

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie  
des Klinikums der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Untersuchung funktioneller und molekularer Imaging Biomarker zum Monitoring  
zielgerichteter Tumortherapien im Tiermodell**

**Zusammenfassung des kumulativen Habilitationsprojekts**

zur Erlangung der Venia Legendi  
für das Fach Radiologie  
der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**vorgelegt von**

Dr. med. Philipp Maximilian Kazmierczak

(2018)

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitende Zusammenfassung	2
2 Kriterienbasierte radiologische Beurteilung des Therapieansprechens in der Onkologie	5
2.1 Morphologische Kriterien	5
2.2 Limitationen der morphologischen Kriterien	5
2.3 Monitoring der zielgerichteten Tumorthérapien: aktueller Stand und Fragestellung	7
3 Themenrelevante wissenschaftliche Arbeiten	9
4 Literatur	29
5 Publikationsverzeichnis des kumulativen Habilitationsprojekts	31
6 Curriculum Vitae	34
7 Danksagung	35

## **1 Einleitende Zusammenfassung**

Neue, zielgerichtete Tumorthérapien wirken im Gegensatz zu klassischen Chemotherapeutika nicht primär zytotoxisch und führen deshalb nicht oder erst spät zu relevanten Größenänderungen des Tumors. Rein morphologische Kriterien des Therapieansprechens wie die Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) sind bei zielgerichteten Tumorthérapien daher nur eingeschränkt anwendbar. In den letzten Jahren wurden für verschiedene Tumorentitäten neue Kriterien des Therapieansprechens entwickelt, die zusätzlich zur Tumormorphologie auch funktionelle und molekulare Informationen über den Tumor integrieren (z. B. Choi-Kriterien bei gastrointestinalen Stromatumoren unter Imatinib, modified (m)RECIST, Lugano-Kriterien bei Lymphomen). Zudem wurden die Positron Emission Tomography Response Criteria in Solid Tumors (PERCIST) zur Beurteilung des metabolischen Tumoransprechens anhand der  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomographie ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) eingeführt. Obwohl die neuen Kriterien des Therapieansprechens ein sensitiveres Monitoring der zielgerichteten Tumorthérapien ermöglichen, bilden auch sie die Veränderungen des Tumormicroenvironments und der Tumorpathophysiologie unter Therapie nur begrenzt ab. Neue Methoden der funktionellen und molekularen Bildgebung könnten diese Lücke schließen und eine multimodale und multiparametrische Charakterisierung des Tumormicroenvironments erlauben.

Das vorliegende kumulative Habilitationsprojekt beschäftigt sich mit der präklinischen Untersuchung funktioneller und molekularer Imaging Biomarker des Therapieansprechens im Tiermodell. Es wurden verschiedene Verfahren der funktionellen und molekularen Bildgebung zum Monitoring zielgerichteter Therapien in humanen Xenograft-Modellen in Ratte und Maus untersucht. Die Ergebnisse der in-vivo-Bildgebung wurden ex vivo durch multiparametrische Immunhistochemie validiert. Die präklinischen Arbeiten könnten die Basis zur Planung klinisch-translatinaler Studien darstellen und so einen Beitrag zur Entwicklung personalisierter onkologischer Therapien leisten.

**Teilprojekte 1, 5 und 6** beschäftigten sich mit der Untersuchung verschiedener Methoden der Perfusions-Bildgebung (Perfusions-Computertomographie [CT], Perfusions-Magnetresonanztomographie [MRT], kontrastmittelverstärkter Ultraschall mit Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2)-spezifischen Microbubbles) zum Monitoring der anti-

angiogenetischen Effekte einer Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte [7, 10, 11]. Zusätzlich zu der funktionellen Information wurden in den Teilprojekten 5 und 6 molekulare Informationen über das Tumormicroenvironment unter Therapie untersucht (Teilprojekt 5:  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET zum Monitoring des Tumorglukosemetabolismus; Teilprojekt 6: Ultraschall-Messung der VEGFR2-Expression als Marker der Neoangiogenese). In Korrelation zu dem immunhistochemischen Referenzstandard konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Verfahren der funktionellen und molekularen Bildgebung das nicht-invasive Monitoring der Multityrosinkinaseinhibitor-Therapie erlauben.

In **Teilprojekt 2** wurden die optische Bildgebung (OI) mit fluoreszenzmarkiertem Annexin A5 und die Perfusions-MRT zum Monitoring der pro-apoptischen Effekte einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte untersucht [17]. In Korrelation zur ex-vivo-Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass die Annexin-basierte OI Informationen über den therapieinduzierten Zelltod (Apoptose und Nekrose) generiert. Als Korrelat der ebenfalls immunhistochemisch nachzuweisenden anti-angiogenetischen Effekte und analog zu den Ergebnissen der Perfusions-CT in Teilprojekt 1 wurde mit der Perfusions-MRT eine signifikante Suppression der Tumorperfusion unter Therapie nachgewiesen.

**Teilprojekte 3, 4 und 8** beschäftigen sich mit dem Angiogenese- und Tumorzellmarker  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als molekularer Zielstruktur der in-vivo-Bildgebung [18-20]. Es wurden die MRT mit einem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen eisenhaltigen Kontrastmittel und die PET mit einem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Radiotracer zum Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte einer anti-VEGF-Therapie mit Bevacizumab im humanen Mammakarzinommodell der Maus untersucht [19, 20]. Zudem wurde als Proof-of-Principle die quantitative optoakustische Bildgebung mit einem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracer in Korrelation zur morphologischen MRT zum Monitoring einer B-rapidly accelerated fibrosarcoma (BRAF)-mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK)-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen BRAF V600E-positiven Melanommodell in der Maus eingesetzt [18]. Validiert durch die ex vivo durchgeführte Immunhistochemie konnte in diesen Teilprojekten gezeigt werden, dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung das nicht-invasive

Monitoring der zielgerichteten Tumortherapien im Tiermodell erlaubt und zu den morphologischen Kriterien des Therapieansprechens (CT- und MRT-Tumorvolumetrie) komplementäre molekulare Imaging Biomarker des Therapieansprechens generiert.

In **Teilprojekt 7** wurde nachgewiesen, dass eine neue, experimentelle BRAF- und cyclin-dependent kinases (CDK)-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie signifikante anti-angiogenetische und anti-proliferative Effekte im humanen Melanommodell der Maus besitzt und die entsprechenden Veränderungen der Tumorpathophysiologie mit der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und der diffusionsgewichteten MRT dargestellt werden können [12]. Auch in diesem Projekt wurde der signifikante Mehrwert funktioneller und molekularer Imaging Biomarker gegenüber morphologischen Kriterien des Therapieansprechens (MRT-Tumorvolumetrie) demonstriert.

## 2 Kriterienbasierte radiologische Beurteilung des Therapieansprechens in der Onkologie

### 2.1 Morphologische Kriterien

Die standardisierte, kriterienbasierte radiologische Beurteilung des Therapieansprechens ist zentrales Element in der Planung und Steuerung onkologischer Therapien. Die im Jahr 2000 eingeführten und 2009 aktualisierten RECIST (Versionen 1.0 und 1.1) sind international anerkannte Kriterien zur bildbasierten Beurteilung des Therapieansprechens von soliden Tumoren und von der Food and Drug Administration (FDA) sowie der European Medicines Agency (EMA) für die Anwendung in Medikamentenzulassungsstudien anerkannt [9, 14, 27]. Nach RECIST werden die Tumormanifestationen in Target Lesions (Zielläsionen, maximal zwei pro Organ und maximal fünf insgesamt) und Non-Target Lesions (Nicht-Zielläsionen) eingeteilt und die Beurteilung des Therapieansprechens erfolgt primär größenbasiert [9]. Die Messung der Target Lesions und Non-Target Lesions wird in morphologischen Bilddatensätzen (in der Regel CT und/oder MRT) durchgeführt. Für das Therapieansprechen unterscheidet man bei RECIST 1.1 zwischen **a) Complete Response** (CR, alle Target Lesions und Non-Target Lesions nicht mehr nachweisbar, Kurzdurchmesser aller Lymphknoten <10 mm, Normalisierung der Tumormarker-Spiegel), **b) Partial Response** (PR, Reduktion der Summe der größten Tumordurchmesser  $\geq 30\%$  verglichen mit der Baseline, Non-Target Lesions vorhanden oder nicht mehr nachweisbar), **c) Progressive Disease** (PD, Zunahme der Summe der größten Tumordurchmesser  $\geq 20\%$  und mindestens 5 mm verglichen mit der kleinsten Summe im Verlauf [Nadir], eindeutiger Progress der Non-Target Lesions, neue Target oder Non-Target Lesions), **d) Stable Disease** (SD, Target Lesions) bzw. **Non-CR/Non-PD** (Non-Target Lesions) (weder PD noch PR verglichen mit dem Nadir, Persistenz einer oder mehrerer Non-Target Lesions und/oder Tumormarker-Spiegel oberhalb des Referenzbereichs) [9].

### 2.2 Limitationen der morphologischen Kriterien

Die RECIST-Kriterien erlauben eine standardisierte, einfach und reproduzierbar durchzuführende Beurteilung des Therapieansprechens. Bei der klinischen Anwendung dieser rein morphologischen Kriterien sind jedoch zwei Haupt-Limitationen zu beachten: die geringe Sensitivität bei der Erfassung

geringer Größenänderungen des Tumors unter Therapie und die eingeschränkte Anwendbarkeit zum Monitoring neuer, zielgerichteter Tumorthérapien.

Gemäß RECIST 1.1 liegt ein Stable Disease vor, wenn die Summe der Gesamtdurchmesser der Target Lesions verglichen mit dem Nadir um nicht mehr als 20 % abgenommen und um nicht mehr als um 30 % zugenommen hat [9]. Nimmt man aber an, dass es sich bei einer Target Lesion um eine kugelförmige Tumormanifestation handelt, so toleriert man bei Anwendung der RECIST-Kriterien Änderungen des Tumolvolumens zwischen -65 % und +73 % als Stable Disease [14]. Diese Modellrechnung wird durch Daten von Winter und Kollegen bestätigt, die für Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen zeigen konnten, dass Änderungen der Tumordurchmesser zwischen -20 % und +30 % Volumenänderungen von -65 % bis +65 % entsprechen [33]. Volumetriebasierte Kriterien könnten das Therapieansprechen von soliden Tumoren in Korrelation zu klinischen Endpunkten potentiell sensitiver als die diameterbasierten RECIST-Kriterien erfassen. Hayes et al. verglichen RECIST-Kriterien und volumetriebasierte Kriterien in einem Kollektiv von Patienten mit Lungenkarzinomen (n=42) [15]. Bei Anwendung von volumetriebasierten Kriterien wiesen sie einen signifikanten Unterschied im 1-Jahres-Gesamtüberleben zwischen Partial Respondern und Non-Respondern nach, während bei Beurteilung des Therapieansprechens nach RECIST-Kriterien kein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte.

