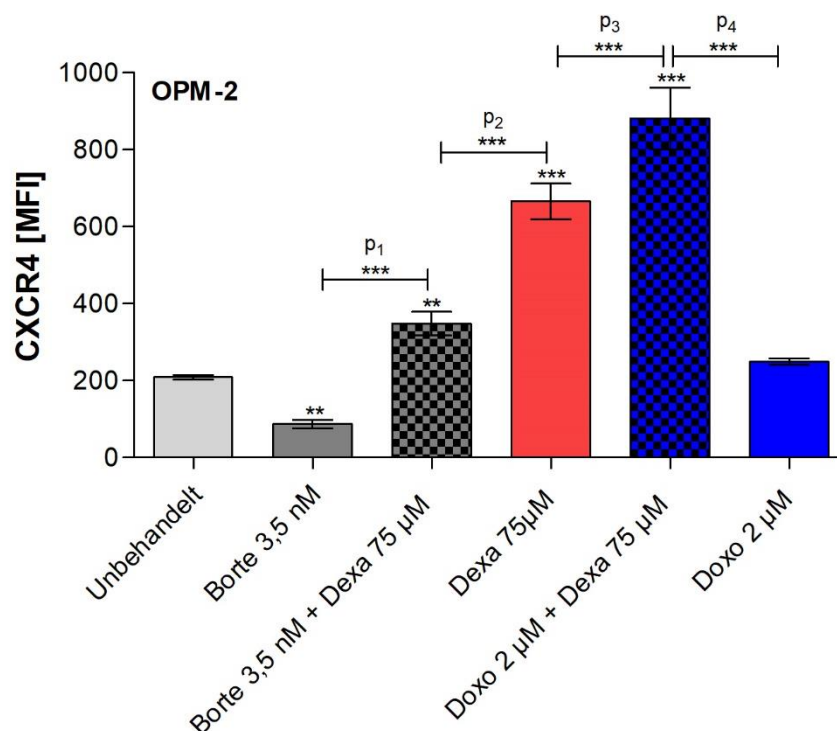


Abbildung 29: Einfluss von Kombinationstherapieregimen auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit den Substanzkombinationen Bortezomib/Dexamethason und Doxorubicin/Dexamethason sowie den entsprechenden Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von MW \pm SD; n = 4-6. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Abbildung 30 fasst die in der **INA-6-Zelllinie** ermittelten Effekte der Kombinationstherapieregime zusammen (Rohdaten siehe Anhang-Tabelle A6). Auch in dieser Zelllinie zeigte sich, dass durch die Doxorubicin/Dexamethason-Kombinationsbehandlung die CXCR4-Expression zusätzlich steigerbar ist: Das Expressionsniveau der mit dem Kombinationstherapieregime behandelten Zellen lag nicht nur deutlich über dem der ausschließlich mit Doxorubicin inkubierten Zellen, in denen keine signifikante Änderung der CXCR4-Expression nachweisbar war, sondern auch über dem der allein mit Dexamethason behandelten Zellen, die ein signifikant gesteigertes Expressionsniveau auszeichnete (p₃, p₄ jeweils < 0,001).

Infolge der Inkubation mit der Substanzkombination Bortezomib/Dexamethason präsentierten die INA-6-Zellen ein signifikant gesteigertes Expressionsniveau. Es entsprach dem Expressionsniveau der allein mit Dexamethason behandelten Zellen (p₂ > 0,999); ein Einfluss des Kombinationspartners Bortezomib, der auch in der Einzelbehandlung keinen signifikanten Effekt auf die CXCR4-Expression zeigte, war nicht zu erkennen.

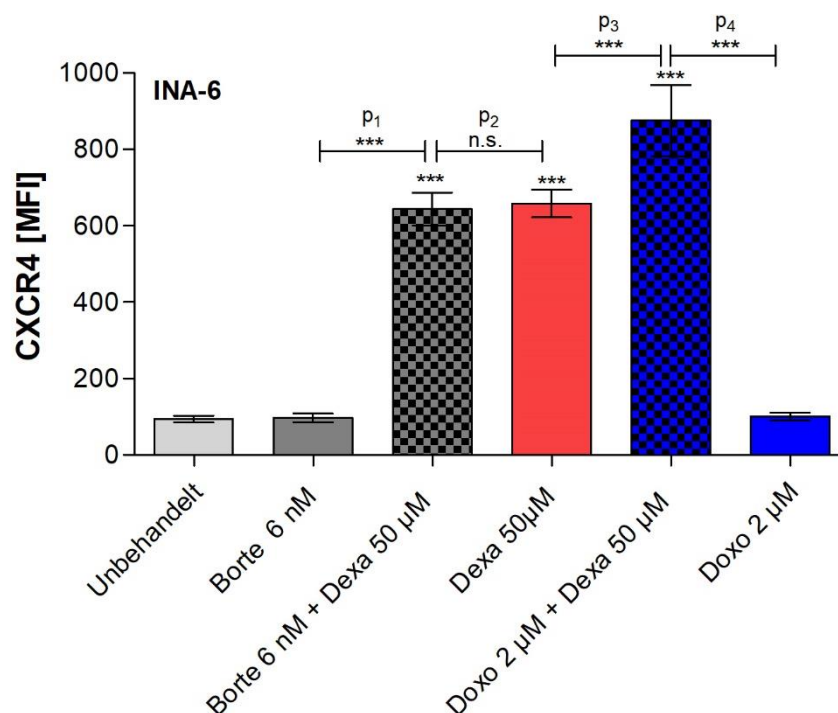


Abbildung 30: Einfluss von Kombinationstherapieregimen auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit den Substanzkombinationen Bortezomib/Dexamethason und Doxorubicin/Dexamethason sowie den entsprechenden Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von MW \pm SD; n = 4-6. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (***) $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

3.4 Effekte der MM-Therapeutika auf das *in vitro* Uptake-Verhalten

3.4.1 [¹⁸F]FDG-Uptake

Aufgrund des Stellenwerts von [¹⁸F]FDG als Standardtracer in der Myelomdiagnostik zur Detektion stoffwechselaktiver Läsionen wurde der Einfluss der MM-Therapeutika auf dessen Aufnahmeverhalten untersucht. Als Modellzelllinie für diese Analysen wurde OPM-2 herangezogen (siehe Abbildung 31; Anhang-Tabelle A7).

Die Inkubation der Zellen mit den MM-Therapeutika führte mehrheitlich zu einer Reduktion der [¹⁸F]FDG-Aufnahme. Dieser Effekt war für Dexamethason ($p < 0,001$), Lenalidomid ($p < 0,001$) sowie das Kombinationstherapieregime Doxorubicin/Dexamethason ($p = 0,002$) signifikant, während die unter der Behandlung mit Bortezomib beobachtete Tendenz zur Abnahme das Signifikanzniveau nicht erreichte. Die Cyclophosphamid-Behandlung war mit keinem relevanten Effekt auf das Uptake-Verhalten assoziiert. Keine reduzierte, sondern eine deutlich gesteigerte [¹⁸F]FDG-Aufnahme zeigten die mit Doxorubicin behandelten Zellen ($p < 0,001$).

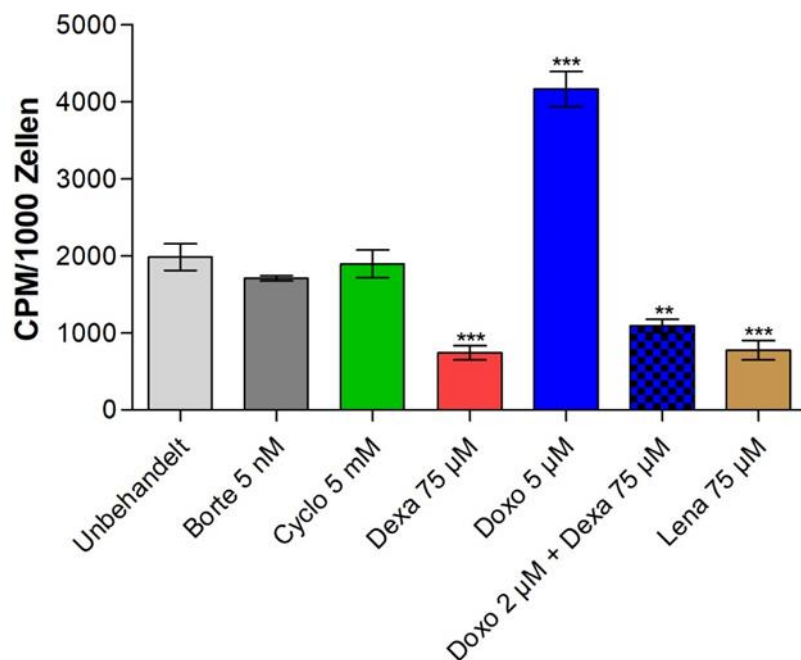


Abbildung 31: Einfluss von MM-Therapeutika auf die [¹⁸F]FDG-Aufnahme von OPM-2-Zellen. Untersuchung des [¹⁸F]FDG-Uptakes nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin, Lenalidomid sowie der Kombination Dexamethason/Doxorubicin im Gamma-counter. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und hinsichtlich Hintergrundaktivität sowie radioaktiven Zerfalls korrigiert. Dargestellt sind die Zerfälle pro Minute je 1000 Zellen (CPM) als MW + SEM; n = 4. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** p < 0,01, *** p < 0,001).

3.4.2 [⁶⁸Ga]Pentixafor-Uptake

Um die Funktionalität der therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen zu prüfen, wurden Uptake-Versuche mit dem klinisch eingesetzten, radioaktiv markierten CXCR4-Liganden [⁶⁸Ga]Pentixafor durchgeführt. In Analogie zu den Uptake-Versuchen mit [¹⁸F]FDG wurde auch für diese Analysen die OPM-2-Zelllinie als Modellzelllinie gewählt (siehe Abbildung 32; Anhang-Tabelle A8).

