

---

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. J. Ricke

*<sup>18</sup>F-FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT zum Monitoring einer BRAF- und  
CDK4/6-Inhibitor Kombinationstherapie im murinen Modell eines humanen Melanoms*

**Dissertation**  
**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**  
**an der Medizinischen Fakultät der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von  
Maurice Maximilian Heimer

aus  
Düsseldorf

2020

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Ewers

PD Dr. med. Dr. rer. nat. Christian Thieke

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ralf Eschbach

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung 13.02.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>VI</u></b>
---	------------------

<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>VII</u></b>
--	-------------------

<b><u>1 EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
----------------------------------	-----------------

<b>1.1 IMAGING BIOMARKER IN DER ONKOLOGIE .....</b>	<b>1</b>
---	----------

1.1.1 BIOMARKER UND SURROGAT-ENDPUNKTE .....	1
--	---

1.1.2 BILDGEBUNG IN DER ONKOLOGIE .....	2
---	---

1.1.3 IMAGING BIOMARKER.....	2
------------------------------	---

1.1.4 ANSÄTZE ZUR BEURTEILUNG DES THERAPIEANSPRECHENS .....	3
---	---

<b>1.2 DAS MALIGNEN MELANOM .....</b>	<b>5</b>
---------------------------------------	----------

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE DES MALIGNEN MELANOMS .....	5
---	---

1.2.2 ÄTIOLOGIE DES MALIGNEN MELANOMS .....	6
---	---

1.2.3 TUMORBIOLOGIE UND GENETIK DES MALIGNEN MELANOMS .....	7
---	---

1.2.4 PATHOLOGIE UND STAGING DES MALIGNEN MELANOMS .....	8
--	---

1.2.5 DIAGNOSTIK DES MALIGNEN MELANOMS .....	11
--	----

1.2.6 PROGNOSE DES MALIGNEN MELANOMS .....	12
--	----

1.2.7 THERAPIE DES MALIGNEN MELANOMS.....	13
---	----

1.2.8 NACHSORGE DES MALIGNEN MELANOMS.....	14
--	----

<b>1.3 ZIELGERICHTETE KREBSTHERAPIE.....</b>	<b>15</b>
--	-----------

1.3.1 ÜBER PAUL EHRlich ZUR PERSONALISIERTEN MEDIZIN .....	15
--	----

1.3.2 INHIBITION DER SIGNALTRANSDUKTION .....	16
---	----

1.3.3 ZELLZYKLUS-INHIBITION .....	16
-----------------------------------	----

<b>1.4 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG.....</b>	<b>18</b>
---	-----------

<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u></b>	<b><u>19</u></b>
--	------------------

<b>2.1 ZELLEN.....</b>	<b>19</b>
------------------------	-----------

<b>2.2 TIERMODELL .....</b>	<b>21</b>
-----------------------------	-----------

2.2.1 VORAUSSETZUNGEN .....	21
-----------------------------	----

2.2.2 TUMORINOKULATION UND -WACHSTUM .....	21
--	----

2.2.3 INTERVENTIONSPHASE.....	22
-------------------------------	----

2.2.4 THERAPIEPROTOKOLL.....	22
------------------------------	----

<b>2.3 MULTIMODALE BILDGEBUNG .....</b>	<b>23</b>
---	-----------

2.3.1 VERSUCHSDESIGN.....	23
---------------------------	----

2.3.2 <sup>18</sup> F-FDG-PET/CT.....	23
---------------------------------------	----

2.3.3	MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE.....	27
<b>2.4</b>	<b>HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....</b>	<b>29</b>
2.4.1	PLASTINATION DER PROBEN IN PARAFFIN.....	29
2.4.2	ANFERTIGUNG VON SCHNITTPRÄPARATEN .....	29
2.4.3	HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG .....	29
2.4.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG PROLIFERIERENDER ZELLEN (KI-67).....	30
2.4.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DER GEFÄßDICHTEN (CD31) .....	30
<b>2.5</b>	<b>STATISTIK .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>3.1</b>	<b><sup>18</sup>F-FDG-PET/CT.....</b>	<b>33</b>
3.1.1	TUMOR-TO-LIVER-RATIO .....	33
3.1.2	METABOLISCHES TUMORVOLUMEN .....	35
<b>3.2</b>	<b>MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	APPARENT DIFFUSION COEFFICIENT (ADC) .....	36
3.2.2	MORPHOLOGISCHES TUMORVOLUMEN .....	37
<b>3.3</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMIE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>KORRELATION DER STUDIENERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
3.4.1	VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE DER PET/CT MIT DER IMMUNHISTOCHEMIE.....	41
3.4.2	VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE AUS DER MRT MIT DER IMMUNHISTOCHEMIE .....	41
3.4.3	KORRELATION DER ERGEBNISSE AUS DER PET/CT UND DER MRT .....	41
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b>4.1</b>	<b>BRAF UND CDK4/6-INHIBITOR KOMBINATIONSTHERAPIE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>BEURTEILUNG DES THERAPIEANSPRECHENS IM MALIGNEN MELANOM .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	MOLEKULARE PET/CT BILDGEBUNG.....	45
4.2.2	DIFFUSIONSGEWICHTETE MRT .....	46
4.2.3	MORPHOLOGISCH-RADIOLOGISCHE BIOMARKER.....	47
<b>4.3</b>	<b>LIMITATIONEN DES STUDIENDESIGNS .....</b>	<b>48</b>
4.3.1	QUALIFIZIERUNG DER BIOMARKER DURCH IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN .....	48
4.3.2	STANDARDISIERUNG DER VERSUCHE UND SEGMENTIERUNG DER TUMOREN .....	49
4.3.3	MORPHOLOGISCHE VOLUMETRIE DES TUMORS .....	50
4.3.4	BEURTEILUNG DER MOLEKULAREN INHIBITOR-KOMBINATIONSTHERAPIE .....	50
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>51</u></b>

<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>PRIMÄRDATEN</b> .....	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>56</b>
<b>6.3</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>64</b>
<b>6.4</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>65</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des malignen Melanoms.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.....	23
Abbildung 3: Lagerung der Versuchstiere im Acryl-Messkörper.....	26
Abbildung 4: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung der TTL-R-Auswertung.....	34
Abbildung 5: Axiale CT- und PET/CT-Bilder repräsentativer Tumor-Querschnitte.....	34
Abbildung 6: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung der MTV-Auswertung.....	35
Abbildung 7: Box-Whiskers-Plot zur graphischen Darstellung der ADC-Auswertung.....	36
Abbildung 8: Axiale MRT Querschnitte repräsentativer Tumor-Läsionen im Vergleich.....	37
Abbildung 9: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung des Tumolvolumens.....	38
Abbildung 10: Box-Whiskers-Plots zur Immunhistochemie-Auswertung.....	39
Abbildung 11: Repräsentative Gewebeschnitte nach Immunhistochemie und Gegenfärbung ...	40

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: 8. Edition der UICC TNM-Klassifikation des malignen Melanoms.....	10
Tabelle 2: 8. Edition der AJCC Pathologie-Klassifikation des malignen Melanoms.....	11
Tabelle 3: Individuelle Ergebnisse der MRT-Auswertung.....	53
Tabelle 4: Individuelle Ergebnisse der <sup>18</sup> F-FDG-PET/CT-Auswertung.....	54
Tabelle 5: Individuelle Ergebnisse der Immunhistochemie.....	55

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADC</b>	- Apparent Diffusion Coefficient
<b>AJCC</b>	- American Joint Cancer Committee
<b>BRAF</b>	- B-type rapidly accelerated Fibrosarcoma
<b>CDK</b>	- Cyclin-dependent Kinase
<b>CD31</b>	- Cluster of Differentiation 31
<b>CT</b>	- Computertomographie
<b>DWI</b>	- Diffusion-weighted Imaging
<b>FDA</b>	- Food and Drug Administration
<b>iRECIST</b>	- Immuntherapie Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
<b>MAPK</b>	- Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
<b>MRT</b>	- Magnetresonanztomographie
<b>MTV</b>	- Metabolisches Tumolvolumen
<b>PERCIST</b>	- PET Response Criteria in Solid Tumors
<b>PET</b>	- Positronen-Emissions-Tomographie
<b>RECIST</b>	- Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
<b>RKI</b>	- Robert Koch-Institut
<b>SUV</b>	- Standardized Uptake Value
<b>TNM</b>	- Tumor-Node-Metastasis (Klassifikation)
<b>TTL-R</b>	- Tumor-to-Liver-Ratio
<b>UICC</b>	- Union internationale contre le cancer
<b>VOI</b>	- Volume of Interest
<b>WHO</b>	- World Health Organization
<b><sup>18</sup>F-FDG</b>	- 2[F-18]-2-Fluor-2-deoxy-D-glukose

# 1 Einleitung

## 1.1 *Imaging Biomarker in der Onkologie*

### 1.1.1 Biomarker und Surrogat-Endpunkte

Die amerikanische *NIH Biomarker Working Group* definiert Biomarker als objektivierbare Indikatoren biologischer Prozesse und potentielle intermediäre Surrogat Endpunkte. Dabei werden diagnostische, prädiktive und prognostische Qualitäten unterschieden [1]. Im Rahmen einer sukzessiven Validierung müssen Biomarker erhebliche translationale Hürden überwinden [2]. Obwohl in der Literatur eine Vielzahl an Biomarkern beschrieben und auch in der Forschung gebräuchlich sind, haben davon weniger als 0,1 % eine Translation in den klinischen Alltag erfahren [3]. Ein Grund, warum die Translation vieler prädiktiver Biomarker scheitert, liegt in der fehlenden Korrelation und Qualifizierung durch patientenrelevante Endpunkte, wie dem Überleben oder der Lebensqualität. In der Regel werden sie aus Zeit- und Kostenaspekten nur mit bestehenden Surrogat-Endpunkten korreliert [4]. Die Validierung erfordert neben der inhaltlichen Qualifizierung auch eine technische Validierung, so muss die Messung des Biomarkers verlässlich reproduzierbar sein. Eine praktische Realisierung von Biomarkern muss ebenso wirtschaftlichen, regulatorischen und rechtlichen Rahmenbedingungen genügen [2, 4].