In den letzten Jahren wurde zudem eine Vielzahl von neuen, zielgerichteten Therapien zur Behandlung verschiedener Tumorentitäten zugelassen [1]. Die zielgerichteten Therapien wirken im Unterschied zu den klassischen Chemotherapeutika nicht primär zytotoxisch, sondern greifen möglichst gezielt Strukturen und Vorgänge an, die essentiell für das Überleben und die Progression eines Tumors sind [2]. Zielgerichtete Therapien wirken selektiver im Tumorgewebe und besitzen potentiell weniger Nebenwirkungen als die klassischen, primär zytotoxischen Chemotherapeutika [31]. Obwohl die zielgerichteten Therapeutika signifikante Effekte auf die Tumorphysiologie besitzen, bewirken sie häufig keine oder erst eine sehr späte Größenänderung der Tumorherde [8]. Insbesondere in den frühen Phasen der Behandlung ist daher die Anwendung rein morphologischer Kriterien des Therapieansprechens wie RECIST nur eingeschränkt sinnvoll [8]. Die frühzeitige Beurteilung des

Therapieansprechens ist aber klinisch von großer Bedeutung, um zeitnah Non-Responder zu identifizieren.

### 2.3 Monitoring der zielgerichteten Tumorthapien: aktueller Stand und Fragestellung

Um das Monitoring der neuen, zielgerichteten Tumorthapien zu optimieren, wurden in den letzten Jahren verschiedene neue, größtenteils auf RECIST basierende Kriterien unter Einbeziehung funktioneller Informationen über den Tumor unter Therapie etabliert (z. B. Choi-Kriterien bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) unter Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Imatinib, mRECIST beim hepatozellulären Karzinom (HCC), Lugano-Kriterien bei Lymphomen) (Tab. 1) [5, 6, 21]. Darüber hinaus haben die PERCIST-Kriterien zunehmend Einzug in die klinische Routine gefunden (Tab. 1) [29]. Die PERCIST-Kriterien erfassen das Therapieansprechen von soliden Tumoren anhand des Tumorglukosemetabolismus ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) und teilen es analog der RECIST-Nomenklatur ein (Complete/Partial Metabolic Response, Stable/Progressive Metabolic Disease). Tab. 1 gibt einen Überblick über eine Auswahl von neuen Kriterien des Therapieansprechens.

Kriterien	Tumorentität	Beurteilung des Therapieansprechens
Choi [6]	GIST	Kombination von größenbasierten Kriterien mit der in der CT gemessenen Dichte des Tumors als Maß für die Tumolvaskularität
mRECIST [21]	HCC	Größenbasierte Kriterien mit Messung des arteriell hypervaskularisierten, vitalen Tumoranteils
Lugano [5]	Lymphome	Kombination von größenbasierten Kriterien und Informationen zum Tumorglukosemetabolismus ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET)
PERCIST [29]	Solide Tumoren	Tumorglukosemetabolismus ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) als Maß für das metabolische Therapieansprechen

**Tab. 1. Neue Kriterien des Therapieansprechens mit Berücksichtigung funktioneller und molekularer Informationen.** Angelehnt an [14].



Obwohl die erweiterten morphologischen und die metabolischen Kriterien ein sensitiveres Monitoring der zielgerichteten Therapien ermöglichen, bilden auch sie die Tumorpathophysiologie und die Veränderungen im Tumormicroenvironment unter Therapie nur begrenzt ab. Neue Methoden der funktionellen und molekularen Bildgebung generieren zusätzliche Informationen über den Tumor, wie beispielsweise die Tumormikrozirkulation (Perfusions-CT und -MRT), den therapieinduzierten Zelltod (Annexin-basierte optische Fluoreszenzbildgebung/OI) oder den Tumorrezeptorstatus (z. B.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MRT, PET und optoakustische Bildgebung) [7, 11, 17, 19, 20]. Die Grenzen zwischen morphologischer, funktioneller und molekularer Information sind dabei fließend [24]. Die Verfahren der funktionellen und molekularen Bildgebung erlauben die multimodale und multiparametrische Charakterisierung von Tumormicroenvironment und Tumorpathophysiologie in vivo und könnten so das Monitoring der zielgerichteten Tumortherapien weiter optimieren.

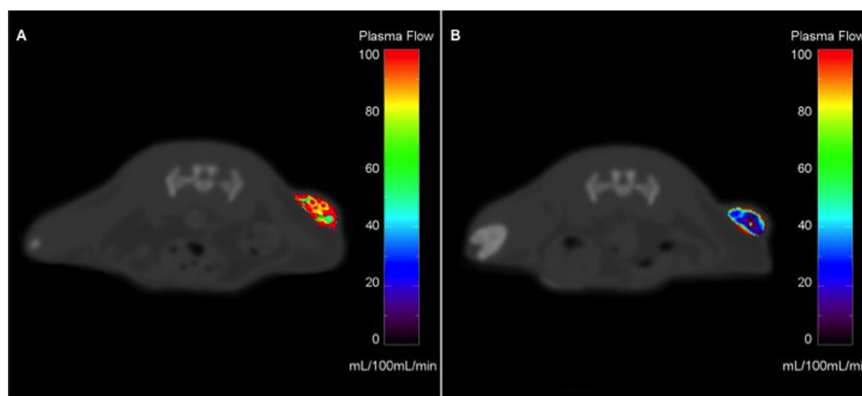
Ziel des kumulativen Habilitationsprojekts ist die Untersuchung innovativer funktioneller und molekularer Imaging Biomarker des Therapieansprechens zum Monitoring zielgerichteter Tumortherapien im Tiermodell. Es wurden verschiedene Verfahren der funktionellen (Perfusions-CT und -MRT, diffusionsgewichtete MRT) und der molekularen Bildgebung (Annexin-basierte OI,  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MRT,  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische PET,  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung, VEGFR2-spezifischer Ultraschall,  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) zur multimodalen Charakterisierung verschiedener humaner Tumormodelle unter zielgerichteter Therapie in Korrelation zum immunhistochemischen Referenzstandard untersucht. Die durchgeführten Studien könnten Ausgangspunkte für die Weiterentwicklung der Verfahren und Validierung der Imaging Biomarker hinsichtlich einer möglichen klinischen Translation darstellen.

### 3 Themenrelevante wissenschaftliche Arbeiten

**Teilprojekt 1: Perfusions-CT zum Monitoring einer Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte (Cyran CC, Kazmierczak PM, et al. PLoS One 2013 – geteilte Erstautorenschaft; IF 3,534) [7]**

Regorafenib ist ein Multityrosinkinaseinhibitor, der 2012 von der FDA für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen wurde. Bei verschiedenen soliden Tumoren konnte eine anti-angiogenetische, anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden [10, 11, 17, 32]. Die Perfusions-CT ist ein Verfahren, das nach intravenöser Injektion eines iodhaltigen Kontrastmittels die nicht-invasive Quantifizierung der Tumormikrozirkulation in vivo erlaubt. Hypothese von Teilprojekt 1 war, dass die Perfusions-CT in Korrelation zum immunhistochemischen Referenzstandard die Abnahme der Tumorperfusion als Korrelat der anti-angiogenetischen Regorafenib-Effekte quantifiziert und so nicht-invasive funktionelle Imaging Biomarker des Therapieansprechens generiert. Humane Kolonkarzinom-Xenografts (HT-29) wurden n=15 weiblichen athymischen Nacktratten subkutan in die Flanke implantiert. Nachdem die Tumoren ein Volumen von 800 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Tiere in Therapie- (n=7) und Kontrollgruppe (n=8) randomisiert und mit Perfusions-CT an einem klinischen 128-Zeilen-Dual-Source-CT (SOMATOM Definition Flash, Siemens Healthineers, Forchheim) untersucht (Tag 0, Baseline). Die Injektion des iodhaltigen Kontrastmittels (Ultravist 370®, Bayer HealthCare, Berlin; 2 ml/kg) erfolgte standardisiert mit einer speziellen Kleintier-Injektionspumpe (Harvard Apparatus PHD2000 Series, Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA) über einen Schwanzvenenkatheter. Dann wurden die Tiere über eine Woche mit Regorafenib (Therapiegruppe, 10 mg/kg) oder Placebo (Kontrollgruppe) therapiert. An Tag 7 erfolgte die Follow-up-Untersuchung. Für die Perfusions-CT-Messungen wurden folgende Parameter der Tumormikrozirkulation mit einem 2-Compartment-Uptake-Modell berechnet: Plasmafluss  $F_p$  (ml/100 ml/min), endotheliale Permeabilität  $PS$  (ml/100 ml/min) und Plasmavolumen  $V_p$  (%). Im Anschluss wurden die Tiere getötet und die Tumoren zur weiteren immunhistochemischen Aufarbeitung (Mikrogefäßdichte – CD31, Proliferation – Ki-67, Apoptose – TUNEL) in Formalin fixiert. In der Therapiegruppe zeigten sich zwischen Baseline und Follow-up eine signifikante Reduktion von  $V_p$  (von

15,7±5,3 % an Tag 0 zu 5,5±3,5 % an Tag 7;  $p<0,05$ ) und eine Reduktion von  $F_p$  mit einem Trend zur Signifikanz (von 12,8±2,3 ml/100 ml/min an Tag 0 zu 8,8±2,9 ml/100 ml/min an Tag 7;  $p=0,063$ ). In der Kontrollgruppe waren eine signifikante Zunahme von  $F_p$  (von 15,0±5,0 ml/100 ml/min an Tag 0 zu 23,4±3,7 ml/100 ml/min an Tag 7;  $p<0,05$ ) und eine nicht signifikante Zunahme von  $V_p$  (von 14,1±3,6 % an Tag 0 zu 16,5±8,4 % an Tag 7;  $p>0,05$ ) nachzuweisen. Abb. 1 zeigt exemplarisch farbkodiert den Plasmafluss  $F_p$  eines Tumors der Therapiegruppe an Tag 0 (Baseline) und Tag 7 (Follow-up). PS zeigte in der Therapiegruppe eine nicht signifikante Abnahme (von 7,4±5,8 ml/100 ml/min an Tag 0 zu 3,3±0,9 ml/100 ml/min an Tag 7;  $p>0,05$ ) und in der Kontrollgruppe eine nicht signifikante Zunahme (von 4,8±3,6 ml/100 ml/min an Tag 0 zu 9,0±3,2 ml/100 ml/min an Tag 7;  $p>0,05$ ). Es ließ sich eine signifikante lineare Korrelation zwischen Plasmafluss  $F_p$  und der ebenfalls unter Regorafenib-Therapie supprimierten Tumormikrogefäßdichte (CD31) nachweisen ( $r=0,84$ ;  $p<0,05$ ). Das Plasmavolumen  $V_p$  zeigte ebenfalls eine signifikante positive Korrelation zur Tumormikrogefäßdichte ( $r=0,66$ ;  $p<0,05$ ) und darüber hinaus eine signifikante, inverse Korrelation zur therapieinduzierten Apoptose (TUNEL) ( $r= -0,71$ ;  $p<0,05$ ).