Sowohl die Bortezomib- als auch die Lenalidomid-Behandlung der OPM-2-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der [⁶⁸Ga]Pentixafor-Bindung ($p_{\text{Borte}} = 0,010$, $p_{\text{Lena}} < 0,001$). Die mit Cyclophosphamid inkubierten Zellen zeigten kein signifikant verändertes Uptake-Verhalten. Unter der Behandlung mit Dexamethason ließ sich ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachten: Auf die Behandlung mit 40 nM Dexamethason reagierten die Zellen mit einer deutlichen Zunahme der Tracerbindung ($p < 0,001$). In geringerer Ausprägung zeigte sich diese auch bei einer Konzentration von 25 µM ($p = 0,002$). Unter der IC_{50} -Konzentration von 75 µM war keine signifikante Änderung des [⁶⁸Ga]Pentixafor-Uptakes mehr nachweisbar ($p > 0,999$). Die allein mit Doxorubicin inkubierten Zellen präsentierten eine deutlich gesteigerte Tracer-

bindung ($p < 0,001$). In der Kombination mit $75 \mu\text{M}$ Dexamethason konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden, das Uptake-Verhalten der mit dem Kombinationstherapieregime Doxorubicin/Dexamethason behandelten Zellen entsprach dem der unbehandelten ($p > 0,999$).

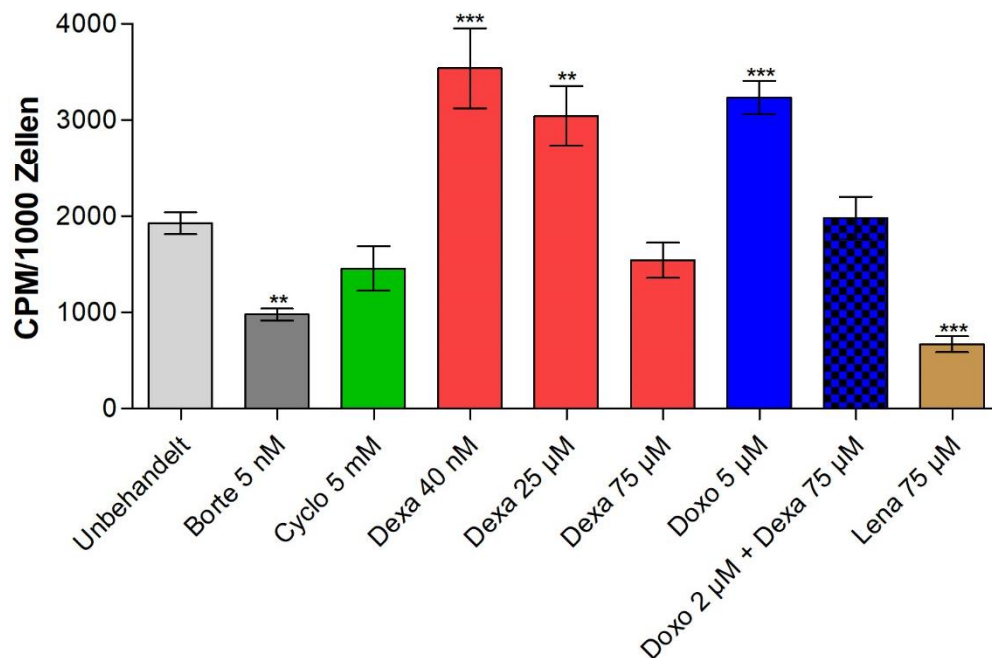


Abbildung 32: Einfluss von MM-Therapeutika auf die $[^{68}\text{Ga}]$ Pentixafor-Bindung von OPM-2-Zellen. Untersuchung des $[^{68}\text{Ga}]$ Pentixafor-Uptakes nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin, Lenalidomid sowie der Kombination Dexamethason/Doxorubicin im Gammacounter. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und hinsichtlich Hintergrundaktivität sowie radioaktiven Zerfalls korrigiert. Dargestellt sind die Zerfälle pro Minute je 1000 Zellen (CPM) als MW + SEM; $n = 3-6$. Test auf Signifikanz mittels One-way-ANOVA- und Bonferroni-Post-Test (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4 Diskussion

4.1 Heterogenität der CXCR4-Oberflächenexpression – Identifikation von Einflussfaktoren

4.1.1 Hintergründe und Herausforderungen

Bei fortgeschrittener Myelomerkrankung, die sich refraktär gegenüber den gängigen Therapieregimen zeigt, gewinnen zunehmend neue, myelomspezifische Therapieansätze an Bedeutung. Als vielversprechender Angriffspunkt hat sich dabei der Chemokinrezeptor CXCR4 hervorgetan [58], [46]. Im Rahmen eines theranostischen Konzepts ermöglicht der Einsatz einer CXCR4-gerichteten PET-Bildgebung mit nachfolgender Rezeptorspezifischen Endoradiotherapie eine optimierte, tumorspezifische Behandlung der MM-Patienten. Erste klinische Einsätze der CXCR4-gerichteten Verfahren in der klinischen Diagnostik und Therapie bestätigten das große Potenzial des theranostischen Ansatzes. Sie machten aber zugleich deutlich, dass sich der heterogene Charakter der Myelomerkrankung auch in Form inter- und intraindividuelle Unterschiede der CXCR4-Expression niederschlägt [43].

Diese Heterogenität gilt derzeit als eine der Hauptlimitationen des generalisierten Einsatzes CXCR4-gerichteter Verfahren, die eine ausreichend hohe sowie homogene Rezeptorexpression voraussetzen. Aktuelle Daten bestätigen, dass der Behandlungserfolg direkt mit der absorbierten Strahlungsdosis korreliert, die wiederum unmittelbar von der Zahl der exprimierten Rezeptoren abhängt [47]. Dass die CXCR4-Expression dabei nicht statisch ist, sondern einen dynamischen Prozess darstellt, der u. a. durch Therapeutika beeinflusst werden kann, ist in der Literatur bereits beschrieben [37], [48]. Inwiefern sich dieser Sachverhalt aber nutzen lässt, um durch gezielte, therapieinduzierte Rezeptorhochregulation die CXCR4-Expression zu optimieren und so die Effektivität der CXCR4-gerichteten Strategien zu steigern, wurde bislang nicht untersucht.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression des MM anhand von systematischen Untersuchungen im Zellmodell analysiert. Die methodische Durchführung der Experimente orientierte sich an etablierten Verfahren unserer Arbeitsgruppe [59].

Um der beschriebenen Heterogenität gerecht zu werden, wurden als *in vitro* Modell vier MM-Zelllinien gewählt, die in den durchflusszytometrischen Analysen deutliche Unterschiede in ihrer basalen CXCR4-Oberflächenexpression aufwiesen (siehe Abbildung 8). Das gleiche Bild zeigte sich auch in den ergänzend eingesetzten primären MM-Zellen. Indem diese nicht nur durchflusszytometrisch, sondern auch dSTORM-mikroskopisch

untersucht worden waren, ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, die inter- und intraindividuelle Heterogenität der CXCR4-Oberflächenexpression auch unter *in vitro* Bedingungen optisch fassbar zu machen (siehe Abbildung 9, 10).

Grundlage aller durchgeführten Experimente bildeten die mittels CFSE-Proliferationsanalysen bestimmten IC_{50} -Konzentrationen für die eingesetzten MM-Therapeutika (siehe Tabelle 12). Die für die Substanzen Bortezomib, Cyclophosphamid und Doxorubicin ermittelten IC_{50} -Werte decken sich mit den in der Literatur für *in vitro* Bedingungen beschriebenen Konzentrationsspannen [60], [61], [62]. Mit Ausnahme des Prodrugs Cyclophosphamid liegen sie im Bereich der klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen [63], [64], [65]. Dies gilt nicht für die Substanzen Dexamethason und Lenalidomid. In deren Fall waren Konzentrationen, die sich an den klinisch maximal zulässigen Dosierungen orientierten, nicht ausreichend, um in den *in vitro* Experimenten signifikante Effekte auf die Proliferation zu erzielen [66]. Auch durch den Einsatz deutlich höherer Konzentrationen konnte weder für Dexamethason noch für Lenalidomid eine 50 %-ige Proliferationsreduktion in den Zellkulturzellen erreicht werden. Dies steht im Einklang mit den von Murray et. al. sowie Schmidt-Hieber et al. publizierten Daten, die für die beiden primär immunmodulatorisch wirkenden Substanzen eine nur gering ausgeprägte Zytotoxizität beschreiben [67], [68].

4.1.2 Inkubationsdauer als Einflussfaktor der therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen

Angesichts der höchst dynamischen Regulation der CXCR4-Expression erscheint es naheliegend, dass auch die Dauer der Substanzinkubation die therapieinduzierten Expressionsveränderungen mitbeeinflusst. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Definition einer optimalen Inkubationszeit für die *in vitro* Experimente. Diese sollte unabhängig vom eingesetzten MM-Therapeutikum mit dem stabilsten Effekt auf die CXCR4-Expressionsänderung verbunden sein. Die hierfür durchgeführten Versuche zur Analyse der Rezeptorexpression nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten demonstrierten eine Zeitabhängigkeit der CXCR4-Regulation (siehe Abbildung 15-19). So führte die Dexamethason-Behandlung bereits bei einer Inkubationsdauer von 4 h zu einer signifikanten Änderung der Rezeptorexpression, die sich durch längere Inkubationszeiten weiter steigerbar zeigte. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Nagase et al. für eosinophile Zellen beschriebenen Rezeptorkinetik infolge einer Dexamethason-Behandlung [69]. Bei den anderen untersuchten MM-Therapeutika (Bortezomib,

Cyclophosphamid, Doxorubicin, Lenalidomid) waren längere Inkubationszeiten (8-24 h) erforderlich, um signifikante Änderungen der CXCR4-Expression zu erzielen.

Die zeitlichen Unterschiede zwischen den Substanzen lassen vermuten, dass in Abhängigkeit vom eingesetzten MM-Therapeutikum unterschiedliche Mechanismen an der Rezeptorregulation beteiligt sind. Sison et al. untersuchten dies für die Substanzen Daunorubicin, Cytarabin und Vincristin, die standardmäßig in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt werden. Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass der frühe Anstieg der CXCR4-Oberflächenexpression infolge der Daunorubicin-Behandlung durch Translokationsvorgänge bedingt ist, während die Rezeptorhochregulation unter Cytarabin vermutlich auf Transkriptionsänderungen beruht. Die unter Vincristin beobachtete Rezeptorabnahme führten sie auf den Mechanismus der Degradation, den Abbau der Rezeptoren in Lysosomen, zurück [70]. Um solche Aussagen auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MM-Therapeutika treffen zu können, sind weiterführende Experimente erforderlich, die neben der CXCR4-Expression an der Zelloberfläche auch den intrazellulären CXCR4-Gehalt sowie die mRNA-Expression des Rezeptors bestimmen. Derartige Versuche könnten außerdem dazu beitragen, den unter der Cyclophosphamid-Behandlung im Zeitverlauf festgestellten Effekt auf die Rezeptorexpression besser einzuordnen. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen war bei Cyclophosphamid die beobachtete Veränderung der CXCR4-Expression zeitlich nicht stabil: Während sich bei Inkubationszeiten von 8 h, 16 h und 24 h eine signifikante Reduktion der Rezeptorexpression zeigte, war dieser Effekt in den für 48 h mit Cyclophosphamid behandelten Zellen nicht mehr nachweisbar. Insbesondere anhand dieses Substanzbeispiels wird deutlich, dass die Zeit ein entscheidender Faktor ist, der die therapieinduzierten CXCR4-Expressionsveränderungen mitbeeinflusst und den es zu berücksichtigen gilt.