In der Durchführung von Phase-I/II-Studien helfen prädiktive Surrogate vielversprechende Medikamente frühzeitig für Folgestudien zu identifizieren. In Phase-III-Studien beschleunigen sie die Stratifizierung relevanter Patientengruppen und qualifizieren Studiendaten für eine Zulassung von Medikamenten. Im klinischen Kontext dienen Biomarker als valide Surrogate patientenrelevanter Endpunkte und leiten therapeutische Entscheidungen an. Beispielsweise werden Non-Responder durch ein Therapie Monitoring frühzeitig identifiziert, sodass die Therapie geändert und angepasst werden kann. Dies wiederum reduziert Nebenwirkungen von Medikamenten und reduziert Kosten [5]. Trotz der Qualitätsansprüche an die Validierung von Biomarkern haben Kim et al. gezeigt, dass durch 86 % der in 2008 bis 2012 durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen onkologischen Arzneimittel, die allein durch Surrogat-Endpunkte validiert wurden, kein patientenrelevanter Zusatznutzen erreicht wurde [6]. So lässt sich eine kontextgerechte Interpretation von Biomarkern nur durch systematische Entwicklung und kritische Anwendung realisieren [7].

### **1.1.2 Bildgebung in der Onkologie**

Bildgebende Verfahren nehmen in der Diagnostik der modernen Onkologie eine zentrale Rolle in der Therapiesteuerung ein. Durch die Evolution multiparametrischer Bildgebung ergeben sich in der Radiologie und Nuklearmedizin neue diagnostische Möglichkeiten. Neben der Visualisierung anatomischer Charakteristika werden molekulare und funktionelle Parameter inzwischen routinemäßig erfasst. Um das Potential dieser Parameter als Imaging Biomarker einzuschätzen, ist es erforderlich ihren Nutzen und Limitationen in Validierungsstudien zu untersuchen. Kaum eine andere medizinische Disziplin entwickelt sich auf dem therapeutischen Sektor so dynamisch wie die Onkologie. Während bildgebende Verfahren in Initial- und Ausbreitungsdiagnostik etabliert sind, muss weitere Evidenz zum Therapie Monitoring generiert werden [8, 9]. Morphologische Ansätze der diagnostischen Radiologie allein werden der tumorbiologischen Komplexität nicht gerecht. Eine multimodale bildgebende Phänotypisierung könnte die Diagnostik präzisieren und das Verständnis der individuellen Krankheitsprogression verbessern [8]. Methoden um das Therapieansprechen solider Tumoren zu objektivieren, wurden initial durch die WHO und später durch die *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) Arbeitsgruppe erarbeitet [10, 11]. Durch den Einsatz neuer, spezifischer Biomarker könnte die präklinische und klinische Stratifizierung zytostatischer Krebstherapeutika verbessert werden [12].

### **1.1.3 Imaging Biomarker**

*Imaging Biomarker* beschreiben quantitative Tumorcharakteristika, die mit bildgebenden Verfahren nicht-invasiv generiert werden können. Durch Einsatz eines Kontrastmittels oder Tracers wird ein *Molecular Probe Imaging* möglich. Beispiele von Imaging Biomarkern in der Onkologie umfassen das klinische TNM-Staging durch radiologische und nuklearmedizinische Verfahren, den Ausschluss medikamentös-kardiotoxischer Nebenwirkungen durch die Echokardiographie oder die Beurteilung des Therapieansprechens. Durch die technische Weiterentwicklung innovativer multiparametrischer Bildgebung ergeben sich neue potentielle radiologische Biomarker in der Onkologie, die eine nicht-invasive Charakterisierung der Tumorpathophysiologie in vivo erlauben [2]. Dies ermöglicht eine Phänotypisierung an der Schnittstelle morphologischer, funktioneller und molekularer Tumorcharakteristika, sodass besonders die Kombination und Fusion verschiedener bildgebenden Modalitäten von Interesse ist. Die Archivierung standardisierter, sequentieller Untersuchungen ermöglicht eine longitudinale Verlaufskontrolle und ist Grundlage für Monitoring und Rezidivdiagnostik. Ebenso werden inzidentelle Nebenbefunde erhoben, die der frühen Diagnose unabhängiger

Pathologien dienen können [13]. Darüber hinaus gewinnt auch das Feld der automatisierten Bildanalyse unter Verwendung von *Machine-* und *Deep-Learning*-Techniken zunehmend an Bedeutung. Radiologische Datensätze über die Bildrekonstruktion hinaus zu analysieren, ist neben ersten klinischen Ansätzen ein primär experimentelles Feld und wird im Begriff *Radiomics* zusammengeführt [14].

Im Jahr 1979 wurde mit den WHO-Kriterien erstmalig ein Konzept zur Beurteilung der Tumorlast eingeführt. Durch die Betrachtung der verlaufsbedingten Größen-Dynamik konnte die Beurteilung des Therapieansprechens solider Tumoren standardisiert werden. Eine relevante Größenzunahme des Tumors wurde dabei als Ausdruck des Nichtansprechens auf die angewandte Therapie verstanden. In den darauffolgenden Jahren wurden die Kriterien durch verschiedenste Arbeitsgruppen modifiziert. Weitere bildmorphologische Kriterien zur standardisierten Dokumentation des Therapieansprechens wurden im Jahr 2000 in Form der RECIST Kriterien publiziert und im Jahr 2009 als RECIST 1.1 aktualisiert [11]. Da bisher keine flächendeckende, technische Standardisierung der Untersuchung möglich war, beschränken sich die Kriterien weiterhin auf eine primär morphologische, eindimensionale Vermessung relevanter Läsionen [11, 15]. Gemäß den RECIST 1.1 Kriterien werden bis zu fünf repräsentative, reproduzierbar messbare Läsionen, je Organ maximal zwei, als Zielläsionen (*target lesions*) definiert und verlaufskontrolliert. Läsionen werden in ihrem längsten Durchmesser vermessen. Einzige Ausnahme bilden pathologisch vergrößerte Lymphknoten, die in ihrer kurzen Achse beurteilt werden. Weitere Läsionen werden als Nicht-Zielläsionen (*non-target lesions*) definiert und rein qualitativ verlaufskontrolliert. Anhand festgelegter Algorithmen erfolgt eine situationsgerechte Graduierung des Verlaufs in komplette Remission (*complete remission*), partielle Remission (*partial remission*), stabile Erkrankung (*stable disease*) und Progression (*progressive disease*) [11]. Grundlage der Messung sind in der Regel axiale Schichtrekonstruktionen der Computertomographie (CT). Parameter der Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie (PET/CT) werden nur als Zusatzinformation berücksichtigt [11, 16].

#### **1.1.4 Ansätze zur Beurteilung des Therapieansprechens**

Die RECIST Kriterien wurden durch Studien zu konventionellen zytotoxischen Medikamenten erarbeitet und validiert [15]. Das initiale Therapieansprechen auf neuere molekulare Medikamente äußert sich im Gegensatz dazu aber häufig nicht durch eine primäre Veränderung der Tumorgröße [9]. Ein Beispiel hierfür ist die Pseudoprogession des malignen Melanoms

unter Immuntherapie. Dieses Phänomen beschreibt eine initiale Größenprogression des Tumors, trotz molekularem Therapieansprechen [17]. Hier sind morphologische Kriterien, vor allem im initialen Verlauf, nicht immer anwendbar [18]. Bereits die Methodik zur Quantifizierung der Tumorlast ist umstritten, da eindimensionale Längenbestimmungen das Volumen nur mit sehr eingeschränkter Sensitivität erfassen [19]. Auch die Ordinalisierung metrisch-skaliertter Tumorgrößen als Maß für das Therapieansprechen wird kritisch diskutiert [20]. Daher existieren viele Versuche die RECIST 1.1 Kriterien kontextgerecht zu modifizieren und durch weitere morphologische, funktionelle und molekulare Parameter zu ergänzen. Beispiele dafür sind die Choi-Kriterien, die die CT-morphologische Dichte von Gewebe berücksichtigen, die *Immuntherapie Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (iRECIST), die vor allem die Dynamik des Tumolvolumens gegenüber einem Nadir in den Vordergrund stellen oder auch metabolische Verfahren, wie die *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) Kriterien, beziehungsweise die *PET Response Criteria in Solid Tumors* (PERCIST) [17, 20].

## ***1.2 Das maligne Melanom***

### **1.2.1 Epidemiologie des malignen Melanoms**

Hautkrebs stellt die häufigste maligne Tumorerkrankung weltweit dar [21]. Dieser Sammelbegriff umfasst eine heterogene Gruppe maligner und semi-maligner Tumoren der Haut: das Plattenepithelkarzinom, das Basalzellkarzinom, das Merkel-Zell-Karzinom, das kutane Lymphom, das Kaposi-Sarkom sowie das kutane maligne Melanom. Obwohl das maligne Melanom nach Schätzungen lediglich 10 % und dessen invasive Form nur 1 % der Hautkrebserkrankungen ausmacht, ist es aufgrund seines aggressiven Wachstums und seiner Metastasierungsneigung für 90 % der durch Hauttumoren verursachten Todesfälle verantwortlich [22-24].