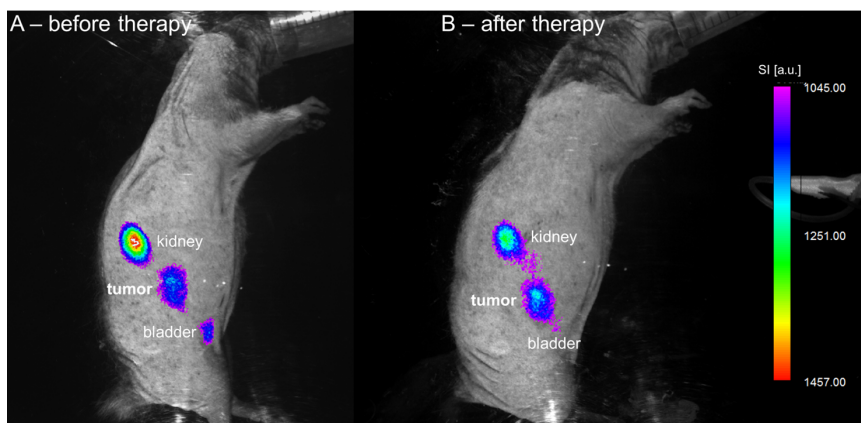
**Abb. 1. Farbkodierte Perfusions-CT eines Tieres der Therapiegruppe vor und nach Regorafenib-Therapie.** A – Baseline; B – Follow-up. Unter Therapie zeigte sich eine signifikante Abnahme des Plasmaflusses  $F_p$  (B vs. A). Aus [7].

Zusammenfassend konnte in Teilprojekt 1 gezeigt werden, dass die Perfusions-CT das Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte in vivo in Korrelation zum immunhistochemischen Referenzstandard erlaubt.

**Teilprojekt 2: Annexin-basierte OI und Perfusions-MRT zur Untersuchung des therapieinduzierten Zelltods im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte unter Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib (Kazmierczak PM et al. PLoS One 2015; IF 3,057) [17]**

Die pro-apoptotischen Effekte von Regorafenib beim Kolonkarzinom werden über PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) und SHP-1 (SH2-domain-containing phosphatase 1) vermittelt [4, 13]. Fluoreszenzmarkiertes Annexin A5 bindet spezifisch an das von frühapoptotischen Zellen externalisierte Phosphatidylserin (PS) und erlaubt somit die OI-basierte Visualisierung der Apoptose-Aktivität im Tumor [23]. Hypothese des Teilprojekts 2 war, dass die Annexin-basierte OI in Kombination mit der Perfusions-MRT eine in-vivo-Darstellung der pro-apoptotischen und anti-angiogenetischen Effekte einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte erlaubt. Das Tumormodell (subkutane HT-29-Xenografts in athymischen Nacktratten) war identisch mit Teilprojekt 1. Nach Randomisierung in Therapie- und Kontrollgruppe (je n=8) wurden die Tiere mit OI und Perfusions-MRT untersucht (an Tag 0/Baseline und Tag 7/Follow-up). Analog zu Teilprojekt 1 wurden die Tiere nach der Baseline-Messung über den Zeitraum von einer Woche mit Regorafenib (10 mg/kg) oder Placebo therapiert, im Anschluss geopfert und die Tumoren für die immunhistochemische Aufarbeitung (Apoptose – TUNEL, Proliferation – Ki-67, Mikrogefäßdichte – CD31) explantiert. Die OI-Messungen wurden nativ und 2 h nach i. v. Injektion des PS-spezifischen Tracers Annexin Vivo 750 (Perkin Elmer, Waltham, MA) an einem dedizierten Kleintier-Scanner (In-Vivo FX Pro, Bruker Corp., Billerica, MA) durchgeführt. Die Tracer-Bindung im Tumor wurde semiquantitativ mit dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise Ratio, SNR) erfasst. Die Perfusions-MRT-Datensätze wurden im Anschluss an einem klinischen 3-Tesla-Gerät (MAGNETOM Verio, Siemens Healthineers, Erlangen) akquiriert. Über einen in die Schwanzvene gelegten Zugang wurde ein klinisches niedermolekulares MRT-Kontrastmittel (Gadobutrol; Gadovist®, Bayer HealthCare, Leverkusen) mit einer dedizierten Kleintier-Injektionspumpe (Harvard Apparatus PHD2000 Series, Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA; Injektionsgeschwindigkeit 7,2 ml/s) injiziert. Die Perfusionsmessung erfolgte mit einer 3D-View-Sharing-Sequenz mit einer zeitlichen Auflösung von 1,3 s (TWIST; Time-Resolved Angiography with Stochastic Trajectories). Zielparameter der Perfusions-MRT waren der Plasmafluss

PF und das Plasmavolumen PV, berechnet über ein 2-Compartment-Uptake-Modell. Der PS-spezifische Tracer zeigte eine tumorspezifische Bindung mit einer signifikanten Zunahme des Tumor-SNR unter Therapie (mittleres  $\Delta$ SNR  $+7,78 \pm 2,95$  vs.  $-0,80 \pm 2,48$  in der Kontrollgruppe;  $p=0,021$ ) (Abb. 2). Der Plasmafluss nahm unter Therapie signifikant ab (mittleres  $\Delta$ PF  $-8,17 \pm 2,32$  ml/100 ml/min vs.  $-0,11 \pm 3,36$  ml/100 ml/min in der Kontrollgruppe;  $p=0,036$ ), während keine signifikante Änderung des Plasmavolumens beobachtet werden konnte. Analog konnte eine signifikante, therapieinduzierte Zunahme der Tumorzellapoptose nachgewiesen werden (TUNEL,  $11.392 \pm 1.486$  in der Therapiegruppe vs.  $2.921 \pm 334$  in der Kontrollgruppe;  $p=0,001$ ).

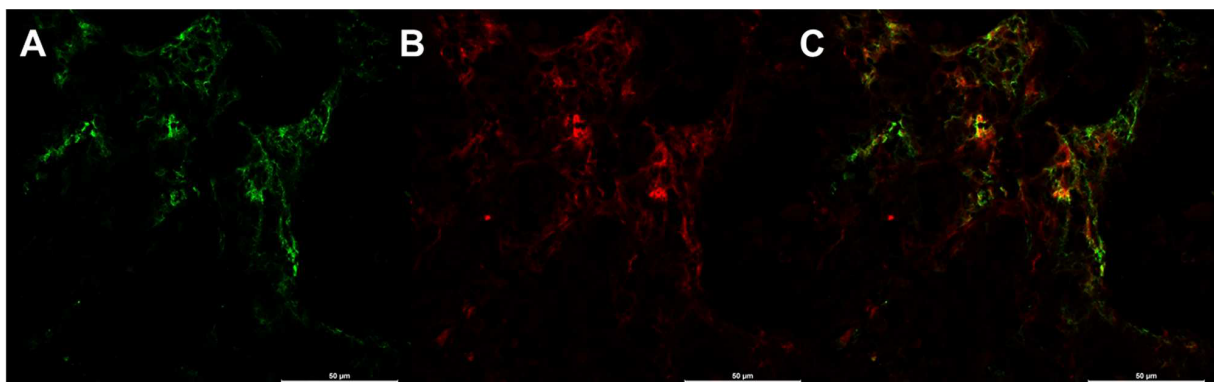


**Abb. 2. Farbkodierte OI-Bilder eines Tumors unter Regorafenib-Therapie.** A – vor Therapie; B – nach Therapie; SI – Signalintensität; a. u. – arbitrary units. Nach der einwöchigen Therapie wurde ein signifikanter Anstieg des PS-spezifischen Tumorsignals nachgewiesen (B vs. A). Aus [17].

In Teilprojekt 2 konnte gezeigt werden, dass ein kombiniertes, multimodales Bildgebungsprotokoll aus Annexin-basierter OI und Perfusions-MRT das nicht-invasive Monitoring der pro-apoptischen und anti-angiogenetischen Effekte einer Regorafenib-Therapie in vivo erlaubt. Die Apoptose-Bildgebung mit Annexin A5 kann dabei allerdings nicht sicher zwischen Apoptose und sekundärer Nekrose unterscheiden. Abhängig von der phagozytischen Aktivität im Tumor kommt es nach der Apoptose zur Autolyse der Zellen und zur sekundären Nekrose [25]. Das primär membrangebundene PS wird dabei freigesetzt und kann ebenfalls von Annexin A5 gebunden werden. Daher ist die Annexin-basierte OI nicht apoptosespezifisch, sondern bildet den therapieinduzierten Zelltod (Gesamtheit von Apoptose und sekundärer Nekrose) ab.

**Teilprojekt 3:  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MRT zum Monitoring der frühen anti-angiogenetischen Effekte einer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus (Kazmierczak PM et al. Invest Radiol 2016; IF 5,195) [19]**

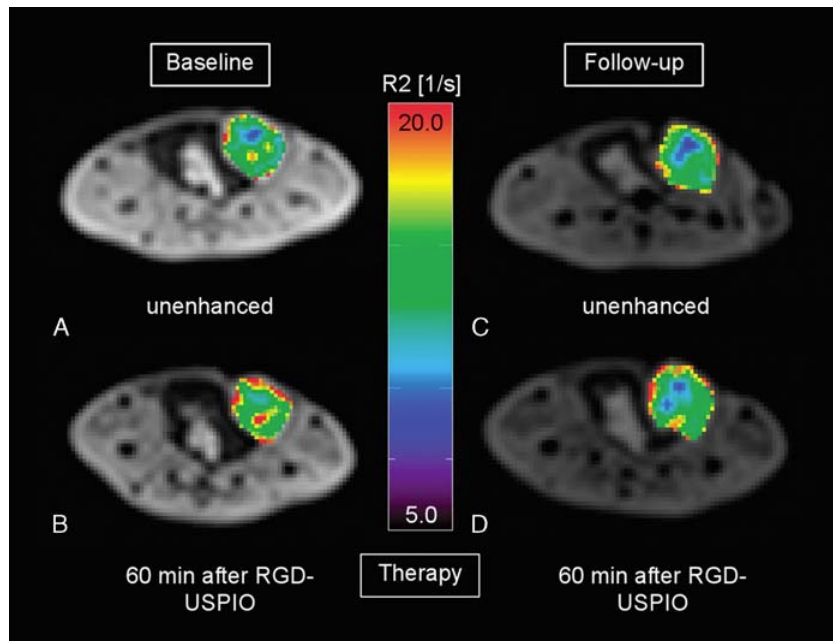
$\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist ein Transmembran-Protein, das von Tumorzellen und angiogenetisch aktivem Endothel überexprimiert wird. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression und -metastasierung und ist ein Marker der angiogenetischen Aktivität. Ein neu entwickeltes, spezifisch an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindendes, auf superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (RGD-USPIO) basierendes kommerziell erhältliches MRT-Kontrastmittel (P04000, Guerbet, Villepinte, Frankreich) ermöglicht die MRT-Bildgebung  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimierender Zielgewebe in vivo. Die Hypothese von Teilprojekt 3 war, dass die RGD-USPIO-MRT zum Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte einer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus in Korrelation zur multiparametrischen Immunhistochemie in vivo eingesetzt werden kann. Obwohl Bevacizumab spezifisch humanes VEGF bindet, besitzt es anti-angiogenetische Wirkung in humanen Tumormodellen in Mäusen [20]. Bevacizumab bindet das humane, vom Tumor sezernierte VEGF und inhibiert so die Aktivierung des kreuzreaktiven murinen VEGF-Rezeptors flk-2 [20]. Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Mäusen (n=20) wurden humane Mammakarzinom-Xenografts (MDA-MB-231) orthotop in die Milchleiste implantiert. MDA-MB-231-Xenografts eignen sich besonders gut für die Untersuchung der Tumorangiogenese, da die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in diesem Tumormodell weitgehend auf das Endothel beschränkt ist. Das akquirierte Bildsignal wird somit vom endothelialen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bestimmt und nicht durch zellgebundenes  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin überlagert (Abb. 3).