4.1.3 Substanz- und Dosisabhängigkeit der therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen

Zahlreiche präklinische und klinische Daten beschreiben einen Einfluss therapeutischer Interventionen auf das dynamische Konstrukt der CXCR4-Expression für verschiedene Erkrankungen [48], [70], [71], dennoch ist über die zugrunde liegenden Regulationsvorgänge auf zellulärer Ebene, insbesondere beim MM, bislang wenig bekannt. Die Vermutung, dass die Expressionsänderungen dabei ausschließlich durch Apoptose bedingt seien, wurde bereits durch verschiedene Studien widerlegt. Wesentlich entscheidender als die Apoptose an sich scheint der „Verursacher“ der Apoptose, das Therapeutikum, zu sein [39], [72]. Aufbauend auf dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit

systematische Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Anti-MM-Substanzen auf die CXCR4-Oberflächenexpression durchgeführt. Die so gewonnenen Daten bestätigen, dass in Abhängigkeit vom eingesetzten MM-Therapeutikum unterschiedliche Effekte auf die Rezeptorexpression zu beobachten sind (siehe Tabelle 14).

Bortezomib

Infolge der Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib war sowohl in den MM-Zelllinien als auch in den primären MM-Zellen durchflusszytometrisch mehrheitlich eine Tendenz zur Reduktion der CXCR4-Expression nachweisbar, welche allerdings nur in der OPM-2 Zelllinie signifikant war. Auch die ergänzend mit primären MM-Zellen durchgeführten dSTORM-mikroskopischen Untersuchungen machten deutlich, dass der expressionsreduzierende Effekt der Bortezomib-Behandlung nur marginal ausgeprägt ist: Optisch war die Abnahme der Rezeptorzahl an der Zelloberflächen kaum fassbar (siehe Abbildung 26). Damit stehen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Daten, die teils einen reduzierenden Effekt von Bortezomib auf die CXCR4-Expression beschreiben [73], [74], teils einen Einfluss aber auch gänzlich negieren [58], [75]. Zusammenfassend weist die inhomogene Datenlage darauf hin, dass die infolge der Bortezomib-Behandlung beobachtete Expressionsänderung die Heterogenität zwischen den verschiedenen MM-Zelltypen nur eingeschränkt überwinden kann. So ist es durchaus möglich, dass die lediglich in der OPM-2-Zelllinie signifikant nachweisbare Reduktion der CXCR4-Expression durch das besondere genetische Profil dieser Zelllinie bedingt ist. In Patientenstudien konnte für den zytogenetischen Subtyp t(4;14), der auch für die OPM-2-Zelllinie beschrieben ist, unter Bortezomib-haltigen Therapieregimen das beste therapeutische Ansprechen erzielt werden [76].

Cyclophosphamid

Eindeutiger lässt sich der Effekt von Cyclophosphamid auf die CXCR4-Oberflächenexpression beschreiben. In den durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation mit dem Alkylans, das zu den Prodrugs zählt, bei keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikanter Effekt auf die Rezeptorexpression. Einerseits erscheint der fehlende Einfluss aufgrund der im Zellmodell nicht vorhandenen hepatischen Bioaktivierung naheliegend [77], andererseits konnte unter der in dieser Arbeit getesteten Konzentration von 5 mM Cyclophosphamid durchaus eine signifikante Proliferationsreduktion erzielt werden. Auch in den Untersuchungen zum Einfluss der Cyclophosphamid-Behandlung im Zeitverlauf war in der OPM-2-Zelllinie ein temporärer

Effekt auf die CXCR4-Expression nachweisbar. Beide Ergebnisse stehen einer vollständigen Effektivität von Cyclophosphamid *in vitro* entgegen. Auch Waalkens et al. konnten zeigen, dass Lymphozyten, die Ursprungszellen der MM-Zellen, unter *in vitro* Bedingungen in der Lage sind, die mutagenen Eigenschaften des Prodrugs Cyclophosphamid zu aktivieren [78]. Vor diesem Hintergrund erscheinen ergänzende Untersuchungen zum Einfluss von Cyclophosphamid auf die CXCR4-Expression sinnvoll. Primär gilt es dabei zu prüfen, ob sich die in der OPM-2-Zelllinie bei Inkubationsdauern von 8 h, 16 h und 24 h nachweisbaren, signifikanten Effekte auf die CXCR4-Expression auch in anderen MM-Zelllinien bestätigen oder ein exklusives Phänomen der OPM-2-Zelllinie darstellen. Abhängig vom Ergebnis dieser Analysen ist die Durchführung weiterer Experimente unter Berücksichtigung der kürzeren Inkubationszeiten denkbar.

Dexamethason

Ein Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf den CXCR4-Status ist bereits für eine Vielzahl von Zellarten in der Literatur beschrieben. Die Art der Expressionsänderung, Zu- oder Abnahme, scheint dabei vom Zelltyp abhängig zu sein. Für Zellen neuronalen Ursprungs ist beispielsweise eine Abnahme der Rezeptorexpression infolge einer Dexamethason-Behandlung dokumentiert [79]. Ein expressionssteigernder Effekt ist dagegen für verschiedene Zellen des blutbildenden Systems, wie CD4+-T-Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten, belegt [69], [80], [81]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gleiches auch für die MM-Zellen gilt. Sowohl in den verschiedenen MM-Zelllinien als auch den primären MM-Zellen führte die Inkubation mit dem Glukokortikoid zu einer ausgeprägten Zunahme der CXCR4-Oberflächenexpression, was in Einklang mit den von Kim et al. publizierten Daten steht [39]. Die durchflusszytometrischen Analysen der Zelllinien identifizierten einen 5-11-fachen Anstieg des Expressionsniveaus infolge der Dexamethason-Behandlung. Angesichts einer derart ausgeprägten Expressionssteigerung liegt die Vermutung nahe, dass an der Regulation nicht allein Translokations-, sondern auch Transkriptionsvorgänge beteiligt sind. Analysen anderer Arbeitsgruppen, die durch den Einsatz von Western Blot und Realtime-PCR neben der Zunahme der CXCR4-Oberflächenexpression auch eine Steigerung des Gesamt-CXCR4-Gehalts bzw. der CXCR4-mRNA nachweisen konnten, bestätigen diese Annahme [39], [80].

Durch den Einsatz verschiedener Dexamethason-Konzentrationen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Konzentrationsabhängigkeit des expressionssteigernden Effekts aufgezeigt werden. Angefangen bei geringen Konzentrationen, die trotz fehlender Effekte auf die Zellproliferation zu signifikanten Änderungen der CXCR4-Oberflächenexpression

fürten, war mit einer zunehmenden Konzentrationssteigerung durchflusszytometrisch ein weiterer Anstieg der Rezeptorexpression nachweisbar (siehe Abbildung 22). Analog den Beobachtungen von Nagase et al. in Eosinophilen war diese Korrelation jedoch limitiert: Ab einer bestimmten Dexamethason-Konzentration zeigte sich statt einer weiteren Expressionszunahme eine rückläufige Tendenz [69]. Unter Berücksichtigung des überproportionalen Anstiegs der CXCR4-Expression an der Zelloberfläche infolge der Glukokortikoidbehandlung erscheinen sterische Hemmnisse als Ursache der Limitation plausibel. Die Beobachtung, dass die Zellen in der dSTORM-Mikroskopie nach der Dexamethason-Behandlung eine deutliche Zunahme der Rezeptorzahl pro Flächeneinheit bei unveränderter Zellgröße zeigten (siehe Tabelle 13), stützt diese Hypothese.

Doxorubicin

Ähnlich dem Effekt von Dexamethason ist auch die Behandlung mit dem Anthrazyklin Doxorubicin mit einer Zunahme der CXCR4-Oberflächenexpression assoziiert. Was Beji et al. für kardiale Progenitorzellen nachweisen konnten [82], bestätigt die vorliegende Arbeit für MM-Zellen. Dabei zeigten die dSTORM-mikroskopischen Analysen, dass die durch Doxorubicin hervorgerufene Steigerung der Rezeptorexpression, anders als bei Dexamethason, nicht auf einer Vermehrung der Rezeptorzahl pro Flächeneinheit basiert, sondern auf eine Vergrößerung der Zelloberfläche zurückzuführen ist: Die Zunahme des Zelldurchmessers infolge der Doxorubicin-Behandlung korreliert mit dem Anstieg des CXCR4-Expressionsniveaus. Der Effekt von Doxorubicin auf die Zellgröße wurde bereits von Kuznetsov et al. beschrieben. Er lässt sich auf den durch das Anthrazyklin induzierten Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase zurückführen, in der die Zellen in Vorbereitung auf die nachfolgende Mitose ein massives Zellwachstum zeigen [83], [84].

Lenalidomid

Das IMiD Lenalidomid ist ein Derivat von Thalidomid und erst seit einigen Jahren Bestandteil der Myelomtherapie. Thalidomid wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen hinsichtlich seines potenziellen Einflusses auf die CXCR4-Expression in MM-Zellen analysiert. Unter der von Fuchida et al. untersuchten geringen, nicht proliferationshemmenden Thalidomid-Konzentration von 3,9 µM zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Rezeptorexpression [85], der Einsatz höherer Dosierungen (10 µM, 20 µM) war in den Experimenten von Oliveira et al. mit einer Abnahme der CXCR4-Expression assoziiert [86]. Für Lenalidomid wurden solche Untersuchungen bislang nicht mit MM-Zellen, sondern nur mit anderen Zellarten durchgeführt. So ist für CD34⁺-Zellen eine Zunahme der CXCR4-Oberflächenexpression infolge einer Lenalidomid-Behandlung beschrieben,

die nicht aus einer Änderung des Gesamtproteingehalts, sondern ausschließlich aus einer Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche zu resultieren scheint [87]. In Leukämie-Zellen hingegen führte Lenalidomid zu einer Reduktion der CXCR4-Expression [88], [89]. Die heterogene Datenlage hinsichtlich des Einflusses der IMiDs auf die CXCR4-Expression macht deutlich, dass Unterschiede nicht nur zwischen den einzelnen Substanzen dieser Medikamentenklasse bestehen, sondern auch in Abhängigkeit vom Zelltyp. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen in verschiedenen MM-Zelllinien zeigten darüber hinaus, dass auch innerhalb einer Zellart die Effekte der Lenalidomid-Behandlung auf die CXCR4-Expression nicht einheitlich sind. Während in zwei der vier getesteten MM-Zelllinien keine signifikanten Veränderungen in der Rezeptorexpression nachweisbar waren, reagierte je eine Zelllinie mit Zu- bzw. Abnahme der CXCR4-Expression.