Während das maligne Melanom vor wenigen Jahrzehnten noch als Rarität galt, ist die Inzidenz bei der hellhäutigen Bevölkerung deutlich angestiegen. In Deutschland haben sich die altersstandardisierten Erkrankungsraten für Männer und Frauen zwischen 1970 und 2014 versiebenfacht [23]. Für kein anderes Malignom sind derartige epidemiologische Veränderungen beschrieben. Im Juni 2008 wurde ein nationales Hautkrebs-Screening eingeführt, das noch im selben Jahr zu einem signifikanten Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms geführt hat [25]. Ein weiterer sprunghafter Anstieg seit Einführung des Screenings könnte mit dem veränderten Freizeitverhalten der deutschen Bevölkerung zu erklären sein. Im gleichen Zeitraum blieben die Sterberaten unverändert, auch wenn sich altersspezifische Unterschiede aufzeigen lassen (siehe Abbildung 1) [25]. Die vom Robert Koch-Institut prognostizierte standardisierte Melanom-Inzidenz beträgt in 2018 19,4 bzw. 18,6 pro 100.000 Männer bzw. Frauen. Im globalen Vergleich zeigen sich relevante Unterschiede in der Melanom-spezifischen Epidemiologie. Die höchste Inzidenz wird in Australien und Neuseeland beschrieben, die Geringste in Ländern Afrikas.

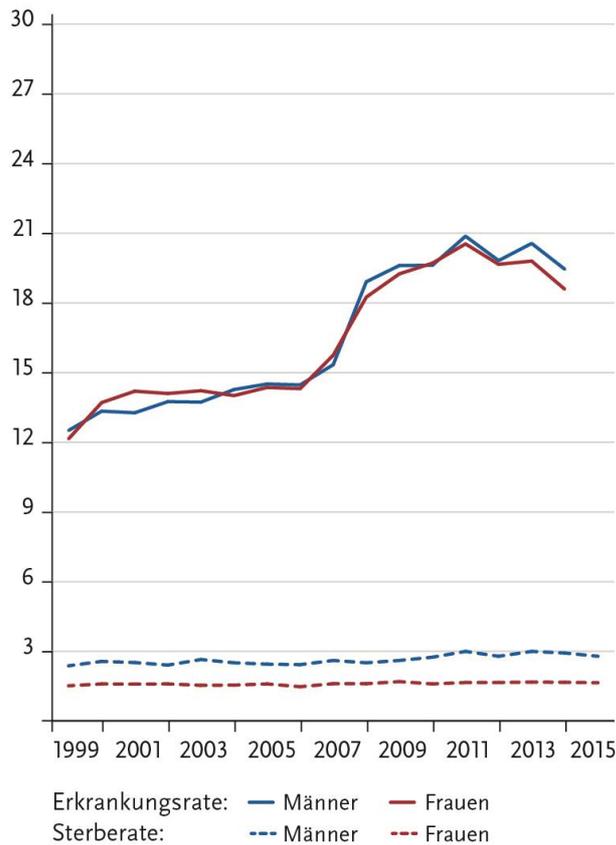


Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des malignen Melanoms

Die Darstellung erfolgt nach Geschlecht und pro 100.000 Einwohner in Deutschland (mit freundlicher Genehmigung des RKI) [25].

Bei Patienten unter 30 Jahren ist das maligne Melanom das am zweithäufigsten diagnostizierte Malignom. Da sich Todesfälle vergleichsweise häufig auf Patienten im mittleren Lebensalter konzentrieren, leiten sich besondere gesundheitsökonomische Konsequenzen ab. Hanly et al. haben die sozioökonomischen Kosten für einen Melanom-bedingten Todesfall in Europa auf 312.798 € geschätzt. Kein anderes Malignom verursacht pro Todesfall vergleichbare gesellschaftliche Kosten [26].

### 1.2.2 Ätiologie des malignen Melanoms

Neben der umweltbedingten UV-Exposition wurden zunehmend weitere Risikofaktoren und -indikatoren für das maligne Melanom beschrieben. Besonders hervorzuheben sind das körpereigene Pigmentsystem, ein heller Hauttyp, eine genetische Prädisposition und virale Infektionen [27, 28].

Im Gegensatz zu anderen nicht-melanotischen, kutanen Karzinomen ist der kausale Zusammenhang zwischen natürlicher UVA-Exposition und Entstehung eines Melanoms noch nicht abschließend geklärt. Vor allem wegen des Verteilungsmusters, der Latenz zwischen Exposition und Manifestation und einer Häufung in der urbanen Bevölkerung wird die Assoziation kritisch diskutiert [29, 30]. Gandini et al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass eine intermittierende Sonnenlicht-Exposition mit Ausbildung von Sonnenbränden einen wichtigen Risikofaktor darstellt, chronische Exposition aber protektiv wirkt [28]. Daraus könnte sich die geringere Inzidenz in ländlichen Bevölkerungsteilen ableiten. In Anlehnung daran diskutieren Merrill et al. den reduzierten, kutanen Vitamin D3-Spiegel als Korrelat der zivilisatorisch verminderten Sonnenexposition und in einem nächsten Schritt als Mediatorvariable für die Entstehung des malignen Melanoms [31].

Mit Beschreibung des B-K-Naevussyndroms, dem hereditären dysplastischen Naevuszellnaevus-Syndrom 1978 durch Clark et al. wurde das körpereigene Pigmentsystem als möglicher, eigenständiger Risikofaktor und -indikator für das maligne Melanom diskutiert. Es hat sich gezeigt, dass neben der Zahl der Naevi besonders die individuelle Morphologie des Hauttumors von prognostischer Bedeutung ist [32]. Dies gilt speziell für atypische, aber auch für gewöhnliche melanozytäre Naevi. Derzeit wird angenommen, dass der einzelne Pigmentnaevus eine fakultative Präkanzerose des malignen Melanoms darstellt. Das individuelle Entartungsrisiko wird hingegen als sehr gering eingeschätzt [33].

### **1.2.3 Tumorbiologie und Genetik des malignen Melanoms**

Das maligne Melanom weist eine komplexe und heterogene Ätiopathogenese auf. Neben umweltbedingten Mechanismen kommt auch der Genetik eine tragende Rolle zu. Eine familiäre Häufung ist bei 5-12 % aller Melanome beschrieben [34]. Seit der Erstbeschreibung des Suszeptibilitätsgens CDKN2A vor mehr als 20 Jahren wurde eine Reihe weiterer relevanter Gene beschrieben: darunter die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 4, BRCA1, BAP1, CXC-Gene, TERT, POT1, ACD, TERF2IP, MC1R und MITF [35].

#### ***1.2.3.1 Die Melanomentwicklung und –progression***

Die Melanomentwicklung steht häufig im direkten Zusammenhang mit der Mutation relevanter Signaltransduktionswege. Dabei lassen sich prinzipiell einige wenige Treibermutationen und hunderte sogenannter Begleitmutationen unterscheiden, die die physiologische

Signaltransduktion der Melanozyten grundlegend verändern [36]. Durch das Krebsgenom-Atlas-Projekt konnten in 90 % der kutanen Melanome Mutationen von Onkogenen des mitogen-aktivierenden-Proteinkinase- (MAPK-) Signalweges nachgewiesen werden, unter anderem auch in PI3K-AKT (AKT)-, c-KIT und  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionswegen [37]. Etwa 50 % der malignen Melanome weisen charakteristische Mutationen im B-type rapidly accelerated Fibrosarcoma- (BRAF-) Gen auf. In 80 - 90 % dieser Fälle liegt eine V600E- und in 10 - 20 % eine V600K-Punktmutation vor. Diese Mutationsformen führen durch Überaktivierung des MAPK-Signalweges zu einer überschießenden Proliferation der Melanomzellen. Andere V600-Mutationsformen sind äußerst selten [38].

Letztlich sind die Heterogenität und klonale Divergenz der Tumorzellpopulation des Melanoms das genetische Substrat der tumorbiologischen Komplexität. Dies wirkt sich entscheidend auf mögliche Therapieansätze, aber auch auf die Entwicklung primärer und sekundärer Resistenzen aus, die Gegenstand aktueller Forschung sind [39].

### ***1.2.3.2 Resistenzmechanismen im malignen Melanom***

Es existiert eine Vielzahl an Resistenzmechanismen gegenüber iatrogenen MAPK-Inhibition, die in primäre, sekundäre oder adaptive Formen unterteilt werden können. In Realität können diese Formen aber nur selten voneinander abgegrenzt werden, da maligne Tumoren aus heterogenen Zellpopulationen bestehen [40, 41]. Während MAPK-Inhibitoren bei einer primären Resistenz bereits initial keine Wirkung entfalten können, entwickeln sich sekundäre und adaptive Formen der Resistenz im Therapieverlauf. In letzter Konsequenz führen die Resistenzmechanismen zu einer intrazellulären Reaktivierung des MAPK-Signalweges, sodass mutierte Zellen trotz molekularer MAPK-Inhibition einen Proliferationsreiz erhalten. Einer der sekundären Resistenzmechanismen kommt bei der Mutation des CDKN2A-Gens zum Tragen. Hierbei kommt es nach Ausfall eines natürlichen CDK-Inhibitors zu einer Überexpression des CDK4/6-Komplexes, der wiederum den Zell-Zyklus initiiert [40, 41]. *Patient-derived tumor xenografts* stellen einen möglichen experimentellen Ansatz zur Untersuchung der individuellen Melanom-Progression und Resistenzausbildung dar.

### **1.2.4 Pathologie und Staging des malignen Melanoms**

Das Melanom geht aus entarteten pigmentbildenden Melanozyten hervor und entsteht in etwa 90 % der Fälle im Bereich der kutanen dermo-epidermalen Junktionszone. Neben der kutanen Manifestation kann es in seltenen Fällen zur primären Entartung melanozytärer Zellen in der

Choroidea, im Respirationstrakt, im Gastrointestinaltrakt, im Urogenitaltrakt oder an den Meningen kommen [42].