**Abb. 3.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Fluoreszenz-Doppelfärbung.** A –  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin; B – CD31; C –  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Doppelfärbung. Koexpression von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (grün) und dem Endothelrezeptor

CD31 (rot) (C) als Nachweis der überwiegend endothelialen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in MDA-MB-231-Tumoren. Aus [19].

Die Tiere wurden in Therapie- und Kontrollgruppe (je n=10) randomisiert und vor (Tag 0, Baseline) sowie nach (Tag 7, Follow-up) einer einwöchigen Bevacizumab-Therapie (5 mg/kg) oder Placebo mit RGD-USPIO-MRT untersucht. Die MRT wurde an einem klinischen 3-Tesla-Gerät (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen) vor und 60 min nach i. v. Injektion der RGD-USPIO (200  $\mu$ mol Fe/kg) durchgeführt. Eisen führt zu Magnetfeldinhomogenitäten, die eine Verkürzung der T2-Zeit bewirken. Zur semiquantitativen Erfassung der Eisen- und somit Kontrastmittelbindung im Tumor wurde eine R2-Relaxometrie mit n=4 Echozeiten durchgeführt (TE=20/40/60/80 ms; TR 3800 ms, 2 Averages, rekonstruierte Matrix 128x128, FOV 50 x 50 mm, Schichtdicke 1,2 mm, Akquisitionszeit 24:56 min). MRT-Zielparameter war die R2-Relaxationsrate als Maß für die Kontrastmittelbindung im Tumor ( $R2=1/T2$ ). Nach der Therapie wurden die Tiere geopfert, die Tumoren explantiert und immunhistochemisch analysiert ( $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Mikrogefäßdichte – CD31, Proliferation – Ki-67, Apoptose – TUNEL). Die RGD-USPIO zeigten eine selektive Bindung an das Endothel der Tumorgefäße. In der Therapiegruppe konnte eine signifikante Abnahme der RGD-USPIO-Bindung unter anti-VEGF-Therapie verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $\Delta R2_{\text{Therapie}} 0,80 \pm 0,78 \text{ s}^{-1}$  vs.  $\Delta R2_{\text{Kontrolle}} +0,27 \pm 0,59 \text{ s}^{-1}$ ;  $p=0,002$ ) (Abb. 4). Die immunhistochemisch nachgewiesene  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression war entsprechend in der Therapiegruppe signifikant reduziert ( $91 \pm 30$  vs.  $357 \pm 72$  in der Kontrollgruppe). Im Gegensatz zu der RGD-USPIO-Bindung nahmen die Tumorumfänge in beiden Gruppen während der Behandlung zu ( $\Delta \text{Vol}_{\text{Therapie}} +71 \pm 40 \mu\text{l}$  vs.  $\Delta \text{Vol}_{\text{Kontrolle}} +125 \pm 81 \mu\text{l}$ ;  $p > 0,05$ ).



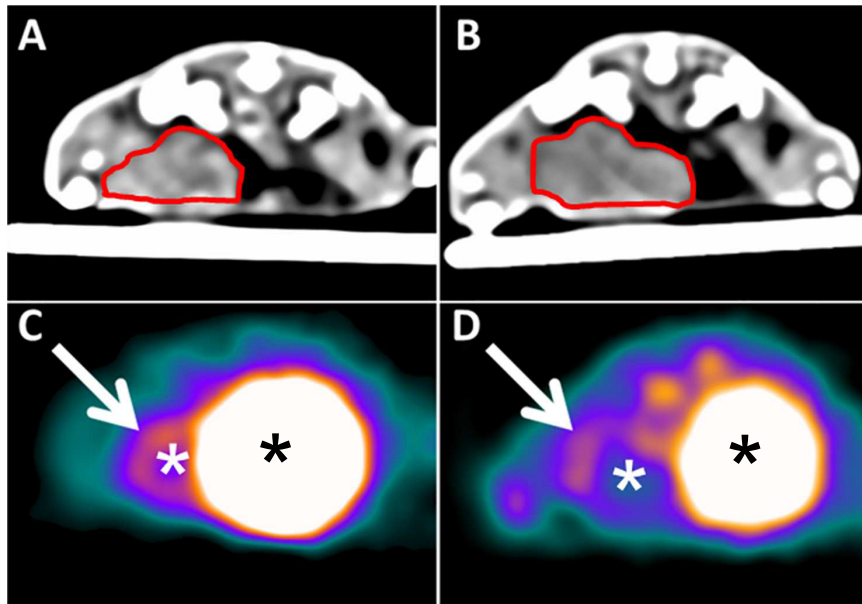
**Abb. 4. Repräsentative farbkodierte R2-Maps eines Tumors aus der Therapiegruppe.** A – Baseline, nativ; B – Baseline, 60 min nach RGD-USPIO-Injektion; C – Follow-up, nativ; D – Follow-up, 60 min nach RGD-USPIO-Injektion. Unter anti-angiogenetischer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab zeigte sich eine signifikante Reduktion der RGD-USPIO-Bindung im Tumor (D vs. B). Aus [19].

In Teilprojekt 3 konnte gezeigt werden, dass die MRT mit spezifisch an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindenden RGD-USPIO die indirekte Messung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus als Surrogatmarker der Angiogenese unter Therapie mit Bevacizumab in Korrelation zur ex-vivo-Immunhistochemie erlaubt.



**Teilprojekt 4:  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische PET zum Monitoring der frühen anti-angiogenetischen Effekte einer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus (Kazmierczak PM et al. PLoS One 2016; IF 2,806) [20]**

Neben RGD-USPIO (Teilprojekt 3) eröffnen auch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische PET-Radiotracer die Möglichkeit der Angiogenesebildung in vivo. Die Hypothese von Teilprojekt 4 war, dass die PET mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Radiotracer  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> das Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte einer Bevacizumab-Therapie im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus ermöglicht. Um eine selektive Bildgebung des endothelialen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zu gewährleisten, wurden Tumormodell und Versuchsablauf analog zu Teilprojekt 3 gewählt: MDA-MB-231-Xenografts in SCID-Mäusen, einwöchige Therapie mit Bevacizumab oder Placebo, Bildgebung an Tag 0 und 7. Um kompetitive Bindungseffekte zwischen dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-bindenden Radiotracer und der immunhistochemischen Färbung auszuschließen, wurde zusätzlich zur Bildgebungsgruppe (n=13; Therapie n=7, Kontrolle n=6) eine Immunhistochemie-Kohorte (n=12; Therapie n=6, Kontrolle n=6) untersucht. Die PET-Bildgebung erfolgte an einem dedizierten Kleintier-PET (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthineers Molecular Imaging, Knoxville, TN) (Transmission-/Emission-Scans 53 bis 90 min nach i. v. Injektion von 20 MBq  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>). Im Anschluss an die PET wurde eine native CT (SOMATOM Force, Siemens Healthineers, Forchheim) zur Tumorlokalisation und anatomischen Koregistrierung durchgeführt. Unter Therapie zeigten sich eine signifikante Abnahme der Target-to-Background Ratio (TBR) als semiquantitatives Maß für die niedrigere Tracerbindung im Tumor ( $\Delta\text{TBR}_{\text{Therapie}} -1,07\pm 0,83$ ,  $\Delta\text{TBR}_{\text{Kontrolle}} +0,32\pm 1,01$ ; p=0,022) sowie analog eine signifikante Suppression des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus (Therapie:  $308\pm 135$ , Kontrolle  $635\pm 325$ ; p=0,03). Abb. 5 zeigt ein repräsentatives Tier aus der Therapiegruppe.



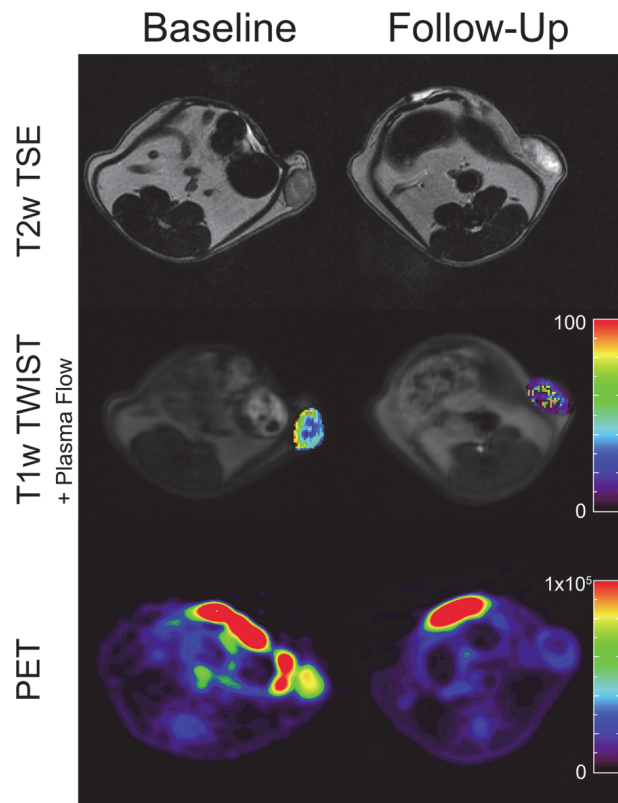
**Abb. 5. Verlauf der  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD) $_3$ -Bindung eines repräsentativen Tieres der Therapiegruppe.** A – CT, Baseline; B – CT, Follow-up; C – PET, Baseline; D – PET, Follow-up. Der Tumor ist rot umrandet (A und B, CT) bzw. durch Pfeil und weißen Stern (C und D, PET) markiert. Die mit dem Radiotracer gefüllte Harnblase ist in den PET-Bildern durch einen schwarzen Stern gekennzeichnet (C und D). Unter Therapie zeigte sich eine signifikante Reduktion der Bindung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Radiotracers (D vs. C). Aus [20].

Die Target-Spezifität des Radiotracers wurde durch kombinierte Autoradiographie- und OI-Experimente nach Rezeptorblockade mit einem spezifisch an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindenden Antikörper nachgewiesen. Das Tumolvolumen nahm in beiden Gruppen während der einwöchigen Behandlung zu ( $\Delta\text{Volumen}_{\text{Therapie}} +134\pm 77 \mu\text{l}$ ,  $\Delta\text{Volumen}_{\text{Kontrolle}} +132\pm 56 \mu\text{l}$ ;  $p=1,000$ ).

Zusammenfassend konnte in Teilprojekt 4 gezeigt werden, dass die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-RGD-PET das Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte der Bevacizumab-Therapie im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus erlaubt und dabei zur morphologischen Bildgebung (CT-Tumorummetrie) zusätzliche, komplementäre Informationen über das Therapieansprechen in Korrelation zur Immunhistochemie generiert.