4.1.4 Einfluss von Kombinationstherapieregimen auf die CXCR4-Oberflächenexpression

Monotherapien kommen in der Behandlung der Myelomkrankung nur selten zur Anwendung. Meist werden Kombinationsregime, die sich aus zwei bis drei Therapeutika verschiedener Substanzklassen zusammensetzen, eingesetzt. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Effekte von Kombinationstherapien auf die CXCR4-Expression zu untersuchen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden exemplarisch die Zweifachkombinationen Bortezomib/Dexamethason und Doxorubicin/Dexamethason herangezogen. Die Auswahl basierte einerseits auf den in der Leitlinie empfohlenen Therapiealgorithmen [10], andererseits auf den in den Experimenten zu den Einzelsubstanzen gewonnenen Erkenntnissen.

Zunächst wurden je Kombination IC_{50} -Konzentrationen für die Zelllinien OPM-2 und INA-6, die aufgrund ihrer hohen basalen CXCR4-Expression ausgewählt wurden, bestimmt. Hierfür wurden subtoxische Konzentrationen von Bortezomib bzw. Doxorubicin mit aufsteigenden Konzentrationen von Dexamethason kombiniert (siehe Abbildung 27, 28). Es zeigte sich ein additiver Effekt der jeweiligen Kombinationspartner hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf die Zellproliferation, welcher konzentrationsabhängig steigerbar war. Derartige Synergieeffekte bei der Proliferationshemmung sind in der Literatur bereits beschrieben und u. a. ein Grund für den Einsatz von Kombinationstherapieregimen in der Myelomtherapie [90].

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die MM-Therapeutika auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die CXCR4-Oberflächenexpression

interagieren (siehe Abbildung 29, 30). So präsentierten die OPM-2-Zellen infolge der kombinierten Behandlung mit dem expressionsreduzierenden Bortezomib und dem expressionssteigernden Dexamethason ein CXCR4-Expressionsniveau, das zwischen den Niveaus der mit den Einzelsubstanzen inkubierten Zellen lag. Der herunterregulierende Effekt des Bortezomibs erwies sich dabei in der Kombinationsbehandlung deutlich ausgeprägter als in der Bortezomib-Einzelbehandlung der OPM-2-Zellen. Bei den INA-6-Zellen war eine solche Interaktion nicht nachweisbar, was durch den generell nur gering ausgeprägten Effekt des Proteasominhibitors in dieser Zelllinie bedingt sein kann. Dagegen führte die Kombination der jeweils expressionssteigernden Substanzen Doxorubicin und Dexamethason sowohl in der OPM-2- als auch der INA-6-Zelllinie zu einer überadditiven Steigerung des CXCR4-Expressionsniveaus. Insbesondere der Nachweis dieses synergistischen Effekts macht deutlich, dass bei gezielter Auswahl der Substanzpartner Kombinationstherapieregime nicht nur aufgrund ihrer additiven antiproliferativen Wirkung, sondern auch wegen ihrer Interaktion hinsichtlich der CXCR4-Expressionsänderung ihre Berechtigung haben.

4.2 Funktionalität der therapieinduzierten CXCR4-Oberflächenexpressionsänderungen

4.2.1 Korrelation zwischen Expressionsanalysen und Uptake-Versuchen

In Zusammenschau bestätigen die mittels Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie generierten Daten eine durch MM-Therapeutika gezielt beeinflussbare CXCR4-Oberflächenexpression in verschiedenen MM-Zelllinien als auch in primären MM-Zellen. Im Rahmen der durchgeführten *in vitro* Untersuchungen konnte dabei erstmals eine Substanz-, Dosis- sowie Zeitabhängigkeit der Rezeptorregulation für MM-Zellen belegt werden.

Um die Funktionalität der nachgewiesenen Expressionsänderungen zu prüfen, wurden in der OPM-2-Zelllinie Uptake-Versuche mit dem Radiotracer [⁶⁸Ga]Pentixafor durchgeführt. Dieser Tracer hat sich in der Klinik zur *in vivo* Quantifizierung der CXCR4-Expression von MM-Läsionen etabliert. Entsprechend dem Vorgehen in der klinischen Praxis, wo aufgrund der Heterogenität der CXCR4-Expression ergänzend zur [⁶⁸Ga]Pentixafor- eine [¹⁸F]FDG-PET-Bildgebung gefordert wird, wurden auch in dieser Arbeit Uptake-Versuche mit dem Standardtracer [¹⁸F]FDG als Referenz herangezogen [25], [44].

[¹⁸F]FDG-Uptake

Neben der diagnostischen Wertigkeit der [¹⁸F]FDG-PET haben verschiedene Studien auch ihre Eignung zur Evaluation des Therapieansprechens gezeigt [91]. Die Veränderungen des Glukosemetabolismus und damit des [¹⁸F]FDG-Uptakes sind als frühes Signal des proapoptotischen Effekts der Behandlung zu verstehen [92]. In Analogie hierzu zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit mehrheitlich eine Reduktion des [¹⁸F]FDG-Uptakes nach Inkubation mit den MM-Therapeutika (siehe Abbildung 31). Eine Ausnahme bildete die Behandlung mit Doxorubicin, welche zu einem signifikanten Anstieg der [¹⁸F]FDG-Aufnahme führte. Eine mögliche Erklärung für diese Eigenart, die auch von Direcks et al. beschrieben wird [93], könnte der bereits angeführte, durch Doxorubicin induzierte Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase sein. Der Stillstand in dieser stoffwechselaktiven, von Wachstum geprägten Phase des Zellzyklus lässt sich gut mit der erhöhten [¹⁸F]FDG-Aufnahme in Einklang bringen.

[⁶⁸Ga]Pentixafor-Uptake

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Uptake-Versuche mit [⁶⁸Ga]Pentixafor bestätigten die Funktionalität der in der Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie erfassten Expressionsänderungen (siehe Abbildung 32). So war unter der Doxorubicin-Behandlung entsprechend der durchflusszytometrisch und dSTORM-mikroskopisch detektierten Zunahme der Rezeptoroberflächenexpression ein gesteigertes Uptake-Signal nachweisbar. Auch bei Bortezomib, Cyclophosphamid und Lenalidomid deckten sich die Uptake-Niveaus mit den durchflusszytometrisch ermittelten Expressionsveränderungen. Keine Korrelation zeigte sich bei der IC₅₀-Konzentration von 75 µM Dexamethason sowie dem Kombinationstherapieregime Doxorubicin + 75 µM Dexamethason: Aus der in der Durchflusszytometrie nachgewiesenen vielfachen Steigerung der Rezeptorexpression resultierte keine vermehrte [⁶⁸Ga]Pentixafor-Bindung. Dies steht im Einklang mit dem von Lapa et al. beschriebenen Fall eines CXCR4-negativen Patienten, bei dem trotz kurzzeitiger Hochdosis-Dexamethason-Behandlung in der [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT keine Rezeptorhochregulation fassbar war [48]. Im Gegensatz hierzu konnten unter der Behandlung mit subtoxischen Dexamethason-Konzentrationen (40 nM, 25 µM) im Rahmen dieser Arbeit unter *in vitro* Bedingungen durchaus signifikant erhöhte Uptake-Raten nachgewiesen werden. Diese konzentrationsabhängige Limitation des expressionssteigernden Effekts von Dexamethason, die sowohl im Mono- als auch im Kombinationstherapieregime zum Tragen kam, war bereits bei den durchflusszytometrischen und dSTORM-mikroskopischen Analysen aufgefallen.

Die Dexamethason-Konzentration, die mit einer maximalen Rezeptorsteigerung verbunden ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig definiert werden. Sie differierte in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode. Mittels Durchflusszytometrie ließ sich die kritische Konzentration im Bereich von 75 μM einordnen, während sie in der dSTORM-Mikroskopie und den Uptake-Versuchen deutlich geringer lag. Als Ursache der Diskrepanz sind Sensitivitätsunterschiede zwischen den Methoden naheliegend. Diese ergeben sich aus den unterschiedlichen Prinzipien, die den einzelnen Messverfahren zugrunde liegen.

4.2.2 Evaluation der eingesetzten Methoden

Die Durchflusszytometrie ermöglicht bei hohen Durchsatzraten die Definition von Subpopulationen anhand zellspezifischer Marker (Gating) [94]. Basierend auf diesem „Gating“ werden die analysierten Zellen zu Gruppen zusammengefasst, was eine schnelle Auswertung erlaubt, gleichzeitig aber die Aussagekraft der Ergebnisse reduziert. Diesbezüglich zeigt die dSTORM-Mikroskopie, bei der die Zellen vom Untersucher einzeln beurteilt werden, eine höhere Sensitivität. Aufgrund der im Vergleich zur Durchflusszytometrie deutlich kleineren Zahl an analysierten Zellen ist die statistische Sicherheit hier jedoch geringer. Indem sie die Untersuchung einer angemessenen Stichprobenzahl bei guter Detektionsgenauigkeit ermöglichen, zeigen die Uptake-Experimente im Rahmen dieser Arbeit die größte Validität.

Neben der Methodik selbst hat auch der Einsatz von verschiedenen CXCR4-Antagonisten Anteil an den beobachteten Sensitivitätsunterschieden. Die Detektion in der Durchflusszytometrie sowie der dSTORM-Mikroskopie basiert auf CXCR4-Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Aufgrund ihrer Größe (± 140 kDa) können diese nicht in die von den sieben Transmembrandomänen des Rezeptors gebildete Bindungstasche penetrieren, sondern nutzen extrazelluläre Domänen als Zielstruktur [95]. So bindet der für die durchflusszytometrischen Analysen genutzte Antikörper-Klon 12G5 an die ersten beiden extrazellulären Loops (ECL1 & ECL2) und der Antikörper-Klon 2B11, der bei der dSTORM-Mikroskopie zum Einsatz kam, an die N-terminale Region von CXCR4 (siehe 3D-Strukturmodell des Rezeptors in Abbildung 3) [96], [97]. Wesentlich spezifischer ist die Bindung des in den Uptake-Versuchen eingesetzten Rezeptorantagonisten [^{68}Ga]Pentixafor, der aufgrund seiner geringen Größe direkt in die Bindungstasche von CXCR4 penetrieren kann [42], [95]. Dass mit [^{68}Ga]Pentixafor unter *in vitro* Bedingungen zudem der gleiche Radiotracer zum Einsatz kam wie im klinischen

Setting, erhöht die Aussagekraft der in den Uptake-Versuchen gewonnenen Ergebnisse zusätzlich.