Clark et al. haben nach klinisch-histologischen Gesichtspunkten zunächst drei Melanom-Typen definiert, die bis heute Eingang in die WHO-Klassifikation finden; das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom und das Lentigo-maligna Melanom [43]. Das akral-lentiginöse Melanom wurde 1976 durch Reed et al. als vierte übergeordnete Entität beschrieben [22]. Daneben existieren noch weitere, deutlich seltenere Varianten. Dermale Tumorzellen weisen häufig eine fehlende Reifung auf und formen kohäsive Nester und Bündel. Durch pagetoide Durchwanderung finden sich einzelne Melanozyten in unregelmäßigen Abständen oder Melanozytennester über alle Epidermislagen verteilt. Definitionsgemäß stellt das Überschreiten der epidermalen Basalmembran durch maligne Zellen in die Dermis die Progression eines in-situ lokalisierten Tumors in ein metastasierungsfähiges invasives Melanom dar [44]. Eine Ulzeration wird durch das Fehlen intakter Epidermis über dem Primärtumor und eine Host-Reaktion gekennzeichnet [45]. Pathologisch lassen sich dabei aber in nur 20 - 30 % der Fälle naevale Vorläuferläsionen nachvollziehen [46]. Im Falle einer Primärmetastasierung ist diese zunächst in mehr als 60 % der Fälle auf das loko-regionäre Lymphabflussgebiet limitiert. Dabei bilden sich Satelliten-, In-transit- und lokale Lymphknotenmetastasen über lymphatische oder möglicherweise auch angiotrophe Wege aus [44]. Fernmetastasen manifestieren sich bevorzugt in Lunge, Leber, ZNS, Haut sowie Skelett und können bei Initialbefund synchron vorliegen oder sich im Verlauf metachron entwickeln. Die Fernmetastasierung trägt dabei entscheidend zur Letalität des Melanoms bei. Bei ungefähr 10 - 20 % der Melanome kommt es durch Aktivierung des Immunsystems zu einer spontanen, endogenen Remission [47].

Die Konsultationskonferenz der aktuellen S3-Leitlinie basiert auf der 7. Edition der *American Joint Cancer Committee-* (AJCC) und TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Dabei wird die initiale klinische Einteilung durch die pathologische Befundung der loko-regionären Lymphknoten zu einer ganzheitlichen Klassifikation ergänzt [23]. Die 8. Edition der AJCC-Klassifikation basiert auf der Auswertung von Daten von mehr als 46.000 Patienten. Sie wurde bereits Ende 2016 veröffentlicht und findet seit Anfang 2018 Anwendung. Die S3-Leitlinie empfiehlt diese als Grundlage für Diagnostik und Therapie zu verwenden. Inhaltliche Veränderungen betreffen die Tumorstadien I-III, nicht das Stadium IV [45]. Vor allem die Modifikationen der Definition des Stadiums III stellt eine erhebliche Verkomplizierung dar [48]. Entsprechende Klassifikationen sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

### Primärtumor

Klassifikation	Dicke (mm)	Ulzeration
Tx	nicht beurteilbar	
T0	Kein Tumornachweis	
Tis	Tumor in situ	
T1 a	≤ 1.0	< 0.8 mm ohne Ulzeration
T1 b		0.8-1.0 mm ohne Ulzeration oder ≤ 1.0 mm mit Ulzeration
T2 a	> 1.0-2.0	ohne Ulzeration
T2 b		mit Ulzeration
T3 a	> 2.0-4.0	ohne Ulzeration
T3 b		mit Ulzeration
T4 a	> 4.0	ohne Ulzeration
T4 b		mit Ulzeration

### Regionale Lymphknoten

Klassifikation	Knoten	Nodale Masse
Nx	nicht beurteilbar	
N0	keine	
N1 a	0-1	klinisch okkult
N1 b		klinisch detektierbar
N1 c		in transit- / Satelliten- Metastasen, keine Lymphknoten
N2 a	2-3	klinisch okkult
N2 b		klinisch detektierbar
N2 c		in transit- / Satelliten- Metastasen, 1 Lymphknoten
N3	> 3	klinisch okkult
		klinisch detektierbar
		in transit- / Satelliten- Metastasen, ≥ 2 Lymphknoten

### Fernmetastasen

Klassifikation	Ort der Metastasen
M0	keine
M1* a	Kutis, Subkutis, ferne Lymphknoten
M1* b	Lunge
M1* c	Befall anderer Organe
M1* d	Hirnmetastasen

\* Bestimmung des Serum LDH: 0 = negativ, 1 = positiv

Tabelle 1: 8. Edition der UICC TNM-Klassifikation des malignen Melanoms

Diese Klassifikation beinhaltet die Beurteilung des Primärtumors (T), der loko-regionären Lymphabflusswege (N) und einer Metastasierung (M) (modifiziert nach Gershenwald et al. [45]).

AJCC-Stadium	Definition	TNM-System		
0	Melanoma in situ	Tis	N0	M0
IA	lokaler Primärtumor	T1a	N0	M0
IB		T1b	N0	M0
		T2a	N0	M0
IIA		T2b	N0	M0
		T3a	N0	M0
IIB		T3b	N0	M0
		T4a	N0	M0
IIC		T4b	N0	M0
IIIA	lokoregionäre Metastasierung	T1-2a	N1a	M0
		T1-T2a	N2a	M0
IIIB		T0	N1b-c	M0
		T1-2a	N1b-c	M0
		T1-2a	N2b	M0
		T2b-3a	N1a-2b	M0
IIIC		T0	N2b-c	M0
		T0	N3b-c	M0
		T1a-3a	N2c-3c	M0
		T3b-4a	alle	M0
	T4b	N1a-2c	M0	
IIID		T4b	N3a-c	M0
IV	Fernmetastasierung	alle	alle	M1

Tabelle 2: 8. Edition der AJCC Pathologie-Klassifikation des malignen Melanoms

Diese Klassifikation kategorisiert entsprechend der TNM-Klassifikation 4 Stadien (modifiziert nach Gershenwald et al. [45]).

### 1.2.5 Diagnostik des malignen Melanoms

Der Initialverdacht auf das Vorliegen eines Melanoms kann durch den Patienten selber, während eines Screenings oder durch Komplikationen in einem fortgeschrittenen Stadium begründet werden. Die Inspektion von Integument und Schleimhaut mit dem Auflichtdermatoskop sowie die Palpation der Lymphabstromgebiete stehen bei der klinischen Untersuchung im Vordergrund. Für die makroskopische Untersuchung des Primärtumors eignet sich das ABCD-Schema zur ambulanten Beurteilung: A = Asymmetrie, B = Begrenzung, C = Colorit, D = Durchmesser [49]. Bei malignitätssuspektem Befund erfolgt die Primärexzision des Tumors mit geringem Sicherheitsabstand bis auf die Subkutis. Bei ungünstiger Tumorlage, beispielsweise im Gesicht, kann eine Probebiopsie erfolgen. Selten kommt es zur klinischen Manifestation melanotischer Metastasen bei okkultem Primarius [23].

Für das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen hat die pathologische Beurteilung der Dicke des Primarius maßgebliche Bedeutung. Die aktuelle S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms bietet hierzu einen Leitfaden. Die Indikation für die lokale und systemische Ausbreitungsdiagnostik ist dadurch nachvollziehbar definiert. Bei Verdacht auf lokoregionäre Metastasierung werden die Bestimmung des Tumormarkers S100B sowie eine Lymphknoten-Sonographie empfohlen. Eine Sentinel-Lymphknoten-Dissektion soll die Lokaldiagnostik bei fehlendem Hinweis auf eine Metastasierung ab einem T2-Stadium ergänzen. Die primär diagnostische Entfernung klinisch okkulten Lymphknotenmetastasen hat für die betroffenen Patienten aber auch klinisch relevanten Nutzen [50]. Da eine Fernmetastasierung in frühen AJCC-Stadien selten ist und der Mehrwert der Ferndiagnostik nicht in Relation zu Aufwand und Kosten steht, kann für Patienten bis einschließlich Stadium IIC eine Ganzkörper-Bildgebung nicht empfohlen werden [51]. Erst ab Stadium III soll eine radiologische Schnittbilddiagnostik in der Ausbreitungsdiagnostik routinemäßig eingesetzt werden. Während Hirnmetastasen durch die Magnetresonanztomographie (MRT) mit größter Genauigkeit diagnostiziert werden können, gilt die PET/CT mit einer Sensitivität von 80 % und Spezifität von 87 % als Verfahren mit der höchsten diagnostischen Genauigkeit zur Detektion extrazerebraler Metastasen. Das konventionelle CT weist im Vergleich eine Sensitivität von 51 % und Spezifität von 69 % auf [52].

Eine molekularpathologische Diagnostik sollte ab dem Stadium IIIB an Biopsien aktueller Metastasen durchgeführt werden. BRAF ist mit 50 % das am häufigsten mutierte Onkogen. Klinische Relevanz haben auch NRAS- (15 %) und c-KIT- (in Subgruppen bis zu 5 %) Mutationen, da sich auch hier molekular-therapeutische Ansatzpunkte ergeben. Erst im Stadium IV findet Laktatdehydrogenase (LDH), ein Serum-Marker, als prognostisch relevanter Biomarker Eingang in die Klassifikation des malignen Melanoms [23].

### **1.2.6 Prognose des malignen Melanoms**

Die AJCC-Klassifikation des malignen Melanoms wird durch prognoserelevante Indikatoren stratifiziert. In der 8. Edition sind die Tumorgröße, der Ulzerationsstatus sowie das Vorliegen regionaler und systemischer Metastasierung definierende Variablen. Gegenüber der vorangehenden 7. Edition wurde die Beurteilung der Mitosen verlassen und neue Subgruppen definiert [45].