**Teilprojekt 5: Korrelation von  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET und Perfusions-MRT zum Monitoring einer Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte (Eschbach RS, Kazmierczak PM, et al. PLoS One 2015; IF 3,057) [11]**

Die Hypothese von Teilprojekt 5 war, dass ein kombiniertes Bildgebungsprotokoll aus  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET und Perfusions-MRT das Monitoring der anti-proliferativen und anti-angiogenetischen Effekte einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte erlaubt. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine mögliche Korrelation zwischen den PET- und den MRT-Perfusionsparametern besteht, die Rückschlüsse auf eine potentielle Verbindung zwischen Tumorglukosemetabolismus und Tumormikrozirkulation zulässt. Humane Kolonkarzinom-Xenografts (HT-29) wurden n=17 weiblichen athymischen Nacktratten subkutan in die Flanke implantiert. Nachdem die Tumoren ein Volumen von  $800\text{ mm}^3$  erreicht hatten, wurden die Tiere in Therapie- (n=10) und Kontrollgruppe (n=7) randomisiert und bildgebend mit PET und MRT untersucht. Die PET wurde an einem dedizierten Kleintier-PET (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthineers Molecular Imaging, Knoxville, TN) durchgeführt (Transmission-/Emission-Scans 0 bis 30 min nach i. v. Injektion von  $50\text{ MBq }^{18}\text{F}$ -FDG). Semiquantitativer Zielparameter der PET war die Tumor-to-Background Ratio (TTB). Die MRT-Perfusions-Bildgebung erfolgte an einem klinischen 3-Tesla-Scanner (MAGNETOM Verio, Siemens Healthineers, Erlangen) wie für Teilprojekt 2 beschrieben, mit den Zielparametern Plasmafluss PF, Plasmavolumen PV und endotheliale Permeabilität PS. Nach Baseline-Bildgebung an Tag 0 wurden die Tiere mit Regorafenib (10 mg/kg) oder Placebo therapiert. An Tag 7 erfolgte die Follow-up-Bildgebung. Danach wurde der Versuch beendet, die Tumoren explantiert und immunhistochemisch aufgearbeitet (Mikrogefäßdichte – CD31, Proliferation – Ki-67). Die Regorafenib-Therapie führte zu einer signifikanten ( $p<0,05$ ) Suppression aller MRT-Perfusionsparameter (PF: von  $81,1\pm 7,5\text{ ml}/100\text{ ml}/\text{min}$  an Tag 0 auf  $50,6\pm 16,0\text{ ml}/100\text{ ml}/\text{min}$  an Tag 7; PV: von  $12,1\pm 3,6\%$  an Tag 0 auf  $7,5\pm 1,6\%$  an Tag 7; PS: von  $13,6\pm 3,2\text{ ml}/100\text{ ml}/\text{min}$  an Tag 0 auf  $7,9\pm 2,3\text{ ml}/100\text{ ml}/\text{min}$  an Tag 7) und der TTB (von  $3,4\pm 0,6$  an Tag 0 auf  $1,9\pm 1,1$  an Tag 7) von Baseline zu Follow-up (Abb. 6). Die MRT-Perfusionsparameter zeigten eine gute, signifikante Korrelation zu  $\Delta\text{TTB}$  ( $r=0,67-0,78$ ;  $p<0,01$ ) sowie signifikante Korrelationen zur Tumorpherationsrate (Ki-67,  $r=0,57-0,67$ ;  $p<0,03$ ) und Tumormikrogefäßdichte (CD31,  $r=0,49-0,55$ ;  $p<0,05$ ).



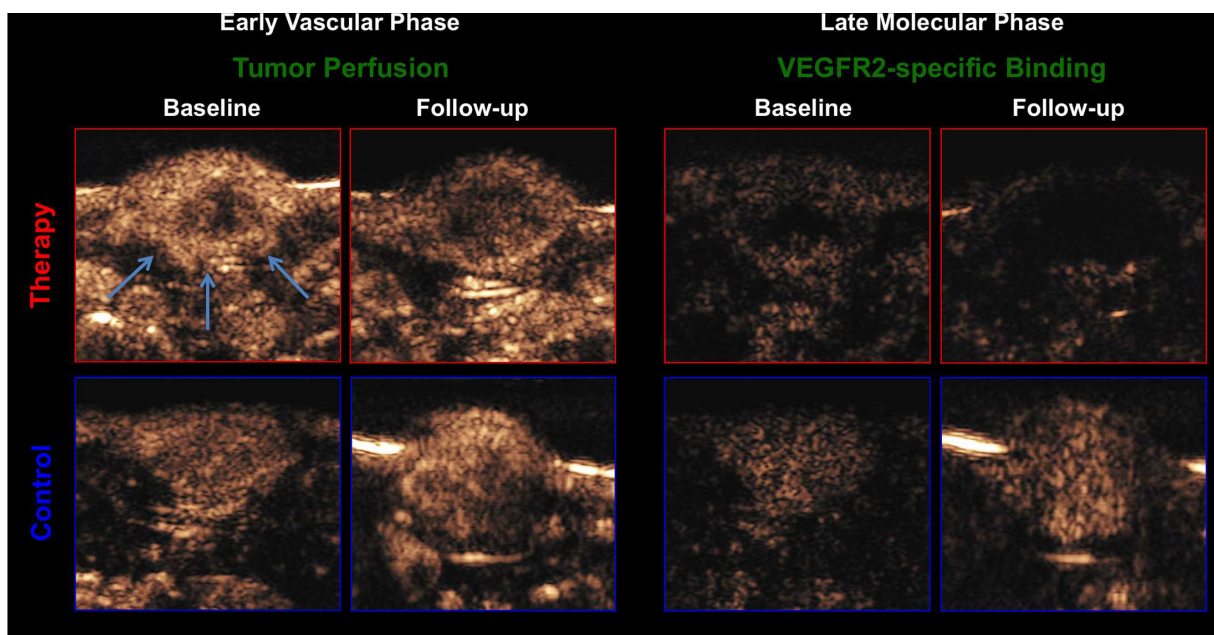
**Abb. 6. Multimodale Bildgebung des Kolonkarzinom-Xenografts unter Regorafenib-Therapie.** Obere Reihe: T2-gewichtete MRT-Bilder (Morphologie); mittlere Reihe: Tumorperfusion (Funktion); untere Reihe:  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (Tumorglukosemetabolismus). Signifikante Suppression der Tumorperfusion (Mitte) und des Tumorglukosemetabolismus (unten) unter Therapie. Die T2-gewichteten Bilder (oben) zeigen eine zunehmende zentrale Nekrose ohne signifikante Größenänderung des Tumors unter Therapie. Aus [11].

In Teilprojekt 5 wurde die Hypothese bestätigt, dass ein multimodales Bildgebungsprotokoll aus  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET und Perfusions-MRT das Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte der Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte erlaubt. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen den MRT-Perfusionsparametern und dem Tumorglukosemetabolismus nachgewiesen werden.

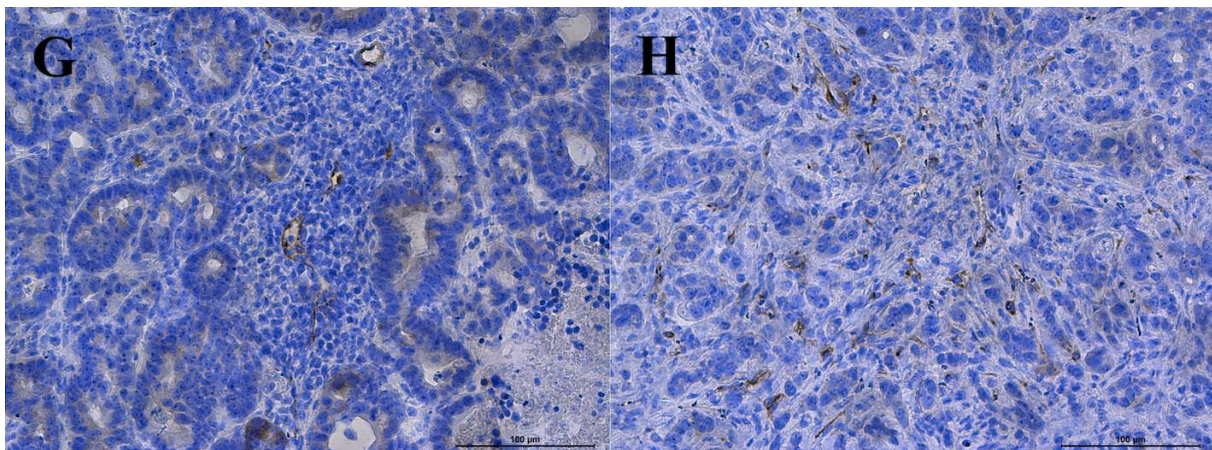
**Teilprojekt 6: Kontrastverstärkter Ultraschall mit VEGFR2-spezifischen Microbubbles und Perfusions-MRT zum Monitoring einer Therapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte (Eschbach RS, Kazmierczak PM, et al. PLoS One 2017; IF 2,766) [10]**

In diesem Teilprojekt wurde ein spezifisch an den VEGFR2 bindendes Ultraschallkontrastmittel (BR55, Bracco Suisse SA, Genf, Schweiz) untersucht. Neben einer Darstellung der Tumorperfusion (frühe Phase unmittelbar nach i. v. Injektion) erlaubt BR55 in einer späten Phase (8-10 min nach i. v. Injektion) die spezifische Darstellung der endothelialen VEGFR2-Expression in vivo. VEGF wirkt pro-angiogenetisch, u. a. über indirekte, Rezeptor-vermittelte Aktivierung von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit konsekutiv gesteigerter Migration und Adhäsion von Endothelzellen [3]. Der Großteil der VEGF-Wirkungen wird über VEGFR2 vermittelt. Das Ausmaß der VEGFR2-Expression generiert somit Informationen über die Angiogeneseaktivität im Tumor. Hypothese von Teilprojekt 6 war, dass der kontrastverstärkte Ultraschall mit VEGFR2-spezifischen Microbubbles in Korrelation zur Perfusions-MRT das Monitoring einer Regorafenib-Therapie im humanen Kolonkarzinom-Modell der Ratte erlaubt, ex vivo validiert durch multiparametrische Immunhistochemie. Das Tumormodell (HT-29) und die Therapie (Regorafenib vs. Placebo) wurden analog zu den oben beschriebenen Teilprojekten 1, 2, 4 und 5 gewählt. Insgesamt wurden n=21 Tiere untersucht (Therapiegruppe n=11, Kontrollgruppe n=10). An Tag 0 (Baseline) und Tag 7 (Follow-up) erfolgte die Bildgebung mit Perfusions-MRT und kontrastverstärktem, VEGFR2-spezifischem Ultraschall. Die Perfusions-MRT wurde wie für Teilprojekt 2 beschrieben durchgeführt. Die kontrastverstärkte Sonographie erfolgte mit einem klinischen Ultraschallgerät (Acuson Sequoia 512, Siemens Healthineers, Erlangen) mit einem konventionellen 15L8-Linearschallkopf (7 MHz, 80 dB, Eindringtiefe 25 mm, Time-Gain-Kompensation, Fokus auf den größten Tumordurchmesser eingestellt). Zielparameter des Ultraschalls waren die wash-in area under the curve (WiAUC) als Maß für die frühe Tumorperfusion und die Tumor-Signalintensitäten  $SI_{8min}$  bzw.  $SI_{10min}$  als Surrogat der späten, VEGFR2-spezifischen Kontrastmittelbindung. Nach der Follow-up-Bildgebung an Tag 7 wurde der Versuch beendet und die Tumoren für die immunhistochemische Aufarbeitung (VEGFR2-Rezeptorstatus, Mikrogefäßdichte – CD31, Proliferation – Ki-67) explantiert. Unter Regorafenib-Therapie konnte mit dem