4.3 Fazit und Ausblick

Durch den Einsatz der unterschiedlichen Methoden sowie der verschiedenen MM-Zelllinien mit deutlich differenten basalen Expressionsniveaus ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die MM-Therapeutika anhand ihres Einflusses auf die CXCR4-Oberflächenexpression zu klassifizieren. Ein hochregulierender Effekt konnte für Dexamethason, Doxorubicin sowie die Kombination der beiden Substanzen nachgewiesen werden. Bei einer kombinierten Anwendung mit CXCR4-gerichteten diagnostischen und therapeutischen Verfahren besitzen diese Therapieregime großes Potenzial, durch ihre expressionssteigernde Wirkung die Sensitivität der [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET-Bildgebung sowie die Effektivität der Anti-CXCR4-Therapien zu steigern. Als kritisch ist in diesem Zusammenhang eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib zu werten, unter der sich tendenziell eine Abnahme der CXCR4-Expression zeigte. Für die Substanzen Cyclophosphamid und Lenalidomid ließ sich kein zeitlich stabiler bzw. kein einheitlicher Effekt auf die CXCR4-Expression bestätigen. Die beschriebenen Effekte waren nicht konstant in allen Zelllinien nachweisbar. Dies limitiert die Aussagekraft der Ergebnisse, stellt zugleich aber auch einen weiteren Beleg für die Heterogenität der Myelomkrankung dar. Als konfundierende Variablen, die unabhängig des eingesetzten MM-Therapeutikums die Rezeptorexpression mitbeeinflussen, konnten die Inkubationszeit sowie die Substanzkonzentration identifiziert werden.

Da die Ergebnisse *in vitro* erhoben wurden, gilt es in weiteren Experimenten zu prüfen, ob sich die gewonnenen Ergebnisse auch unter den komplexen Bedingungen im lebenden Organismus bestätigen. So könnten Stroma-Kokulturexperimente sowie das von Jakubikova et al. entwickelten 3D-Modell der MM-Knochenmarknische [98] eingesetzt werden, um den Einfluss der Interaktion von MM- und Knochenmarkzellen auf die therapieinduzierten CXCR4-Expressionsänderungen zu evaluieren. Mit der Intention, die durch die MM-Therapeutika hervorgerufenen Expressionsänderungen und deren zeitliche Stabilität auch unter *in vivo* Bedingungen nachzuvollziehen, wäre ein weiterer Schritt die Durchführung von Untersuchungen im Mausmodell. Bestätigen sich dabei die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse, sind mittel- bis langfristig auch translationale Forschungsansätze gerechtfertigt.

Hauptargument hierfür ist das große Potenzial, welches die ersten klinischen Studienergebnisse der CXCR4-gerichteten Theranostik bescheinigen: Indem mittels [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET zunächst die CXCR4-Expression quantifiziert wird und auf diese Weise eine Selektion geeigneter Patienten für die anschließende [¹⁷⁷Lu]- bzw. [⁹⁰Y]Pentixather basierte ERT erfolgt, bietet das theranostische Konzept eine wesentlich individuellere Therapieoption als die standardmäßig eingesetzten Chemo- und Immuntherapeutika. Zugleich bestätigen die bisherigen therapeutischen Erfahrungen einen signifikanten Antitumoreffekt der CXCR4-gerichteten ERT, insbesondere auch bei therapieresistenten und extensiv vorbehandelten Patienten für die bisher keine alternativen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung standen. Der wohl größte Vorteil der ERT ist der multifaktorielle Wirkmechanismus: Neben der direkten Eradikation CXCR4-positiver Tumorzellkompartimente werden durch den strahleninduzierten „Bystander“-Effekt auch CXCR4-negative Zellklone erfasst. Aufgrund der physiologischen CXCR4-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen resultiert die ERT in einer Myeloablation. Diese ist bei hämatologischen Erkrankungen wie dem MM explizit erwünscht und kann als Teil des Konditionierungsschemas vor SZT genutzt werden.

In Summe scheint die CXCR4-gerichtete ERT laut aktueller Studienlage eine wirkungsvolle Therapieoption für MM-Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zu sein, die im Vergleich zu den konventionellen Chemotherapie-Schemata deutlich nebenwirkungsärmer ist. Bislang sind keine akuten, nicht-hämatologischen Komplikationen wie Organtoxizitäten oder allergische Reaktionen infolge der Applikation der ERT beschrieben. Auch eine repetitive Anwendung der CXCR4-gerichteten Theranostik führt laut derzeitigem Kenntnisstand zu keiner kumulativen Organtoxizität [46],[47]. Einschränkend gilt zu sagen, dass die bisherigen therapeutischen Erfahrungen auf einzelnen Fallstudien in kleinen Kohorten beruhen.

Weiteren Aufschluss über die Wirksamkeit und den Stellenwert der CXCR4-gerichteten ERT bei Patienten mit fortgeschrittenem Non-Hodgkin-Lymphom und MM soll die aktuell laufende multizentrische, prospektive Phase I/II-COLPRIT-Studie (Eudra-CT 2015-001817-28) liefern. Die bislang vorhandenen Daten bestätigen aber bereits folgenden Zusammenhang: Der Behandlungserfolg der CXCR4-gerichteten ERT korreliert direkt mit der absorbierten Tumordosis, die wiederum unmittelbar von der Höhe der Rezeptorexpression der MM-Läsionen abhängt [47]. Vor diesem Hintergrund bieten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Einflussfaktoren auf die CXCR4-Expression die Möglichkeit, die Effektivität der CXCR4-gerichteten ERT in Zukunft weiter zu optimieren: Durch synergistische Kombination von ERT und individuell angepasster, klassischer

MM-Medikation (insbesondere CXCR4-hochregulierender Substanzen) gilt es, die CXCR4-Expression an der Zelloberfläche der MM-Läsionen zu maximieren. Auf diese Weise könnte es gelingen, einen multimodalen Therapieansatz zu entwickeln, der das Potenzial besitzt, der Heterogenität der Myelomerkrankung gerecht zu werden und die Therapie im Sinne einer patientenzentrierten Behandlung weiter zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Im Zuge der Bemühungen um neue, tumorspezifische Therapieansätze für die Myelom-erkrankung, die weiterhin als unheilbar gilt, hat sich der Chemokinrezeptor CXCR4 aufgrund seiner zentralen Rolle in der Tumorgenese als vielversprechender Angriffspunkt hervor getan. Im Sinne eines theranostischen Konzepts wird der Rezeptor mithilfe eines radioaktiv markierten Liganden quantifiziert und anschließend von rezeptorspezifischen Radiotherapeutika als Zielstruktur genutzt. Eine ausreichend hohe CXCR4-Expression bildet dabei die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung des Konzepts. Die CXCR4-Expression ist allerdings ein höchst dynamischer Prozess mit großer inter- und intraindividuelle Heterogenität, der u.a. durch eine begleitende Chemotherapie beeinflusst werden kann. Ob sich therapieinduzierte Expressionsänderungen gezielt nutzen lassen, um die Rezeptorzahl zu steuern und so die Effektivität der CXCR4-gerichteten Strategien zu steigern, wurde bislang nicht untersucht.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene, in der Myelomtherapie etablierte Substanzen sowohl einzeln als auch in Kombination hinsichtlich ihres Einflusses auf die CXCR4-Expression von MM-Zelllinien und primären MM-Zellen analysiert. Die mittels Durchflusszytometrie und dSTORM-Mikroskopie durchgeführten Expressionsanalysen wurden durch *in vitro* Uptake-Versuche mit [¹⁸F]FDG und dem klinisch eingesetzten CXCR4-Antagonisten [⁶⁸Ga]Pentixafor ergänzt, um die Funktionalität der therapieinduzierten Expressionsveränderungen zu eruieren.

In den Experimenten zeigte sich eine hohe Variabilität der CXCR4-Expression der MM-Zellen nach Therapieinduktion, die sich als substanz-, dosis- und zeitabhängig herausstellte: Die Cyclophosphamid- und Lenalidomid-Behandlung der Zellen war mit keinem stabilen Effekt auf die Rezeptorexpression assoziiert. Die Inkubation mit Bortezomib führte zu einer relevanten Abnahme der CXCR4-Expression. Die im Hinblick auf die Optimierung der CXCR4-gerichteten Verfahren anzustrebende Steigerung der Rezeptorexpression konnte in den Zellkulturexperimenten durch Dexamethason, Doxorubicin sowie die Kombination der beiden Substanzen erreicht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen das große Potenzial der therapieinduzierten Modulation der CXCR4-Expression. Im weiteren Verlauf sind translationale Forschungsansätze gerechtfertigt, die die Übertragbarkeit der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf die komplexen Vorgänge im lebenden Organismus überprüfen. Langfristiges Ziel ist die Entwicklung eines patientenzentrierten, multimodalen Therapiekonzepts, welches die CXCR4-gerichtete Theranostik mit einer individuell angepassten, medikamentösen Myelomtherapie kombiniert.