Die Stadien I und II der AJCC-Klassifikation beschreiben Primärtumoren, die bei Diagnosestellung weder regional noch systemisch metastasiert sind. Der Befund von

Tumorgröße und Ulzeration wird dabei zu einem Stadium zusammengefasst. Das 10-Jahres-Überleben dieser Patienten liegt zwischen 98 % im Stadium IA und 75 % im Stadium IIC. Im Vergleich mit der 7. AJCC-Klassifikation ergeben sich hier deutliche Unterschiede. Vor Einführung der intensivierten Lokaldiagnostik betrug das stadienäquivalente 10-Jahres-Überleben 93 % bis 39 %. Diese nominelle Prognoseverbesserung wird durch ein Up-Staging nach Diagnose von Mikrometastasen und somit einer genaueren Stratifizierung erklärt [45].

Im Stadium III liegt per Definition eine lokoregionäre Metastasierung vor. In einem Kollektiv aus 2313 Patienten konnten Balch et al. in 81 % der Fälle klinisch okkulte Mikrometastasen nachweisen. In 19 % der Fälle lagen klinisch oder radiologisch diagnostizierbare Makrometastasen vor [53]. Wird die 5-Jahres-Prognose der Patienten im Stadium III betrachtet, beträgt das mittlere Überleben im Stadium IIIA 93 % gegenüber 32 % im Stadium IIID. Neben der Beurteilung des Lymphknotenstatus erlaubt somit erst die Erfassung weiterer unabhängiger Prognosekriterien wie dem Vorliegen einer Ulzeration und der Primärtumorgröße eine adäquate Stratifizierung [45].

Das Stadium IV ist bei Vorliegen von Fernmetastasen durch eine besonders ungünstige Prognose gekennzeichnet. Das mittlere 1-Jahres-Überleben liegt zwischen 33-62 %. Ein erhöhter LDH-Spiegel als Zeichen des Tumorzerfalls ist hierbei prognostisch besonders ungünstig [54]. Durch die Einführung neuer Therapieformen wird zukünftig eine bessere Prognose erwartet [45].

### **1.2.7 Therapie des malignen Melanoms**

Die frühe Exzision des Primärtumors stellt die primäre kurative Therapie des malignen Melanoms dar und wird routinemäßig durchgeführt. Im Gegensatz zur diagnostischen Exzision wird bei kurativer Intention ein risikoadaptierter Sicherheitsabstand von bis zu 2 cm für die Exzisionsränder und bis tief zur Muskelfaszie empfohlen. Bei Vorliegen von lokalen Lymphknotenmetastasen kann eine komplettierende Lymphadenektomie indiziert sein. In den Stadien IIB bis IIIC wird die Gabe einer adjuvanten Interferon-Alpha-Therapie diskutiert, da eine signifikante, wenn auch nur kurze Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erreicht wird.

Ab dem Stadium III soll die individuelle Therapieempfehlung in einer interdisziplinären Tumorkonferenz erarbeitet werden. In diesem Stadium ist die primäre Therapieintention in der Regel kurativ. Bei Auftreten regionärer Metastasen werden neben der Exzision eine adjuvante Chemo- und Radiotherapie der Lymphwege empfohlen [23].

Im Stadium IV stehen die chirurgische R0 Resektion und Metastektomie im Vordergrund der Behandlung [23]. Sind das Primärmelanom oder dessen Filiae nicht resezierbar, sind alternative Therapieoptionen nur in wenigen Fällen kurativ [55]. Beim BRAF-V600 mutierten Melanom empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie den Einsatz einer systemischen Kombinationstherapie aus einem BRAF- und einem MEK- oder Checkpoint-Inhibitor. Auch c-KIT und Immuntherapien werden als mögliche Therapieoption diskutiert. Aufgrund mangelnder Evidenz wird aber auf eine allgemeine Empfehlung adjuvanter Therapieformen nach Metastektomie verzichtet [23]. In solchen Fällen kann eine Dacarbazin-basierte Mono- oder Polychemotherapie angeboten werden [23]. Weiterer wesentlicher Bestandteil der vorbeschriebenen Therapieformen ist ein patientengerechtes Nebenwirkungsmanagement.

### **1.2.8 Nachsorge des malignen Melanoms**

Die Nachsorge dient primär der Früherkennung von Lokalrezidiven, metachroner Metastasen und möglicher Zweitmelanome. Darüber hinaus ermöglicht sie ebenso eine psychosoziale Anbindung des Patienten. Da 80% der Rezidive innerhalb der ersten drei Jahre nach Primärdiagnose auftreten, wird gerade in diesem Zeitrahmen eine intensivierete Nachsorge empfohlen [23]. Kontrolltermine sollen sich gemäß der S3-Leitlinie an risikoadaptierten Intervallen orientieren. In den Stadien I-III ist die körperliche Untersuchung alternativen Untersuchungstechniken aus Gründen der Praktikabilität überlegen [56]. Ergänzend dazu wird ab Stadium IB eine lokoregionäre Lymphknotenultraschalluntersuchung sowie die Bestimmung des Tumormarkers S100B empfohlen. Ab Stadium IIC soll bei R0-resezierten Patienten zusätzlich eine radiologische Schnittbilddiagnostik angeschlossen werden. Dabei wird eine Bandbreite an Modalitäten wie dem CT, MRT und PET/CT diskutiert [23]. Die Beurteilung des Therapieansprechens fortgeschrittener Melanome ist jedoch kein Gegenstand der aktuellen Leitlinie. In der Praxis orientiert sich diese an allgemeingültigen morphologischen Kriterien der Onkologie [11].

## 1.3 Zielgerichtete Krebstherapie

### 1.3.1 Über Paul Ehrlich zur personalisierten Medizin

Paul Ehrlich gilt auch 100 Jahre nach seinem Tod nicht nur als Begründer der Immunologie und Chemotherapie, sondern auch als intellektueller Wegbereiter der modernen molekularen Onkologie. Nach Beschreibung der Seitenkettentheorie prägte er in Anlehnung an Carl-Maria von Webers „Der Freischütz“ den Begriff der Zauberkugeln. So mutmaßte er, dass es Medikamente geben müsse, die eine Krankheit gezielt ansteuern könnten; ob autonom oder über wirkstofftragende Systeme, die Ehrlich bildlich als Lastwägen beschrieb. Dieser Paradigmenwechsel inspiriert bis heute die zielgerichtete onkologische Therapie und realisiert sich im Gedanken der personalisierten Medizin [57].

Bis in die späten 1960 Jahre dominierten die Chirurgie und Strahlentherapie das Feld der Krebstherapie. Erst nachdem die langfristigen Heilungsraten auch nach radikalen Kombinationsansätzen bei 33 % stagnierten und erste vielversprechende anti-kanzerogene Medikamente entwickelt wurden, führten erste Kliniken eine adjuvante Chemotherapie ein. Diese konnten im Sinne eine System-Therapie auch erstmalig Fernmetastasen adressieren [58].

Der Grundstein für die Entdeckung molekularer Ziele und die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie (*targeted therapy*) wurde 1964 durch das *Special Virus Cancer Program* in den USA gelegt. Das Programm identifizierte letztlich zwar keine onkogenen Viren, war aber für die Erforschung der molekularen Tumorbologie von entscheidender Bedeutung. Durch die Entwicklung genomischer Sequenzierungstechniken konnte das humane Kinom, also Proteinkinasen, als relevante molekulare Ziele einer Krebstherapie identifiziert werden [58]. Durch neu entdeckte molekulare Aberrationen und Fortschritte im Bereich der Biotechnologie wurde eine neue Ära der Krebstherapie eingeleitet [45, 59]. Im Rahmen der personalisierten Krebstherapie werden maligne Läsionen durch Biopsien aufgearbeitet und individuell untersucht. Dadurch können mögliche zielgerichtete molekulare Therapieansätze identifiziert werden. Im Gegensatz zu traditionellen Chemotherapeutika soll der therapeutische Nutzen optimiert und gleichzeitig Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden. Rationale Ziele der Inhibitions-Therapie sind dabei zelluläre Prozesse, die den malignen Phänotyp der Krebszellen definieren: die zelluläre Signaltransduktion, der Zellzyklus, Apoptose-Mechanismen, die Fähigkeit zu invasivem Wachstum, das Proteasom und die erworbene Immuntoleranz [59, 60].

### **1.3.2 Inhibition der Signaltransduktion**

Das Amerikanische Krebsinstitut (NCI) definiert Signaltransduktions-Inhibitoren als Substanzen, die einen spezifischen molekularen Signalweg blockieren und dadurch indirekt Einfluss auf Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zelle nehmen. Typischerweise sind Medikamente dieser Gruppe niedermolekulare Verbindungen oder monoklonale Antikörper.

Regulatorische Botenstoffe wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine kommunizieren über ein komplexes System linearer Signalkaskaden mit der Zelle und ermöglichen deren räumliche Koordination und Adaptation [59]. Durch evolutionären Selektionsdruck hat sich aus den einzelnen, hochkonservierten Signalwegen ein nicht-lineares Signalnetzwerk entwickelt, das die komplexen Reize integriert [61]. Während lipophile Signalstoffe die Zellmembran durchwandern und auf direktem Wege an intrazelluläre Rezeptoren binden können, müssen hydrophile Liganden ihre Wirkung über integrale Membranrezeptoren oder Ionenkanäle entfalten.

So besitzen Zellen von Säugetieren vier verschiedene hochkonservierte MAPK-Signalwege. Durch experimentelle Beobachtungen und die Beschreibung möglicher Mutationen beteiligter Gene wurden diese als potentielle molekulare Ziele einer Krebstherapie identifiziert. Down-Stream-Ziele dieser Kaskaden, wie GTPasen oder Transkriptionsfaktoren, sind zumeist schwieriger zu inhibieren [58, 62]. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie ist das erste und bisweilen bekannteste Beispiel für Signaltransduktions-Inhibitoren [58].