kontrastverstärkten Ultraschall eine signifikante Abnahme der Tumorperfusion nachgewiesen werden (WiAUC von  $116.989 \pm 77.048$  a. u. an Tag 0 zu  $30.076 \pm 27.095$  a. u. an Tag 7;  $p=0,005$ ). In der Kontrollgruppe konnte hingegen keine signifikante Änderung der Tumorperfusion beobachtet werden (von  $133.932 \pm 65.960$  a. u. an Tag 0 zu  $84.316 \pm 74.144$  a. u. an Tag 7;  $p=0,093$ ). In der Therapiegruppe war das VEGFR2-spezifische Signal signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $SI_{8min}$ :  $283 \pm 191$  vs.  $802 \pm 460$  a. u.;  $p=0,006$ ;  $SI_{10min}$ :  $226 \pm 149$  vs.  $645 \pm 461$  a. u.;  $p=0,009$ ) (Abb. 7). In Übereinstimmung damit zeigte sich immunhistochemisch eine signifikante Suppression der VEGFR2-Expression unter Therapie ( $7.2 \pm 1.8$  vs.  $17.8 \pm 4.6$  in der Kontrollgruppe;  $p < 0,001$ ) (Abb. 8).



**Abb. 7. Tumorperfusion und späte VEGFR2-spezifische Phase von repräsentativen Tumoren der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach der einwöchigen Behandlung mit Regorafenib oder Placebo.** Oben: Signifikante Reduktion der Tumorperfusion (links) und des VEGFR2-spezifischen Ultraschallsignals (rechts) unter Regorafenib-Therapie. Unten: Anstieg der Tumorperfusion (links) und des VEGFR2-spezifischen Ultraschallsignals (rechts) in der Kontrollgruppe. Aus [10].



**Abb. 8. VEGFR2-Färbungen repräsentativer Tumorschnitte. G – Therapiegruppe; H – Kontrollgruppe.** Nach Regorafenib-Therapie zeigte sich eine signifikant niedrigere VEGFR2-Expression (braungefärbt). Aus [10].

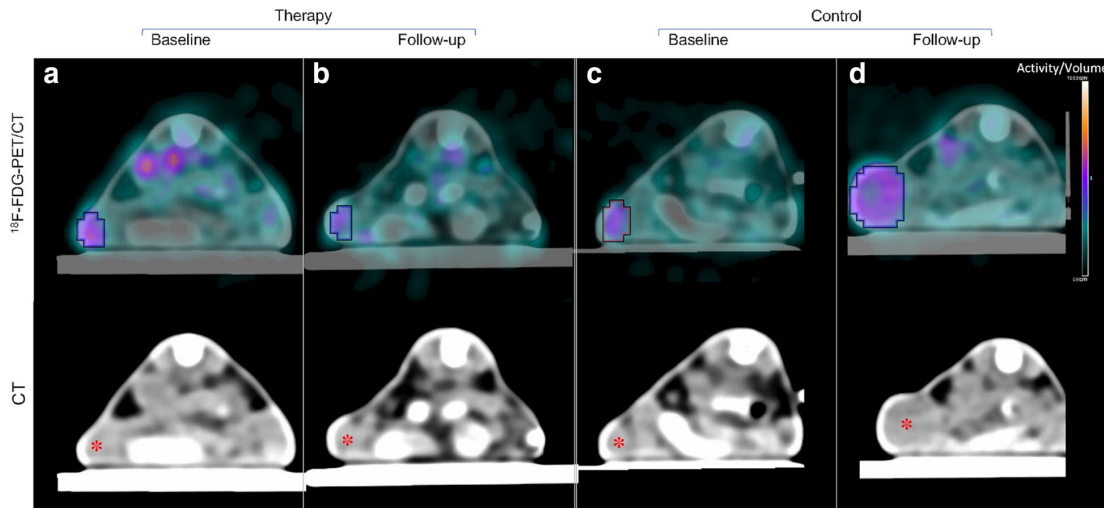
Die Perfusions-MRT konnte ebenfalls eine signifikante Suppression der Tumormikrozirkulation unter Therapie nachweisen (PF: von  $147 \pm 58$  ml/100 ml/min an Tag 0 zu  $71 \pm 15$  ml/100 ml/min an Tag 7;  $p=0,003$ ; PV: von  $13 \pm 3$  % an Tag 0 auf  $9 \pm 4$  % an Tag 7;  $p=0,040$ ). Die Ultraschall-Parameter zeigten signifikante ( $p < 0,05$ ) Korrelationen zur Immunhistochemie und den MRT-Perfusionsparametern. Teilprojekt 6 konnte somit zeigen, dass der kontrastverstärkte Ultraschall mit VEGFR2-spezifischen Microbubbles in Korrelation zur Immunhistochemie und ebenso wie die Perfusions-MRT das nicht-invasive Monitoring der anti-angiogenetischen Effekte der Regorafenib-Therapie ermöglicht.

**Teilprojekt 7:  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT zum Monitoring einer BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanommodell der Maus (Eschbach RS, Kazmierczak PM et al. *Cancer Imaging* 2018 – geteilte Erstautorenschaft; IF 3,016) [12]**

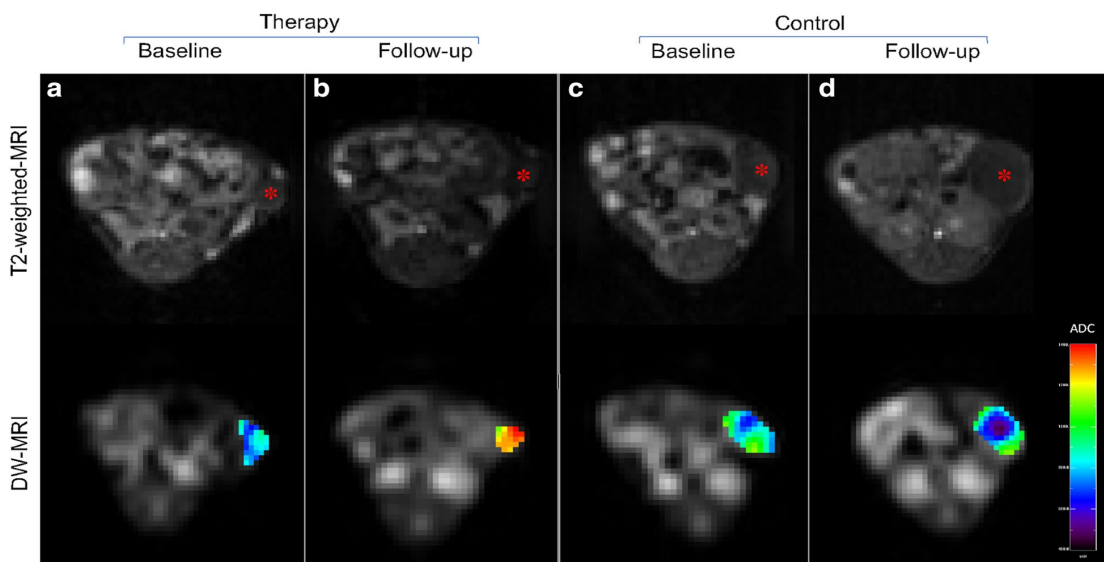
Die selektive Hemmung des mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalwegs mit BRAF-Inhibitoren stellt einen neuen Therapieansatz beim fortgeschrittenen malignen Melanom dar. BRAF-Inhibitoren zeigen initial hohe Ansprechraten, sind aber im Verlauf häufig durch Resistenzentwicklung limitiert [22, 26, 28]. Die Inhibition der CDK 4 und 6 ist ein neuer, experimenteller Therapieansatz zur Ausschaltung der Cyclin-D1-vermittelten BRAF-Inhibitor-Resistenz bei BRAF-mutierten malignen Melanomen. Hypothese von Teilprojekt 7 war, dass eine experimentelle BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie signifikante anti-angiogenetische und anti-proliferative Effekte bei experimentellen malignen Melanomen zeigt und diese durch  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT dargestellt werden können. BALB/c Nacktmäusen (n=21) wurden humane Melanom-Xenografts (A375) subkutan in die Flanken implantiert. Nachdem die Tumoren einen Durchmesser von 0,5 cm erreicht hatten, wurden die Tiere in eine Therapie- (n=12) und eine Kontrollgruppe (n=9) randomisiert und mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und der diffusionsgewichteten MRT untersucht (Tag 0, Baseline). Mit der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET wurde die Tumor-to-Liver-Ratio (TTL) als semiquantitativer Parameter des Tumorglukosestoffwechsels bestimmt. Die diffusionsgewichtete MRT misst die Brown'sche Molekularbewegung von Wassermolekülen (Diffusivität), welche in Tumoren eingeschränkt ist. Der mit der diffusionsgewichteten MRT gemessene Apparent Diffusion Coefficient (ADC) ist somit ein semiquantitativer Parameter der Tumorzellularität [30]. Die PET wurde in gleicher Weise wie in den Teilprojekten 4 und 5 an einem dedizierten Kleintier-Scanner durchgeführt. Die MRT erfolgte an einem klinischen Scanner (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen). Nach der Baseline-Messung wurden die Tiere von Tag 1 bis 6 mit einer BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie (Dabrafenib, 20 mg/kg/d; Ribociclib, 100 mg/kg/d, beide Novartis AG, Basel, Schweiz) oder Placebo therapiert. An Tag 7 (Follow-up) wurde die Bildgebung wiederholt und der Versuch beendet. Nach der Tumorexplantation erfolgte die weitere immunhistochemische Analyse der Tumoren (CD31 – Mikrogefäßdichte, Ki-67 – Tumorzellproliferation). In der Therapiegruppe konnten



eine signifikante Suppression des Tumorglukosemetabolismus ( $\Delta TTL_{\text{Therapie}} -1,00 \pm 0,53$  vs.  $\Delta TTL_{\text{Kontrolle}} +0,85 \pm 1,21$ ;  $p < 0,001$ ) sowie eine signifikante Zunahme der Tumor-Diffusivität ( $\Delta ADC_{\text{Therapie}} 0,12 \pm 0,14 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s;  $\Delta ADC_{\text{Kontrolle}} -0,12 \pm 0,06 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s;  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden (Abb. 9 und 10).