6 Literaturverzeichnis

1. Ocio, E.M., et al., *New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG)*. *Leukemia*, 2014. 28(3): p. 525-42. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.350>.
2. Hillengaß, J. and Goldschmidt, H., *Multiples Myelom*. *Der Onkologe*, 2010. 16(3): p. 225-31. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00761-010-1792-z>.
3. Goldschmidt, H., et al., *Multiples Myelom*. *Der Internist*, 2003. 44(5): p. 599-618. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00108-003-0920-x>.
4. Harousseau, J.L. and Dreyling, M., *Multiple myeloma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2009. 20 Suppl 4: p. 97-9. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp140>.
5. National Cancer Institute. *Cancer Stat Facts: Myeloma*. 2018 [Zugriffsdatum: 21.12.2020; URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>].
6. de Mel, S., et al., *Implications of heterogeneity in multiple myeloma*. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 232546. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/232546>.
7. Prideaux, S.M., Conway O'Brien, E., and Chevassut, T.J., *The genetic architecture of multiple myeloma*. *Adv Hematol*, 2014. 2014: p. 864058. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/864058>.
8. Morgan, G.J., Walker, B.A., and Davies, F.E., *The genetic architecture of multiple myeloma*. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(5): p. 335-48. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3257>.
9. Anderson, K.C. and Carrasco, R.D., *Pathogenesis of myeloma*. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6: p. 249-74. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130249>.
10. Wörmann, B., et al. *Multiples Myelom*. 2018 [Zugriffsdatum: 21.12.2020; URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html>].
11. Kortüm, K.M., et al., *Das multiple Myelom*. *Der Internist*, 2013. 54(8): p. 963-77. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00108-013-3336-2>.
12. Usmani, S.Z., et al., *Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents*. *Haematologica*, 2012. 97(11): p. 1761-7. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.065698>.
13. Bladé, J., et al., *Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach*. *J Clin Oncol*, 2011. 29(28): p. 3805-12. DOI: <https://doi.org/10.1200/jco.2011.34.9290>.
14. Bartl, R., et al., *Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging*. *Br J Haematol*, 1982. 51(3): p. 361-75. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1982.tb02791.x>.
15. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. *Leukemia*, 2009. 23(12): p. 2210-21. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2009.174>.

16. Bataille, R., et al., *The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy.* Haematologica, 2006. 91(9): p. 1234-40.
17. Hillengass, J., et al., *Whole-body computed tomography versus conventional skeletal survey in patients with multiple myeloma: a study of the International Myeloma Working Group.* Blood Cancer J, 2017. 7(8): p. e599. DOI: <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.78>.
18. Lutje, S., et al., *Role of radiography, MRI and FDG-PET/CT in diagnosing, staging and therapeutical evaluation of patients with multiple myeloma.* Ann Hematol, 2009. 88(12): p. 1161-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0829-0>.
19. Durie, B.G., *The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system.* Eur J Cancer, 2006. 42(11): p. 1539-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.11.037>.
20. Stolzenburg, A., et al., *Prognostic value of [(18)F]FDG-PET/CT in multiple myeloma patients before and after allogeneic hematopoietic cell transplantation.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018. 45(10): p. 1694-1704. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3997-0>.
21. Durie, B.G., et al., *Whole-body (18)F-FDG PET identifies high-risk myeloma.* J Nucl Med, 2002. 43(11): p. 1457-63.
22. Bartel, T.B., et al., *F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma.* Blood, 2009. 114(10): p. 2068-76. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213280>.
23. Strauss, L.G., *Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients.* Eur J Nucl Med, 1996. 23(10): p. 1409-15. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf01367602>.
24. Dankerl, A., et al., *Multiple Myeloma: Molecular Imaging with 11C-Methionine PET/CT--Initial Experience.* Radiology, 2007. 242(2): p. 498-508. DOI: <https://doi.org/10.1148/radiol.2422051980>.
25. Philipp-Abbrederis, K., et al., *In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma.* EMBO Mol Med, 2015. 7(4): p. 477-87. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201404698>.
26. Kumar, S.K., et al., *Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients.* Leukemia, 2014. 28(5): p. 1122-8. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.313>.
27. Brioli, A., et al., *The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma.* Br J Haematol, 2014. 165(4): p. 441-54. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.12805>.
28. de la Puente, P., et al., *Molecularly targeted therapies in multiple myeloma.* Leuk Res Treatment, 2014. 2014: p. 976567. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/976567>.
29. Burger, J.A. and Kipps, T.J., *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment.* Blood, 2006. 107(5): p. 1761-7. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>.

30. Trentin, L., et al., *Multiple myeloma plasma cells show different chemokine receptor profiles at sites of disease activity*. Br J Haematol, 2007. 138(5): p. 594-602. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06686.x>.
31. Jacobson, O. and Weiss, I.D., *CXCR4 chemokine receptor overview: biology, pathology and applications in imaging and therapy*. Theranostics, 2013. 3(1): p. 1-2. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.5760>.
32. Cojoc, M., et al., *Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis*. Onco Targets Ther, 2013. 6: p. 1347-61. DOI: <https://doi.org/10.2147/ott.s36109>.
33. Pawig, L., et al., *Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives*. Front Immunol, 2015. 6: p. 429. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00429>.
34. Alsayed, Y., et al., *Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma*. Blood, 2007. 109(7): p. 2708-17. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035857>.
35. Pagnucco, G., Cardinale, G., and Gervasi, F., *Targeting multiple myeloma cells and their bone marrow microenvironment*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1028: p. 390-9. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1322.047>.
36. Chatterjee, S., Behnam Azad, B., and Nimmagadda, S., *The intricate role of CXCR4 in cancer*. Adv Cancer Res, 2014. 124: p. 31-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411638-2.00002-1>.
37. Busillo, J.M. and Benovic, J.L., *Regulation of CXCR4 signaling*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1768(4): p. 952-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.002>.
38. Zhang, Y., et al., *Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Stem Cells, 2004. 22(6): p. 1015-29. DOI: <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-1015>.
39. Kim, S.W., et al., *Dexamethasone and hypoxia upregulate CXCR4 expression in myeloma cells*. Leuk Lymphoma, 2009. 50(7): p. 1163-73. DOI: <https://doi.org/10.1080/10428190902893801>.
40. De Silva, R.A., et al., *Imaging CXCR4 expression in human cancer xenografts: evaluation of monocyclam 64Cu-AMD3465*. J Nucl Med, 2011. 52(6): p. 986-93. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085613>.
41. Jacobson, O., et al., *PET of tumor CXCR4 expression with 4-18F-T140*. J Nucl Med, 2010. 51(11): p. 1796-804. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.079418>.
42. Demmer, O., et al., *PET Imaging of CXCR4 Receptors in Cancer by a New Optimized Ligand*. ChemMedChem, 2011. 6(10): p. 1789-91. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100320>.
43. Lapa, C., et al., *[(68)Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [(18)F]FDG and laboratory values*. Theranostics, 2017. 7(1): p. 205-12. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.16576>.
44. Buck, A.K., et al., *Chemokine receptor - Directed imaging and therapy*. Methods, 2017. 130: p. 63-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.09.002>.

45. Schottelius, M., et al., *[(177)Lu]pentixather: Comprehensive Preclinical Characterization of a First CXCR4-directed Endoradiotherapeutic Agent*. *Theranostics*, 2017. 7(9): p. 2350-2362. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.19119>.
46. Herrmann, K., et al., *First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with 177Lu- and 90Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease*. *J Nucl Med*, 2016. 57(2): p. 248-51. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.167361>.
47. Lapa, C., et al., *CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma*. *Theranostics*, 2017. 7(6): p. 1589-1597. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.19050>.
48. Lapa, C., et al., *Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy*. *Br J Haematol*, 2019. 184(3): p. 440-443. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.15096>.
49. Burger, R., et al., *Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma*. *Hematol J*, 2001. 2(1): p. 42-53. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.thj.6200075>.
50. Stuhmer, T., et al., *Preclinical anti-myeloma activity of the novel HDAC-inhibitor JNJ-26481585*. *Br J Haematol*, 2010. 149(4): p. 529-36. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08126.x>.
51. Abcam. *Dexamethasone, anti-inflammatory glucocorticoid (ab120743)*. [Zugriffsdatum: 21.12.2020; URL: <https://www.abcam.com/dexamethasone-inflammatory-glucocorticoid-ab120743.html>].
52. KGaA, M. *Scepter™ 3.0 Cell Counter – How it Works*. [Zugriffsdatum: 21.12.2020; URL: <https://www.sigmaaldrich.com/labware/scepter/how-it-works.html>].
53. Gregor, R., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, U. Sack, A. Tar'nok, and G. Rothe, Editors. 2007, Karger: Basel. p. 27-70.
54. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. *J Immunol Methods*, 2000. 243(1-2): p. 147-54. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00231-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00231-3).
55. Heilemann, M., et al., *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. 47(33): p. 6172-6. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200802376>.
56. van de Linde, S., et al., *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. *Nat Protoc*, 2011. 6(7): p. 991-1009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.336>.
57. Lubran, M., *Quality control of gamma counters. I. Experimental evaluation of sources of error*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 1977. 7(1): p. 57-67.
58. Azab, A.K., et al., *CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy*. *Blood*, 2009. 113(18): p. 4341-51. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-186668>.

59. Luckerath, K., et al., *Targeting paraprotein biosynthesis for non-invasive characterization of myeloma biology*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e84840. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084840>.
60. Clemens, J., et al., *Cellular uptake kinetics of bortezomib in relation to efficacy in myeloma cells and the influence of drug transporters*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. 75(2): p. 281-91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2643-1>.
61. Wang, M., et al., *Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo*. Leukemia, 2008. 22(1): p. 179-85. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404959>.
62. Jiang, D., et al., *Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1 α -XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response*. Sci Rep, 2016. 6: p. 33353. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep33353>.
63. Moreau, P., et al., *Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study*. Lancet Oncol, 2011. 12(5): p. 431-40. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70081-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70081-x).
64. Graham, M.I., et al., *Decreased plasma half-life of cyclophosphamide during repeated high-dose administration*. Cancer Chemother Pharmacol, 1983. 10(3): p. 192-3. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00255760>.
65. Nakanishi, T., et al., *Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin*. J Control Release, 2001. 74(1-3): p. 295-302. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00341-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00341-8).
66. Iida, S., et al., *Lenalidomide plus dexamethasone treatment in Japanese patients with relapsed/refractory multiple myeloma*. Int J Hematol, 2010. 92(1): p. 118-26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0624-7>.
67. Murray, M.Y., et al., *Attenuation of dexamethasone-induced cell death in multiple myeloma is mediated by miR-125b expression*. Cell Cycle, 2013. 12(13): p. 2144-53. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.25251>.
68. Schmidt-Hieber, M., et al., *In vitro cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines*. Invest New Drugs, 2012. 30(2): p. 480-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9576-2>.
69. Nagase, H., et al., *Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(6): p. 1132-9. DOI: <https://doi.org/10.1067/mai.2000.110923>.
70. Sison, E.A., et al., *Dynamic chemotherapy-induced upregulation of CXCR4 expression: a mechanism of therapeutic resistance in pediatric AML*. Mol Cancer Res, 2013. 11(9): p. 1004-16. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-13-0114>.
71. Lapa, C., et al., *[(68)Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer - initial experience*. Oncotarget, 2016. 7(8): p. 9288-95. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7063>.
72. Skommer, J., Wlodkowic, D., and Pelkonen, J., *CXCR4 expression during tumour cell death*. Leuk Res, 2007. 31(8): p. 1155-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.09.012>.