Zur Behandlung des fortgeschrittenen malignen Melanoms haben sich aus dieser Wirkstoffgruppe besonders BRAF- und MEK-Inhibitoren hervor getan. Vemurafenib und Dabrafenib sind oral verfügbare BRAF-Inhibitoren, die bei fortgeschrittenen, V600-mutierten Melanomen zugelassen sind und klinisch eingesetzt werden. Sie wirken durch kompetitive Inhibition des BRAF-Kinase-ständigen ATP-Rezeptors und regulieren den überexprimierten MAPK-Signalweg herab [38]. Medikamentöse Nebenwirkungen sind häufig und zum Teil sehr erheblich. Dazu zählen unter anderem kutane Reaktionen in Form von Hautausschlag, der Ausbildung von Keratoakanthomen, niedriggradiger Plattenepithelkarzinome, einer verstärkten Photosensitivität, Diarrhoe, Fatigue, Fieber, Kopfschmerzen und Arthralgien [63].

### **1.3.3 Zellzyklus-Inhibition**

Ruhephase, Proliferation und Teilung einer eukaryotischen Zelle sind streng durch den organisierten Ablauf des Zellzyklus vorgegeben. Durch ein komplexes Zusammenspiel von

CDK, Cyclinen und CDK-Inhibitoren wird dieser auf natürliche Weise reguliert und die Integrität des replizierten Genoms sichergestellt. Der Eintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus wird durch mitogene Signale des MAPK-Signalwegs initiiert. Bindet das Signalweg-Produkt Cyclin D an CDK4/6, wird diese aktiviert und phosphoryliert das Retinoblastom-Protein. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F-DP aus seiner Komplexierung gelöst und für die Replikation der S-Phase Proteine rekrutiert [64]. Wird dieser initiale Restriktionspunkt zwischen G1- und S-Phase passiert, laufen die konsekutiven Phasen des Zellzyklus unabhängig von weiteren mitogenen Signalen ab [65]. Viele Malignome sind durch einen Integritätsverlust eben dieser frühen oder auch späten Zellzyklus-Restriktionspunkte gekennzeichnet. Dabei wird eine pathologisch vermehrte Cyclin-Expression durch Onkogen-Aktivierung von einem Mangel an CDK-Inhibitoren bei Verlust von Tumorsuppressorgenen unterschieden [65].

CDK-Inhibitoren sind in der Regel niedermolekulare Moleküle. Für den klinischen Einsatz in der Krebstherapie haben sich dabei aber bisher nur CDK4/6-Inhibitoren durchgesetzt. Palbociclib wurde nach langer Erforschung der Zellzyklus-Inhibition als erster Wirkstoff dieser Gruppe entwickelt. Zwei weitere Substanzen, Ribociclib und Abemaciclib, wurden in der Folgezeit entwickelt. Seit 2017 sind Palbociclib und Ribociclib in Kombination mit Letrozol zur Erstlinien-Therapie des fortgeschrittenen hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Brustkrebses in Europa zugelassen. Die CDK4/6-Inhibitoren wirken über eine kompetitive Inhibition des CDK4/6-ständigen ATP-Rezeptors und unterbinden die Initiation des Zellzyklus [66]. Die Induktion einer zellulären Seneszenz wird derzeit als weiterer pleiotroper Effekt der Wirkstoffgruppe diskutiert [64]. Alle drei Inhibitoren sind oral bioverfügbar und haben eine  $IC_{50}$  im niedrig-nanomolaren Bereich. Dabei sind sie im Gegensatz zu den pan-CDK-Inhibitoren besser verträglich und deutlich wirksamer. Als charakteristische gemeinsame Nebenwirkung sind die Myelosuppression, Müdigkeit und Übelkeit beschrieben worden [64].

## ***1.4 Hypothese und Zielsetzung***

Die Hypothese der Studie ist, dass sowohl die funktionelle als auch die molekulare Bildgebung die frühe Wirkung einer molekularen Kombinationstherapie aus Dabrafenib und Ribociclib im humanen malignen Melanom quantitativ erfassen können. Neben morphologischen Biomarkern existieren funktionelle und molekulare Charakteristika, die früh und messbar verändert sind. Der Zuckerstoffwechsel und die Diffusivität innerhalb maligner Zellverbände wurden als Biomarker des Therapie Monitorings diskutiert.  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete-MRT könnten das frühe Therapieansprechen im malignen Melanom objektivieren [67-70]. Durch immunhistochemische ex vivo Validierung soll eine inhaltliche Korrelation mit vorklinischen Referenzstandards überprüft werden. Ziel der Studie ist die Beantwortung von zwei Fragen;

- 1) Kann die longitudinale zweizeitige Verlaufsuntersuchung durch die  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT ein frühes Monitoring einer molekularen Therapie mit Dabrafenib und Ribociclib im Tiermodell eines humanen Melanoms ermöglichen?
- 2) Ergeben sich Vorteile einer molekularen und funktionellen Bildgebung gegenüber morphologischen Untersuchungskriterien im frühen Untersuchungsintervall?

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Zellen***

Humane A-375 Melanomzellen (ATCC ® CRL-1619™, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland) wurde als humanes Xenograft verwendet. Die Zelllinie wurde 1973 durch D. J. Giard aus dem Melanom einer 54-jährigen Patientin isoliert, beschrieben und etabliert. Charakteristisch für die Zellpopulation ist ihr hypotriploider Chromosomensatz und eine BRAF-V600E Mutation, die sich im Phänotyp als amelanotisches Melanom manifestiert. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt 18 Stunden. Für den Versuch wurden Tumorzellen bis zur vierten oder fünften Zellpassage verwendet. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden eine Woche vor Versuchsbeginn aufgetaut und in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen mit frischem Medium (DMEM mit 4,5 g/L Glukose, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) unter einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub>, 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C kultiviert. Subkonfluent gewachsene Kulturen wurden mit PBS gewaschen, mit 1 mL Trypsin/EDTA bei 37 °C im Brutschrank aus der Kulturflasche gelöst und durch Zentrifugieren sedimentiert. Nach Kontrastierung mit Trypanblau wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.  $3 \times 10^6$  A-375 Zellen wurden in 100 µL einer 1:1 Mischung aus PBS (Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) resuspendiert. Diese Zell-Suspension wurde in einer Tuberkulin-Spritze für die Injektion der Tumorzellen zur Inokulation aufgezogen und bereitgestellt.

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um das spontane Auskristallisieren intrazellulärer Flüssigkeit zu verhindern wurde das Einfriermedium (DMEM Medium mit 10 % (v/v) Kälberserum) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Aufgrund der bei Raumtemperatur ausgeprägten Toxizität von DMSO wurden die anfallenden Arbeitsschritte rasch auf Eis durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit Trypsin/EDTA gelöst und in 10 mL Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 700 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Zellen wurden dann in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro mL verdünnt. Dieses Volumen wurde dann in ein

Einfrierröhrchen mit 1 mL vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und schrittweise in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

## **2.2 Tiermodell**

### **2.2.1 Voraussetzungen**

Eine Genehmigung für das Tierversuchsvorhaben nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-36-2016 durch die zuständige Regierung von Oberbayern erteilt. Im Rahmen der Vorbereitung wurde eine theoretische Qualifikation, das Modul Tierversuchskunde (TransMIT, Marburg) und eine praktische Ausbildung (Aktenzeichen GZ.: 55.2-1-54-2532.0-42-2016) absolviert. Für das Versuchsvorhaben wurden  $n = 21$  weibliche, athymische BALB/c (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl) Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 8 bis 10 Wochen und einem Gewicht zwischen 16 und 20 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht. Ein Maximum von vier und ein Minimum von zwei Tieren wurde in einem Typ-2L-Käfig gehalten. Dort standen Nestbaumaterialien und Unterschlupf als Umgebungsangebot zur freien Verfügung. Die Käfige wurden in einem geschlossenen Tierhaltungsschrank unter Kontrolle von Temperatur (26 - 28 °C), Luftfeuchtigkeit (60 %) und Luftdruck (50 Pa) sowie einem 12 Stunden Tag- / Nacht-Rhythmus untergebracht. Bestrahltes Futter und steril filtriertes Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Tierhaltung erfolgte im Labor für Experimentelle Radiologie der Klinik und Poliklinik für Radiologie der LMU München.

### **2.2.2 Tumoringokulation und -wachstum**

Nach einwöchiger Akklimatisierung der Tiere erfolgte eine Inokulation von  $3 \times 10^6$  A-375 Zellen pro Tier. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte mit einer 24-Gauge Nadel in kurzer Isofluran Inhalationsnarkose. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurden die Zellen in einer Suspension von 100  $\mu$ L als eine 1:1 Mischung aus Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung und Matrigel™ subkutan in die linke laterale Flanke injiziert. Danach wurden die Tiere mit einer Ohrlochkennzeichnung markiert und zurück in den Stall gebracht.

Nach erfolgter Inokulation wurden während einer zwölf-tägigen Wachstumsphase täglich Allgemein- und Ernährungszustand der Tiere untersucht. Das Tumorwachstum wurde mit einer Schiebelehre täglich gemessen und protokolliert. Zum Ende der Wachstumsphase erreichten die Tumoren einen durchschnittlichen maximalen Durchmesser von 0,5 cm.