**Abb. 9.** <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT-Datensätze von repräsentativen Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach der einwöchigen Behandlung mit BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor oder Placebo. Axiale Schichtführung. Obere Reihe: <sup>18</sup>F-FDG-PET. Untere Reihe: CT. a: Therapie, Baseline. b: Therapie, Follow-up. c: Kontrolle, Baseline. d: Kontrolle, Follow-up. In der Therapiegruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion des Tumorglukosemetabolismus unter Therapie (b vs. a, obere Reihe). In der Kontrollgruppe war eine Zunahme des Tumorglukosemetabolismus nachzuweisen (d vs. c, obere Reihe) bei gleichzeitiger Größenzunahme des Tumors (d vs. c, untere Reihe). Aus [12].



**Abb. 10.** Axiale MRT-Bilder von repräsentativen Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach der einwöchigen Behandlung mit BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor oder Placebo. Obere Reihe: morphologische MRT (T2-gewichtet). Untere Reihe: diffusionsgewichtete MRT (mit farbkodierter ADC-Karte des Tumors). a: Therapie, Baseline. b: Therapie, Follow-up. c: Kontrolle, Follow-up.

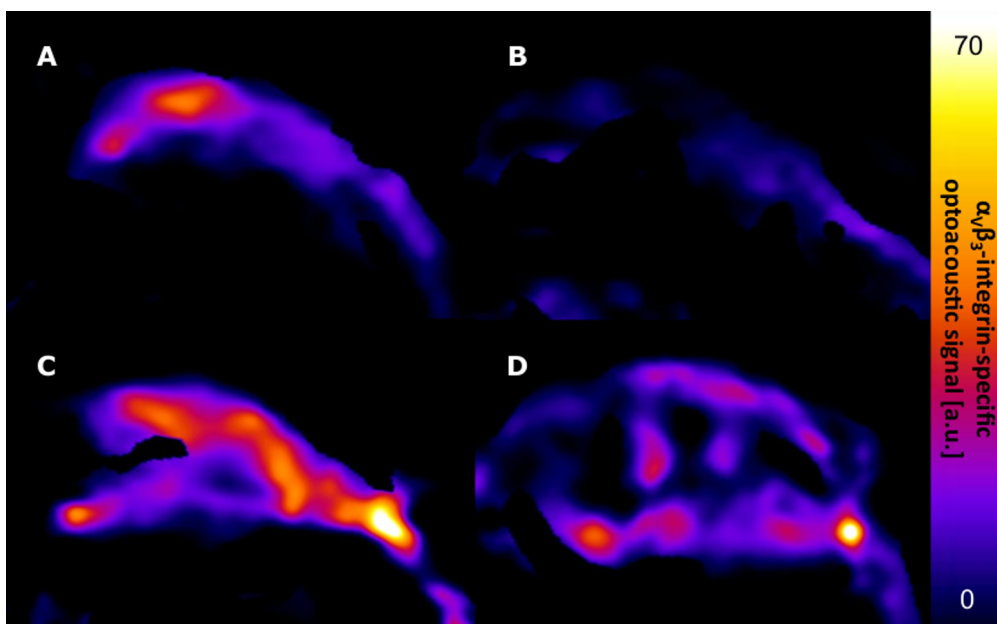
Baseline. d: Kontrolle, Follow-up. In der Therapiegruppe wurde eine signifikante Zunahme der Tumordiffusivität nachgewiesen (b vs. a, untere Reihe), während die Kontrollgruppe eine Abnahme zeigte (d vs. c, untere Reihe). Die morphologische MRT zeigte eine Zunahme des Tumorumfangs sowohl in der Therapie- als auch der Kontrollgruppe (b vs. a und c vs. d, obere Reihe). Aus [12].

Die immunhistochemische Analyse zeigte eine signifikant niedrigere Mikrogefäßdichte (CD31,  $147 \pm 48$  vs.  $287 \pm 92$ ;  $p=0,001$ ) und eine signifikant niedrigere Proliferationsrate (Ki-67,  $3718 \pm 998$  vs.  $5389 \pm 1332$ ;  $p=0,007$ ) in der Therapiegruppe. In Teilprojekt 7 konnte somit nachgewiesen werden, dass eine BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie anti-angiogenetische und anti-proliferative Effekte im humanen Melanommodell in der Maus zeigt und dass  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT ein multimodales Therapiemonitoring ermöglichen.

**Teilprojekt 8:  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung zum Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanommodell der Maus (Kazmierczak PM et al. PLoS One 2018; IF 2,766) [18]**

Die optoakustische Bildgebung ist eine neue Bildgebungs-Modalität, die auf dem optoakustischen Effekt beruht: Gepulstes Laserlicht regt ein Zielgewebe zur Emission von Ultraschallwellen an [34]. Die Ultraschallwellen werden registriert und in ein Bild umgewandelt. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl endogene (z. B. oxygeniertes und deoxygeniertes Hämoglobin, Melanin) als auch exogene Strukturen (z. B. spezifisch bindende Fluoreszenztracer) in vivo und in Echtzeit zu visualisieren. Nach Injektion eines  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers erlaubt die optoakustische Bildgebung die nicht-invasive Charakterisierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus, einem Angiogenese- und Tumorzellmarker, der bereits in den Teilprojekten 3 und 4 mit spezifisch bindendem MRT-Kontrastmittel und einem spezifisch bindenden Radiotracer (PET) untersucht wurde [16, 19, 20]. Die Hypothese von Teilprojekt 8 war, dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung das Monitoring einer BRAF- und MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanommodell der Maus erlaubt. Die BRAF-MEK-Inhibition stellt ebenso wie die in Teilprojekt 7 untersuchte BRAF- und CDK-4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie eine duale Hemmung des MAPK-Signalwegs dar. Ebenso wie in Teilprojekt 7 wurden das humane BRAF V600E-positive A375-Melanommodell in der BALB/c Nacktmaus gewählt und die Tiere nach Erreichen eines Tumordurchmessers  $>0,5$  cm in Therapie- und Kontrollgruppe (je  $n=5$ ) randomisiert. An Tag 0 wurde die Baseline-Bildgebung durchgeführt. Zusätzlich zur optoakustischen Bildgebung wurden morphologische MRT-Datensätze an einem klinischen Scanner (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen) akquiriert, um das Tumolvolumen unter Therapie als morphologisches Therapiemonitoring zu bestimmen. Die optoakustische Bildgebung erfolgte an einem präklinischen Scanner (inVision 256-TF, iThera Medical GmbH, München) nativ und 5 h nach i. v. Injektion eines kommerziell erhältlichen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers (IntegriSense 750, 4 nmol; Perkin Elmer, Waltham, MA). Das tumorspezifische Signal wurde dabei durch spectral unmixing gefiltert und quantifiziert. Dann wurden die Tiere von Tag 1 bis Tag 6 mit der BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie (Encorafenib, 1,3 mg/kg/d; Binimetinib, 0,6 mg/kg/d, beide Array BioPharma Inc., Boulder, CO) oder Placebo therapiert.

An Tag 7 erfolgte die Follow-up-Bildgebung, die Tiere wurden geopfert und die Tumoren explantiert. Die anschließende immunhistochemische Validierung erfolgte hinsichtlich  $\beta_3$ -Integrin-Expression, Mikrogefäßdichte (CD31) und Tumorzellproliferation (Ki-67). Unter Therapie zeigte sich eine signifikante Abnahme des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Tumorsignals in allen Tieren (von  $7,98 \pm 2,22$  a. u. an Tag 0 auf  $1,67 \pm 1,30$  a. u. an Tag 7;  $p=0,043$ ). In der Kontrollgruppe wurde keine signifikante Änderung nachgewiesen (von  $6,60 \pm 6,51$  a. u. an Tag 0 auf  $3,67 \pm 1,93$  an Tag 7;  $p=0,500$ ). Abb. 11 zeigt das farbkodierte optoakustische Tumorsignal in zwei repräsentativen Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe.



**Abb. 11.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifisches optoakustisches Tumorsignal vor und nach einer einwöchigen BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie oder Placebo.** Abgebildet sind Tumoren von repräsentativen Tieren der Therapie- und Kontrollgruppe. A: Therapie, Baseline. B: Therapie, Follow-up. C: Kontrolle, Baseline. D: Kontrolle, Follow-up. Unter Therapie war eine signifikante Reduktion des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen optoakustischen Tumorsignals nachzuweisen (B vs. A), während die Kontrollgruppe keine signifikante Änderung zeigte (D vs. C). Aus [18].

Die multiparametrische Immunhistochemie zeigte in Korrelation zu den Ergebnissen der Bildgebung eine signifikant niedrigere Integrin-Expression ( $\beta_3$ :  $0,20 \pm 0,02$  vs.  $0,39 \pm 0,05$ ;  $p=0,008$ ) und Mikrogefäßdichte (CD31:  $119 \pm 15$  vs.  $292 \pm 49$ ;  $p=0,008$ ) in der Therapie- verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Tumervolumina nahmen in beiden Gruppen zu (Therapie:  $+107 \pm 42$  mm<sup>3</sup>; Kontrolle  $+112 \pm 44$  mm<sup>3</sup>,  $p=0,841$ ). In-vivo-Blocking-Experimente mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten Cilengitid (800  $\mu$ g; Selleck Chemicals, Houston, TX; 15 min vor dem Fluoreszenztracer i. v. injiziert)

bestätigten die Rezeptorspezifität des verwendeten Fluoreszenztracers. Als Proof-of-Principle konnte in Teilprojekt 8 gezeigt werden, dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung das Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanommodell der Maus in Korrelation zur ex-vivo-Immunhistochemie erlaubt.