73. Stessman, H.A., et al., *Reduced CXCR4 expression is associated with extramedullary disease in a mouse model of myeloma and predicts poor survival in multiple myeloma patients treated with bortezomib*. *Leukemia*, 2013. 27(10): p. 2075-7. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.148>.
74. Chang, T.P., Poltoratsky, V., and Vancurova, I., *Bortezomib inhibits expression of TGF-beta1, IL-10, and CXCR4, resulting in decreased survival and migration of cutaneous T cell lymphoma cells*. *J Immunol*, 2015. 194(6): p. 2942-53. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402610>.
75. Noborio-Hatano, K., et al., *Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma*. *Oncogene*, 2009. 28(2): p. 231-42. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.385>.
76. Avet-Loiseau, H., et al., *Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(30): p. 4630-4. DOI: <https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.3945>.
77. Chang, T.K.H., et al., *Differential Activation of Cyclophosphamide and Ifosfamide by Cytochromes P-450 2B and 3A in Human Liver Microsomes*. *Cancer Research*, 1993. 53(23): p. 5629-5637.
78. Waalkens, D.H., et al., *Sister-chromatid exchanges induced in vitro by cyclophosphamide without exogenous metabolic activation in lymphocytes from three mammalian species*. *Toxicology Letters*, 1981. 7(3): p. 229-232. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(81\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0378-4274(81)90073-4).
79. Felszeghy, K., et al., *Dexamethasone downregulates chemokine receptor CXCR4 and exerts neuroprotection against hypoxia/ischemia-induced brain injury in neonatal rats*. *Neuroimmunomodulation*, 2004. 11(6): p. 404-13. DOI: <https://doi.org/10.1159/000080151>.
80. Wang, J., et al., *IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication*. *J Leukoc Biol*, 1998. 64(5): p. 642-9. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.64.5.642>.
81. Caulfield, J., et al., *CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells*. *Immunology*, 2002. 105(2): p. 155-62. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01359.x>.
82. Beji, S., et al., *Doxorubicin upregulates CXCR4 via miR-200c/ZEB1-dependent mechanism in human cardiac mesenchymal progenitor cells*. *Cell Death Dis*, 2017. 8(8): p. e3020. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.409>.
83. Kuznetsov, A.V., et al., *Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(6): p. 1144-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.002>.
84. Sorenson, C.M., Barry, M.A., and Eastman, A., *Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. 82(9): p. 749-55. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/82.9.749>.
85. Fuchida, S.I., et al., *The effects of thalidomide on chemotactic migration of multiple myeloma cell lines*. *Int J Lab Hematol*, 2008. 30(3): p. 220-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-553x.2007.00948.x>.

86. Oliveira, A.M., et al., *Thalidomide treatment down-regulates SDF-1alpha and CXCR4 expression in multiple myeloma patients*. *Leuk Res*, 2009. 33(7): p. 970-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.09.018>.
87. Li, S., et al., *Lenalidomide-induced upregulation of CXCR4 in CD34+ hematopoietic cells, a potential mechanism of decreased hematopoietic progenitor mobilization*. *Leukemia*, 2013. 27(6): p. 1407-11. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2012.323>.
88. James, D.F., et al., *Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2014. 32(19): p. 2067-2073. DOI: <https://doi.org/10.1200/jco.2013.51.5890>.
89. Lopez-Millan, B., et al., *IMiDs mobilize acute myeloid leukemia blasts to peripheral blood through downregulation of CXCR4 but fail to potentiate AraC/Idarubicin activity in preclinical models of non del5q/5q- AML*. *Oncoimmunology*, 2018. 7(9): p. e1477460. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1477460>.
90. Hideshima, T., et al., *The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells*. *Cancer Res*, 2001. 61(7): p. 3071-6.
91. Caldarella, C., et al., *The Role of Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Evaluating the Response to Treatment in Patients with Multiple Myeloma*. *International Journal of Molecular Imaging*, 2012. 2012: p. 175803. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/175803>.
92. Zhou, R., Vander Heiden, M.G., and Rudin, C.M., *Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism*. *Cancer Res*, 2002. 62(12): p. 3515-20.
93. Direcks, W.G., et al., *[18F]FDG and [18F]FLT uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study*. *Br J Cancer*, 2008. 99(3): p. 481-7. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604523>.
94. Jahan-Tigh, R.R., et al., *Flow cytometry*. *J Invest Dermatol*, 2012. 132(10): p. 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2012.282>.
95. Kuil, J., Buckle, T., and van Leeuwen, F.W., *Imaging agents for the chemokine receptor 4 (CXCR4)*. *Chem Soc Rev*, 2012. 41(15): p. 5239-61. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2cs35085h>.
96. Baribaud, F., et al., *Antigenically Distinct Conformations of CXCR4*. *Journal of Virology*, 2001. 75(19): p. 8957-8967. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8957-8967.2001>.
97. Huskens, D., et al., *The role of N-glycosylation sites on the CXCR4 receptor for CXCL-12 binding and signaling and X4 HIV-1 viral infectivity*. *Virology*, 2007. 363(2): p. 280-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.031>.
98. Jakubikova, J., et al., *A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: biologic and clinical applications*. *Oncotarget*, 2016. 7(47): p. 77326-77341. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12643>.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Abbildungen

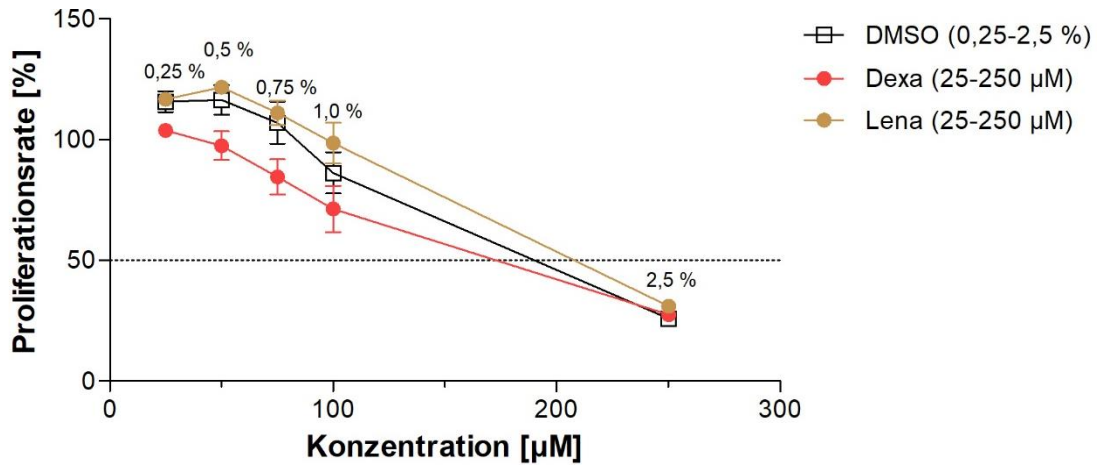


Abbildung A1: Ausschluss relevanter Effekte des Lösungsmittels DMSO auf die Zellproliferation am Beispiel der INA-6-Zelllinie. Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation mittels CFSE-Färbung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason, Lenalidomid sowie deren Lösungsmittel DMSO. Bis zu einem DMSO-Gehalt von 1 %, der in der 100 µM Dexamethason- bzw. Lenalidomid-Lösung enthalten war, konnten relevante Effekt auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden. Dargestellt ist jeweils die relative Proliferationsrate (% , bezogen auf unbehandelte Zellen) als $MW \pm SD$; $n = 3-4$ (mit Ausnahme von Dexamethason/Lenalidomid 250 µM und DMSO 2,5 %: $n = 1$).

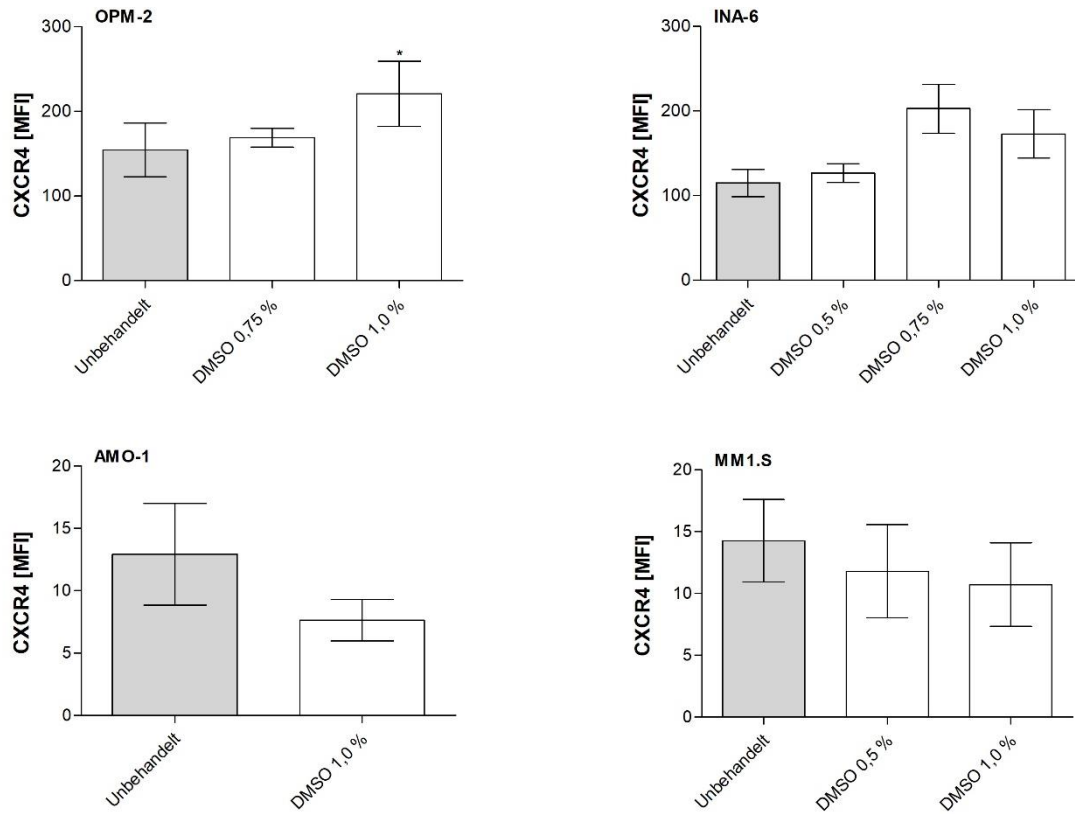


Abbildung A2: Ausschluss relevanter Effekte des Lösungsmittels DMSO auf die CXCR4-Expression in den MM-Zelllinien. Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Expression nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit DMSO-Lösungen, deren Konzentration (0,5-1,0 %) dem DMSO-Gehalt der eingesetzten Dexamethason- bzw. Lenalidomid-Lösungen (50-100 μ M) entsprach. Dargestellt sind die mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrollierten geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) in Form von $MW \pm SD$; $n = 4-6$.