### **2.2.3 Interventionsphase**

Vor Beginn der Intervention wurden die Tiere durch Randomisierung der Therapie- ( $n = 12$ ) oder der Kontrollgruppe ( $n = 9$ ) zugewiesen. Einen Tag vor der ersten Medikamentengabe wurde eine initiale Bildgebung mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und MRT, folgend Baseline-Messung, durchgeführt. An jedem der folgenden Tage 1 bis 6 erhielten die Tiere eine gewichtsadaptierte Kombinationstherapie, bestehend aus BRAF- und CDK4/6-Inhibitoren oder ein Placebo. Nach Abschluss der Therapiephase wurde der Versuch durch eine erneute  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und MRT Bildgebung, folgend Follow-up-Messung, komplettiert. Nach Abschluss der Follow-up-Messung wurden die Mäuse in Isoflurannarkose schmerzfrei euthanasiert. Die Tumoren wurden explantiert und ex situ halbiert. Die eine Hälfte des Tumors wurde in 10 % Formaldehyd-Lösung fixiert, die andere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### **2.2.4 Therapieprotokoll**

Den Tieren wurde, entsprechend der Randomisierung, im Verlauf der Therapiephase täglich das Verum oder das Placebo durch orale Gavage über eine gerade Knopfkanüle verabreicht. Die Therapiegruppe erhielt täglich eine gewichtsadaptierte Kombinationstherapie aus 100 mg LEE011 (Ribociclib, Novartis AG, Basel, Schweiz) pro kg Körpergewicht und 20 mg DRB 436 (Dabrafenib, Novartis AG, Basel, Schweiz) pro kg Körpergewicht. Die Medikamente wurden in 0,5 % Hydroxymethylcellulose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 0,2 % Tween 80 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) und destilliertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) gelöst. Analog zur Therapiegruppe wurde der Kontrollgruppe eine volumenäquivalente Menge des Lösungsmittels der Kombinationstherapie verabreicht.

## 2.3 Multimodale Bildgebung

### 2.3.1 Versuchsdesign

Einen Tag vor und einen Tag nach der Interventionsphase wurde ein multimodales Messprotokoll aus morphologischer und funktioneller Bildgebung durch eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und MRT durchgeführt (Abbildung 2). Durch das nicht-invasive Verfahren bestand die Möglichkeit den individuellen Krankheitsverlauf der Tiere und das Ansprechen auf die Therapie durch wiederholte  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und MRT Untersuchungen nachzuvollziehen.

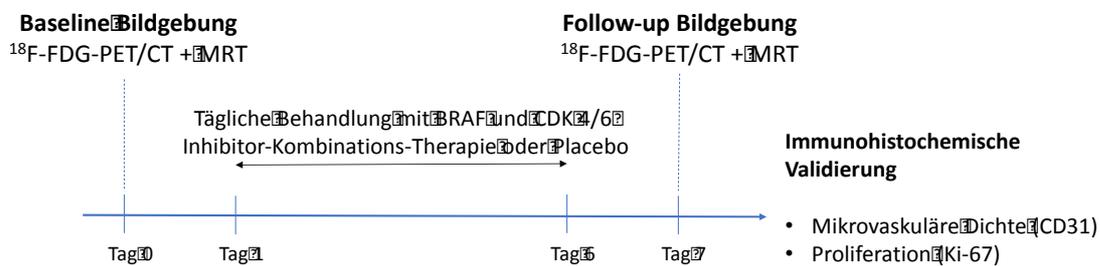


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Die Baseline-MRT und  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT wurde nach initialer Tumor-Wachstumsphase am Tag 0 durchgeführt. Zwischen Tag 1 und 6 erhielten die Tiere nach Randomisierung eine tägliche gewichtsadaptierte BRAF- und CDK4/6-Inhibitor Kombinationstherapie oder ein volumenäquivalentes Placebo. Die Verlaufskontrolle wurde am Tag 7 durchgeführt. Die Tumoren wurden explantiert und immunhistochemisch für die Evaluation der mikrovaskulären Dichte und Tumorzellproliferation aufgearbeitet.

### 2.3.2 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT

#### 2.3.2.1 Grundlagen der PET

Die PET/CT ist eine klinisch etablierte Hybrid-Bildgebung, in der CT-morphologische- und funktionelle PET Bilddatensätze koregistriert werden. Gemäß der Tracer-Methode nach G. von Hevesy können biologische Stoffwechselfvorgänge in vivo dargestellt werden. Kleinste Mengen radioaktiv markierter Moleküle werden intravenös (i.v.) appliziert und die Emissionsstrahlung zur Analyse genutzt. Die verwendeten Radiopharmaka sind durch  $\beta^+$ -Zerfall gekennzeichnete Positronenstrahler. Bei isobarem Kernzerfall werden aus einem Proton ein Positron und ein Neutrino freigesetzt. In einem als Annihilation bezeichneten Vorgang reagiert das Positron mit einem freien Elektron. Binnen weniger Nanosekunden werden diese vernichtet und es wird eine

sogenannte Vernichtungsstrahlung in Form zweier Gammaquanten freigesetzt. Der Winkel zwischen den Emissionsvektoren beträgt dabei annähernd  $180^\circ$ , was für die spätere Detektion eine wichtige Rolle spielt. Die Ruhemasse der vernichteten Teilchen entspricht einer Energie von 1,02 MeV. Die beiden Photonen haben somit eine Energie von jeweils 511 keV. Ein PET-Scanner detektiert die Gammastrahlung durch eine Vielzahl von ringförmig um den Patienten angeordneten Detektoren, die sich aus einer Kombination von Szintillationskristallen und Photomultiplikatoren zusammensetzen. Werden zwei Photonen in einem zeitlichen Abstand von weniger als einer Nanosekunde auf den Detektorblöcken registriert, werden sie als Koinzidenz oder auch *True*, interpretiert und durch eine Koinzidenzlinie verbunden. Hiervon abzugrenzen sind Zufallskoinzidenzen, sogenannte *Randoms*, die durch Streuung der Photonen entstehen. Durch Integration der Inzidenzen kann somit auf die dreidimensionale Radioaktivitätsverteilung des Radiopharmakons im Körper geschlossen werden. Bei einer statischen Messung werden hierbei alle in der Emissionsphase gemessenen Ereignisse integriert und in einem Bild wiedergegeben. Aufgrund der natürlichen Resorption von Gammastrahlung im Gewebe ist eine Bestimmung des absoluten Abschwächungsfaktors durch eine Transmissionsmessung notwendig. Die folgende Korrektur wird als Absorptionskorrektur bezeichnet und hat als Korrektur den größten Stellenwert.

[ $^{18}\text{F}$ ]-2-Fluor-2-deoxy-D-Glukose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) ist das klinisch am häufigsten eingesetzte Radiopharmazeutikum in der onkologischen PET-Bildgebung mit einer physikalischen Halbwertszeit von 109,8 Minuten.  $^{18}\text{F}$ -FDG ist ein Glukose-Analagon, das sich nach i.v.-Applikation im Körper verteilt und ubiquitär durch Zellen aufgenommen wird. Das Radiopharmakon wird über passive Glukose-Transporter 1-5, vor allem in stoffwechselaktiven Geweben, aufgenommen und durch das intrazelluläre Enzym Hexokinase phosphoryliert. Dadurch kommt es zum sogenannten metabolischen Trapping.  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-Phosphat kann aufgrund des Fluoratoms an der C2-Position der Ringstruktur nicht regulär metabolisiert werden und akkumuliert im zellulären Zytoplasma. Die räumliche Verteilung des radioaktiven  $^{18}\text{F}$ -FDG korreliert daher stark mit der zellulären Glukoseaufnahme und Stoffwechsellage [71].

### **2.3.2.2 Grundlagen der CT**

Die Computertomographie ist eine primär morphologische Bildgebung. Durch eine rotierende Röntgenröhre wird ein fächerförmiger Röntgenstrahl erzeugt und auf einen Detektor projiziert. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz kommt es durch Wechselwirkung der Strahlung mit der Materie des zu durchdringenden Körpers zu einer Abschwächung der Strahlung. Der Detektor

misst demnach die eintreffende, residuale Energie der initialen Röntgenstrahlung. Die akquirierten Schwächungsprofile werden registriert, in elektrische Impulse umgewandelt und durch gefaltete Rückprojektion sowie iterative Verfahren zur Rekonstruktion axialer Schichten genutzt. Durch computergestützte Integration der Daten kann ein zweidimensionales Bild in beliebiger Schichtdicke generiert werden. Die räumliche Körperdichte wird dabei in Graustufen dargestellt und lässt sich in Hounsfield-Einheiten semiquantitativ vergleichen. Durch Summation der axialen Schichten können nachträglich weitere Raumebenen rekonstruiert werden.

### ***2.3.2.3 Durchführung der PET/CT***

Für die PET/CT-Bildgebung wurde in einem zweizeitigen Protokoll zunächst eine PET- und im direkten Anschluss eine CT-Messung durchgeführt. Die Datensätze wurden retrospektiv koregistriert und fusioniert. Die PET-Bildgebung fand im Labor für präklinische Bildgebung der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der LMU am Campus Großhadern statt. Für die Bildgebung wurde ein  $\mu$ PET (Siemens Inveon P120 Dedicated PET, Siemens Preclinical Solutions Inc., Knoxville, TN) verwendet. Dieser Scanner akquiriert Datensätze im Listmode und registriert die Events der Emissionsphase in chronologischer Reihenfolge. Die relative Messsensitivität liegt bei ungefähr 10 %. Der 12 x 10 cm große Messbereich erreicht dabei eine Auflösung von 1,2 – 1,4 mm.

Unter kurzer Isofluran-Narkose wurde bis zu vier Tieren 20-30 MBq  $^{18}\text{F}$ -FDG über einen Venenverweilkatheter zeitgleich in die Schwanzvene injiziert. Etwa 40 Minuten später wurden die Tiere erneut mit Isofluran narkotisiert und in einem Messkörper aus Acrylglas für die anschließende Messung stabil gelagert. Der Messkörper wurde versiegelt und durch eine Narkoseeinheit mit 1,5 % Isofluran bei einem Sauerstofffluss von 1 L/min ventiliert. 45 Minuten nach Tracer-Applikation fand die zur Schwächungskorrektur benötigte, 15-minütige Transmissionsaufnahme im PET-Scanner statt. Dafür wurde der Acryl-Messkörper zentral in der Gantry positioniert. Anschließend erfolgte die 30-minütige Emissionsmessung.