## 4 Literatur

1. Aggarwal S. Targeted cancer therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:427-8
2. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol* 2015;12:3-20
3. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 2000;6:851-60
4. Chen D, Wei L, Yu J, Zhang L. Regorafenib inhibits colorectal tumor growth through PUMA-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 2014;20:3472-84
5. Cheson BD. Staging and response assessment in lymphomas: the new Lugano classification. *Chinese Clinical Oncology* 2014;4:5
6. Choi H. Response evaluation of gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2008;13 Suppl 2:4-7
7. Cyran CC, Kazmierczak PM, Hirner H, et al. Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation. *PLoS One* 2013;8:e76009
8. Desar IM, van Herpen CM, van Laarhoven HW, et al. Beyond RECIST: molecular and functional imaging techniques for evaluation of response to targeted therapy. *Cancer Treat Rev* 2009;35:309-21
9. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47
10. Eschbach RS, Clevert DA, Hirner-Eppeneder H, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound with VEGFR2-Targeted Microbubbles for Monitoring Regorafenib Therapy Effects in Experimental Colorectal Adenocarcinomas in Rats with DCE-MRI and Immunohistochemical Validation. *PLoS One* 2017;12:e0169323
11. Eschbach RS, Fendler WP, Kazmierczak PM, et al. Correlation of perfusion MRI and 18F-FDG PET imaging biomarkers for monitoring regorafenib therapy in experimental colon carcinomas with immunohistochemical validation. *PLoS One* 2015;10:e0115543
12. Eschbach RS, Kazmierczak PM, Heimer MM, et al. (18)F-FDG-PET/CT and diffusion-weighted MRI for monitoring a BRAF and CDK 4/6 inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma. *Cancer Imaging* 2018;18:2
13. Fan LC, Teng HW, Shiau CW, et al. SHP-1 is a target of regorafenib in colorectal cancer. *Oncotarget* 2014;5:6243-51
14. Ganten MK, Ganten TM, Schlemmer HP. Radiological monitoring of the treatment of solid tumors in practice. *Rofo* 2014;186:466-73
15. Hayes SA, Pietanza MC, O'Driscoll D, et al. Comparison of CT volumetric measurement with RECIST response in patients with lung cancer. *Eur J Radiol* 2016;85:524-33
16. Herzog E, Taruttis A, Beziere N, et al. Optical imaging of cancer heterogeneity with multispectral optoacoustic tomography. *Radiology* 2012;263:461-8
17. Kazmierczak PM, Burian E, Eschbach R, et al. Monitoring Cell Death in Regorafenib-Treated Experimental Colon Carcinomas Using Annexin-Based Optical Fluorescence Imaging Validated by Perfusion MRI. *PLoS One* 2015;10:e0138452
18. Kazmierczak PM, Burton NC, Keinrath G, et al. Integrin-targeted quantitative optoacoustic imaging with MRI correlation for monitoring a BRAF/MEK inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma. *PLoS One* 2018;13:e0204930
19. Kazmierczak PM, Schneider M, Haberer T, et al. alphavss3-Integrin-Targeted Magnetic Resonance Imaging for the Assessment of Early Antiangiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. *Invest Radiol* 2016;51:746-55
20. Kazmierczak PM, Todica A, Gildehaus FJ, et al. 68Ga-TRAP-(RGD)3 Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of alphavss3-Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer. *PLoS One* 2016;11:e0168248
21. Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010;30:52-60
22. Manzano JL, Layos L, Buges C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med* 2016;4:237
23. Neves AA, Brindle KM. Imaging cell death. *J Nucl Med* 2014;55:1-4
24. Seaman ME, Contino G, Bardeesy N, Kelly KA. Molecular imaging agents: impact on diagnosis and therapeutics in oncology. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e20
25. Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 2010;584:4491-9
26. Sun C, Wang L, Huang S, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 2014;508:118-22
27. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16

28. Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res* 2011;71:7137-40
29. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:122S-50S
30. White NS, McDonald C, Farid N, et al. Diffusion-weighted imaging in cancer: physical foundations and applications of restriction spectrum imaging. *Cancer Res* 2014;74:4638-52
31. Widakowich C, de Castro G, Jr., de Azambuja E, et al. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist* 2007;12:1443-55
32. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 2011;129:245-55
33. Winter KS, Hofmann FO, Thierfelder KM, et al. Towards volumetric thresholds in RECIST 1.1: Therapeutic response assessment in hepatic metastases. *Eur Radiol* 2018 [Epub ahead of print]
34. Wu Y, Huang S, Wang J, et al. Activatable probes for diagnosing and positioning liver injury and metastatic tumors by multispectral optoacoustic tomography. *Nat Commun* 2018;9:3983

## 5 Publikationsverzeichnis des kumulativen Habilitationsprojekts

Das Publikationsverzeichnis umfasst derzeit 21 Schriften, davon acht Originalarbeiten als Erstautor, neun Originalarbeiten als Koautor, zwei Case Reports, einen Übersichtsartikel sowie ein Buchkapitel, mit einem kumulierten IF von 67,736.

### Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor (kumulierter IF 29,288)

**Kazmierczak PM**, Burton NC, Keinrath G, Hirner-Eppeneder H, Schneider MJ, Eschbach RS, Heimer M, Solyanik O, Todica A, Reiser MF, Ricke J, Cyran CC. Integrin-targeted quantitative optoacoustic imaging with MRI correlation for monitoring a BRAF/MEK inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma. PLoS One 2018;13:e0204930 (IF 2,766)

Eschbach RS, **Kazmierczak PM**, Heimer MM, Todica A, Hirner-Eppeneder H, Schneider MJ, Keinrath G, Solyanik O, Olivier J, Kunz WG, Reiser MF, Bartenstein P, Ricke J, Cyran CC. <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT and diffusion-weighted MRI for monitoring a BRAF and CDK 4/6 inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma. Cancer Imaging 2018;18:2 (IF 3,016) (geteilte Erstautorenschaft)

**Kazmierczak PM**, Rominger A, Wenter V, Spitzweg C, Auernhammer C, Angele MK, Rist C, Cyran CC. The added value of <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE-PET to contrast-enhanced CT for primary site detection in CUP of neuroendocrine origin. Eur Radiol 2017;27:1676-1684 (IF 4,027)

**Kazmierczak PM**, Todica A, Gildehaus FJ, Hirner-Eppeneder H, Brendel M, Eschbach RS, Hellmann M, Nikolaou K, Reiser MF, Wester HJ, Kropf S, Rominger A, Cyran CC. <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer. PLoS One 2016;11:e0168248 (IF 2,806)

**Kazmierczak PM**, Schneider M, Habereeder T, Hirner-Eppeneder H, Eschbach RS, Moser M, Reiser MF, Lauber K, Nikolaou K, Cyran CC.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Targeted MRI for the Assessment of Early Antiangiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. Invest Radiol 2016;51:746-755 (IF 5,195)

**Kazmierczak PM**, Burian E, Eschbach R, Hirner-Eppeneder H, Moser M, Havla L, Eisenblätter M, Reiser MF, Nikolaou K, Cyran CC. Monitoring Cell Death in Regorafenib-Treated Experimental Colon Carcinomas Using Annexin-Based Optical Fluorescence Imaging Validated by Perfusion MRI. PLoS One 2015;10:e0138452 (IF 3,057)

**Kazmierczak PM**, Theisen D, Thierfelder KM, Sommer WH, Reiser MF, Notohamiprodjo M, Nikolaou K. Improved Detection of Hypervascular Liver Lesions With CAIPIRINHA-Dixon-TWIST-Volume-Interpolated Breath-Hold Examination. Invest Radiol 2015;50:153-160 (IF 4,887)

Cyran CC, **Kazmierczak PM**, Hirner H, Moser M, Ingrisich M, Havla L, Michels A, Eschbach R, Schwarz B, Reiser MF, Bruns CJ, Nikolaou K. Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation. PLoS One 2013;8:e76009 (geteilte Erstautorenschaft) (IF 3,534)

### Originalarbeiten als Koautor (kumulierter IF 33,272)

Kunz WG, Eschbach RS, Stahl R, **Kazmierczak PM**, Bartenstein P, Rominger A, Auernhammer CJ, Spitzweg C, Ricke J, Cyran CC. Identification and characterization of myocardial metastases in



neuroendocrine tumor patients using <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET-CT. *Cancer Imaging* 2018;18:34 (**IF 3,016**)

Froelich MF, Heinemann V, Sommer WH, Holch JW, Schoeppe F, Hesse N, Baumann AB, Kunz WG, Reiser MF, Ricke J, D'Anastasi M, Stintzing S, Modest DP, **Kazmierczak PM**, Hofmann FO. CT attenuation of liver metastases before targeted therapy is a prognostic factor of overall survival in colorectal cancer patients. Results from the randomised, open-label FIRE-3/AIO KRK 0306 trial. *Eur Radiol* 2018, Jun 7. [Epub ahead of print] (**IF 4,027**)

x

Kunz WG, Jungblut LM, **Kazmierczak PM**, Vettermann F, Bollenbacher A, Tonn JC, Schichor C, Rominger A, Albert NL, Bartenstein P, Reiser MF, Cyran CC. Improved Detection of Transosseous Meningiomas Using <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET-CT Compared to Contrast-Enhanced MRI. *J Nucl Med* 2017;58:1580-1587 (**IF 7,439**)

Eschbach RS, Clevert DA, Hirner-Eppeneder H, Ingrisich M, Moser M, Schuster J, Tadros D, Schneider M, **Kazmierczak PM**, Reiser M, Cyran CC. Contrast-Enhanced Ultrasound with VEGFR2-Targeted Microbubbles for Monitoring Regorafenib Therapy Effects in Experimental Colorectal Adenocarcinomas in Rats with DCE-MRI and Immunohistochemical Validation. *PLoS One* 2017;12:e0169323 (**IF 2,766**)

Notohamiprodjo S, Stahl R, Braunagel M, **Kazmierczak PM**, Thierfelder KM, Treitl KM, Wirth S, Notohamiprodjo M. Diagnostic accuracy of contemporary multidetector computed tomography (MDCT) for the detection of lumbar disc herniation. *Eur Radiol* 2016;27:3443-3451 (**IF 3,967**)

Guenther SP, Cyran CC, Rominger A, Saam T, **Kazmierczak PM**, Bagaev E, Pichlmaier M, Hagl C, Khaladj N. The relevance of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging in diagnosing prosthetic graft infections post cardiac and proximal thoracic aortic surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015;21:450-458 (**IF 1,329**)

Eschbach R, Fendler W, **Kazmierczak PM**, Hacker M, Rominger A, Carlsen J, Hirner H, Schuster J, Moser M, Havla L, Schneider MJ, Ingrisich M, Spaeth L, Reiser MF, Nikolaou K, Cyran CC. Correlation of perfusion MRI and <sup>18</sup>F-FDG PET imaging biomarkers for monitoring regorafenib therapy in experimental colon carcinomas with immunohistochemical validation. *PLoS One* 2015;10:e0115543 (**IF 3,057**)

Winter KS, Helck AD, Ingrisich M, Staehler M, Stief C, Sommer WH, Braunagel M, **Kazmierczak PM**, Reiser MF, Nikolaou K, Notohamiprodjo M. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging assessment of kidney function and renal masses: single slice versus whole organ/tumor. *Invest Radiol* 2014;49:720-727 (**IF 4,437**)

Thierfelder KM, Meimarakis G, Nikolaou K, Sommer WH, Schmitt P, **Kazmierczak PM**, Reiser MF, Theisen D. Non-contrast-enhanced MR angiography at 3 Tesla in patients with advanced peripheral arterial occlusive disease. *PLoS One* 2014;9:e91078 (**IF 3,234**)

### **Kasuistiken/Case Reports (kumulierter IF 4,751)**

Fabritius MP, **Kazmierczak PM**, Thierfelder KM, Kunz WG. Reversal of CT Hypodensity in Chronic Ischemic Stroke : A Different Kind of Fogging. *Clin Neuroradiol* 2017;27:383-384 (**IF 2,790**)

**Kazmierczak PM**, Strobl FF, Notohamiprodjo M. [The Hamatometacarpale-IV fracture-dislocation: a rare injury of amateur boxers]. *Rofo* 2013;185:175-176 (**IF 1,961**)

**Übersichtsartikel/Reviews (kumulierter IF 0,425)**

**Kazmierczak PM**, Nikolaou K, Rominger A, Graser A, Reiser MF, Cyran CC. [Radiological diagnostics in CUP syndrome]. *Radiologe* 2014;54:117-123 (**IF 0,425**)

**Buchkapitel/Book Chapters**

**Kazmierczak PM**, Rominger A, Cyran CC. The Radiologist's Approach to CUP. In: Krämer A, Löffler H (Hrsg.). *Cancer of Unknown Primary*, S. 75-90. Springer 2016