7.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle A1: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	154,4 \pm 31,8	
Borte 5 nM	81,1 \pm 7,8	0,007**
Cyclo 50 μ M	166,7 \pm 25,9	> 0,999
Cyclo 5 mM	171,5 \pm 13,8	> 0,999
Dexa 75 μ M	702,3 \pm 73,6	< 0,001***
Dexa 100 μ M	672,9 \pm 53,3	< 0,001***
Doxo 5 μ M	316,4 \pm 41,0	< 0,001***
Lena 75 μ M	59,5 \pm 3,6	0,001**
Lena 100 μ M	63,4 \pm 14,7	0,002**

Tabelle A2: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	115,0 \pm 16,1	
Borte 7,5 nM	103,8 \pm 9,5	> 0,999
Cyclo 50 μ M	123,9 \pm 18,1	> 0,999
Cyclo 5 mM	177,4 \pm 14,5	> 0,999
Dexa 10 μ M	404,1 \pm 26,1	< 0,001***
Dexa 25 μ M	466,9 \pm 35,4	< 0,001***
Dexa 50 μ M	644,0 \pm 34,3	< 0,001***
Dexa 75 μ M	914,9 \pm 128,4	< 0,001***
Dexa 100 μ M	801,0 \pm 158,3	< 0,001***
Doxo 5 μ M	135,0 \pm 15,7	> 0,999
Lena 17 μ M	160,8 \pm 20,6	> 0,999
Lena 75 μ M	255,0 \pm 42,0	0,008**
Lena 100 μ M	205,7 \pm 32,6	0,283

Tabelle A3: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von AMO-1-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	12,9 \pm 4,1	
Borte 5 nM	10,6 \pm 1,2	> 0,999
Cyclo 5 mM	17,3 \pm 2,8	0,236
Dexa 100 μ M	17,5 \pm 4,7	0,180
Doxo 10 μ M	25,2 \pm 5,2	< 0,001***
Lena 100 μ M	11,0 \pm 1,9	> 0,999

Tabelle A4: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die CXCR4-Expression von MM1.S-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	14,3 \pm 3,3	
Borte 5 nM	18,9 \pm 5,0	> 0,999
Cyclo 50 μ M	14,9 \pm 6,0	> 0,999
Dexa 50 μ M	171,6 \pm 10,8	< 0,001***
Doxo 10 μ M	45,2 \pm 4,3	< 0,001***
Lena 100 μ M	6,2 \pm 1,7	0,254

Tabelle A5: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von Kombinationstherapie-regimen auf die CXCR4-Expression von OPM-2-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie die Ergebnisse des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	208,6 \pm 5,9	
Borte 3,5 nM	87,1 \pm 10,7	0,004**
Borte 3,5 nM + Dexa 75 μ M	347,9 \pm 31,1	0,001**
Dexa 75 μ M	665,9 \pm 46,0	< 0,001***
Doxo 2 μ M + Dexa 75 μ M	880,8 \pm 80,7	< 0,001***
Doxo 2 μ M	248,9 \pm 8,7	> 0,999

Paarung	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert)
Borte vs. Borte/Dexa (p ₁)	< 0,001***
Dexa vs. Borte/Dexa (p ₂)	< 0,001***
Dexa vs. Doxo/Dexa (p ₃)	< 0,001***
Doxo vs. Doxo/Dexa (p ₄)	< 0,001***

Tabelle A6: Daten der durchflusszytometrischen Analysen zum Einfluss von Kombinationstherapie-regimen auf die CXCR4-Expression von INA-6-Zellen. Angegeben sind jeweils der MW \pm SD des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (MFI, mittels Isotyp-Kontrolle auf Hintergrundaktivität kontrolliert) sowie die Ergebnisse des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4-6.

	MFI der CXCR4- Expression (MW \pm SD)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	93,9 \pm 8,9	
Borte 6 nM	97,1 \pm 11,8	> 0,999
Borte 6 nM + Dexa 50 μ M	644,1 \pm 43,0	< 0,001***
Dexa 50 μ M	658,9 \pm 36,6	< 0,001***
Doxo 2 μ M + Dexa 50 μ M	875,4 \pm 93,0	\leq 0,001***
Doxo 2 μ M	100,9 \pm 10,5	> 0,999

Paarung	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert)
Borte vs. Borte/Dexa (p ₁)	< 0,001***
Dexa vs. Borte/Dexa (p ₂)	> 0,999
Dexa vs. Doxo/Dexa (p ₃)	< 0,001***
Doxo vs. Doxo/Dexa (p ₄)	< 0,001***

Tabelle A7: Daten zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die [¹⁸F]FDG-Aufnahme von OPM-2-Zellen.
 Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und hinsichtlich Hintergrundaktivität sowie radioaktiven Zerfalls korrigiert. Angegeben ist jeweils der MW ± SEM der Zerfälle pro Minute je 1000 Zellen (CPM) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4.

	[¹⁸F]FDG-Uptake in CPM (MW ± SEM)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	1983,7 ± 172,6	
Borte 5 nM	1707,6 ± 34,9	> 0,999
Cyclo 5 mM	1895,1 ± 180,3	> 0,999
Dexa 75 µM	740,9 ± 93,6	< 0,001***
Doxo 5 µM	4165,4 ± 228,7	< 0,001***
Doxo 2 µM + Dexa 75 µM	1088,3 ± 87,9	0,002**
Lena 75 µM	774,9 ± 127,5	< 0,001***

Tabelle A8: Daten zum Einfluss von MM-Therapeutika auf die [⁶⁸Ga]Pentixafor-Bindung von OPM-2-Zellen. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und hinsichtlich Hintergrundaktivität sowie radioaktiven Zerfalls korrigiert. Angegeben ist jeweils der MW ± SEM der Zerfälle pro Minute je 1000 Zellen (CPM) sowie das Ergebnis des Signifikanztests (One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post-Test); n = 4.

	[⁶⁸Ga]Pentixafor- Uptake in CPM (MW ± SEM)	One-way-ANOVA- & Bonferroni-Post- Test (p-Wert) <i>unbehandelte vs. behandelte Zellen</i>
Unbehandelt	1928,0 ± 112,4	
Borte 5 nM	977,2 ± 62,4	0,010**
Cyclo 5 mM	1456,0 ± 231,9	0,906
Dexa 40 nM	3537,3 ± 416,6	< 0,001***
Dexa 25 µM	3043,0 ± 312,5	0,002**
Dexa 75 µM	1542,4 ± 182,4	> 0,999
Doxo 5 µM	3233,7 ± 175,5	< 0,001***
Doxo 2 µM + Dexa 75 µM	1981,4 ± 221,5	> 0,999
Lena 75 µM	668,0 ± 82,3	< 0,001***

7.3 Urheberrechtliche Genehmigung

Abbildung 5: Chemotherapie-induzierte CXCR4-Herabregulation bei einem Patienten mit fortgeschrittener Myelomkrankung.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Dec 23, 2020

This Agreement between Anna Bögelein ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4971361400894
License date	Dec 17, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Methods
Licensed Content Title	Chemokine receptor – Directed imaging and therapy
Licensed Content Author	Andreas K. Buck,Antje Stolzenburg,Heribert Hänscheid,Andreas Schirbel,Katharina Lücknerath,Margret Schottelius,Hans-Jürgen Wester,Constantin Lapa
Licensed Content Date	Nov 1, 2017
Licensed Content Volume	130
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	9
Start Page	63
End Page	71
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	100
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Einfluss systemischer Therapeutika auf die CXCR4-Expression von Myelomzellen
Institution name	Universität Würzburg, Nuklearmedizin
Expected presentation date	Jan 2021
Portions	Figure 7 Anna Bögelein Birkenstraße 6
Requestor Location	Schopfloch, 91626 Germany Attn: Anna Bögelein
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Buck für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können, sowie für seine stete Unterstützung, insbesondere auch in Bezug auf die Teilnahme an Kongressen.

Dr. Antje Stolzenburg danke ich für die hervorragende Betreuung. Während der gesamten Zeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite und das in einem Umfang, der sicher über das normale Maß hinausging. Vielen Dank für die Geduld, das Vertrauen sowie die Ermutigungen zur rechten Zeit.

Vielen Dank an Gabriele Riehl für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Sie hat mir nicht nur den Einstieg in das experimentelle Arbeiten erleichtert, sondern war auch im weiteren Verlauf jederzeit bereit, bei auftretenden Problemen zu helfen. Die gemeinsame Zeit im Labor werde ich in guter Erinnerung behalten.

Mein Dank gilt auch Patrick Eiring für die konstruktive Zusammenarbeit. Durch die Durchführung der dSTORM-mikroskopischen Analysen leistete er einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit.

Dem Team des Lehrstuhls für Translationale Onkologie danke ich für die Bereitstellung und Präparation der Patientenproben.

Ein großes Dankeschön auch an die Mitarbeiter der Radiopharmazie für die Herstellung der Radiotracer.

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt und ermutigt haben. Vielen Dank auch an meinen Freund und seine Familie, die mich nach jedem Rückschlag aufgebaut und motiviert haben.

Kongressteilnahmen und Veröffentlichungen

- **Posterpräsentation bei der 13. Jahrestagung der „European Society of Molecular Imaging“ in San Sebastian (Spanien), 2018**

CXCR4 – watching chemokine receptors in vitro

Anna Bögelein, Antje Stolzenburg, Patrick Eiring, Katharina Lücknerath, Markus Sauer, Andreas K. Buck

- **Manuskript zur Einreichung, 2021**

CXCR4 expression of Multiple Myeloma as a dynamic process: Influence of therapeutic agents

Anna Bögelein[¶], Antje Stolzenburg[¶], Patrick Eiring, Katharina Lücknerath, Markus Sauer, Andreas Schirbel, Samuel Samnick, Constantin Lapa, K. Martin Kortüm, Andreas K. Buck

[¶]These authors contributed equally