Nach Abschluss der Messung im PET-Scanner wurde die CT-Bildgebung an einem klinischen CT Scanner der neuesten Generation (SOMATOM Force, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) an der Klinik und Poliklinik für Radiologie der LMU durchgeführt. Für die spätere morphologische Koregistrierung wurde die lagegleiche Position der Tiere im Acryl-Messkörper sichergestellt. Die Lagerung wird an einem Beispiel in Abbildung 3 dargestellt.

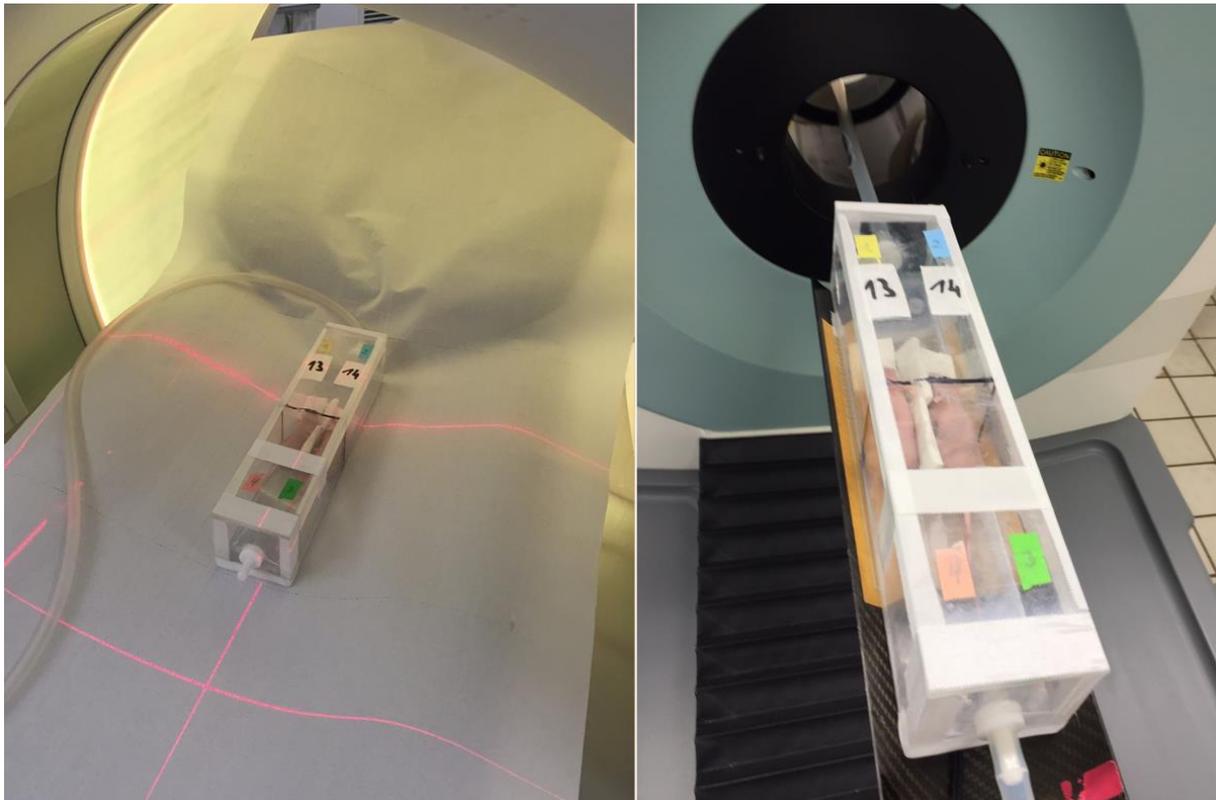


Abbildung 3: Lagerung der Versuchstiere im Acryl-Messkörper

In dieser Darstellung wird die Lagerung von zwei Mäusen im Messkörper exemplarisch gezeigt: Positionierung des Messkörpers im CT (links) und im  $\mu$ PET (rechts).

#### 2.3.2.4 Postprocessing und Auswertung

Zur statischen Bildrekonstruktion der im Listmode akquirierten Daten wurden 3D OS-EM- (4 Iterationen) und 3D-MAP (32 Iterationen) Algorithmen verwendet. Dadurch wurden die  $\mu$ PET-Daten unter zusätzlicher Streustrahlungs- und Absorptionskorrektur in einer 256 x 256 Matrix mit einem Zoom von 100 % rekonstruiert. Nach dieser Transformation konnten die Daten mit der Software Inveon Workplace (Siemens Preclinical Solutions Inc., Knoxville, TN) aufbereitet werden. Die korrespondierenden Bilder aus PET und CT wurden anhand definierter anatomischer Landmarken und der Läsion retrospektiv koregistriert. In jedem Fusionsdatensatz wurden sphärische *Volumes of Interest (VOI)* von 9 mm<sup>3</sup> unter CT-Kontrolle in der Leber bestimmt. Der Tumor wurde in seiner gesamten Ausdehnung erfasst und demarkiert. Die VOI wurde anschließend durch einen vorab festgelegten Schwellenwert von 30 % des maximal im Tumor gemessenen *Standardized Uptake Value (SUV)* begrenzt, um das metabolische Tumervolumen (MTV) zu bestimmen. Der maximale *Standardized Uptake Value (SUV<sub>max</sub>)* wurde als aktivster und somit klinisch relevantester Fokus bestimmt. Der linke Leberlappen wurde als Hintergrund zur Bestimmung einer *Tumor-to-Liver-Ratio (TTL-R)* genutzt.

### **2.3.3 Magnetresonanztomographie**

#### ***2.3.3.1 Grundlagen der MRT***

Die MRT ist ein bildgebendes Verfahren, das auf den Prinzipien der Kernspinresonanz basiert. Im MR-Tomographen wird der zu untersuchende Körper einem starken externen Magnetfeld ausgesetzt. Dadurch kommt es zu einer parallelen und antiparallelen vektoriellen Ausrichtung der Protonen entlang der Z-Achse des Magnetfeldes. Zeitgleich kreiseln die Protonen um die Z-Achse, was als Präzession bezeichnet wird. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung wird als Präzessions- oder auch Lamorfrequenz bezeichnet. Durch einen Radiofrequenz-Puls werden die Protonen bei Erfüllung der Resonanzbedingungen, d. h. wenn der externe Puls mit der Lamorfrequenz der Protonen übereinstimmt, angeregt und aus der longitudinalen in die transversale Ebene ausgelenkt. Es kommt kurzzeitig zu einer transversalen Magnetisierung. Nach Abschalten des Pulses werden die Protonen durch eine transversale Relaxierung entsprechend des externen Magnetfeldes repolarisiert. Die Dephasierung der transversalen Magnetisierungskomponente spiegelt sich in der T2-Relaxation wider. Der Begriff der longitudinalen Relaxation beschreibt die Wiederherstellung der longitudinalen Magnetisierung. Die T1- oder auch Spin-Gitter-Relaxationszeit ist hierbei ein Geschwindigkeitsmaß mit der das lokale thermische Gleichgewicht wiederhergestellt wird. Bei der MRT kann ein hoher Weichteilkontrast erreicht werden. Dieser leitet sich abhängig von der verwendeten Sequenz und dem zu untersuchenden Gewebe ab.

Biophysikalische Grundlage der diffusionsgewichteten Bildgebung (DWI) ist die freie Diffusion von Wassermolekülen im Körper. Im Gewebe bewegen sie sich durchschnittlich um 30  $\mu\text{m}$  pro 50 ms fort. Durch Auflösung dieser Bewegung können Rückschlüsse auf die mikroskopische Interaktion von Wasser mit hydrophoben Zellmembranen und Makromolekülen gezogen werden. Somit erlaubt die DWI einen Einblick in die Diffusivität von Wasser im Gewebe und ermöglicht Rückschlüsse auf eine strukturelle Organisation, die sonst über die technische Auflösung der MRT hinausreichen würde [72, 73].

Die DWI basiert auf der Verwendung gepulster Feldgradienten im starken Magnetfeld des MRT-Scanners. Das Signal wird hierbei aus intra- und extrazellulärem Raum sowie dem vaskulären Raum des Gewebes bestimmt. Das Ausmaß der Diffusionswichtung wird hierbei als sogenannter b-Wert definiert und hängt von drei Variablen ab: der Gradienten-Amplitude, der Dauer des angelegten Gradienten und dem Zeitintervall zwischen den gepulsten Gradienten. Diffusionsgewichtete Bilder basieren auf einer T2-Wichtung mit unterschiedlich starker Diffusionswichtung. Bei geringem b-Wert entsteht ein Bild mit deutlicher T2-Komponente. Um sogenannte *T2-Shine-Through*-Artefakte zu vermeiden, werden Sequenzen

mit hohem b-Wert verwendet. Werden DWI-Rohdatensätze mit unterschiedlichen b-Werten verrechnet, können parametrische Maps generiert werden. Um den anisotropen, komplexen strukturellen Gegebenheiten und der damit einhergehenden Diffusionsrestriktion in vivo gerecht zu werden, wird hier, in Anlehnung an die molekulare Diffusion im freiem Raum, ein scheinbarer Diffusionskoeffizient, der sogenannte ADC, errechnet [73].

### ***2.3.3.2 Durchführung der MRT***

Die Messungen wurden an einem klinischen 3-Tesla MRT-Scanner (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) an der Klinik und Poliklinik für Radiologie der LMU München durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 2,0 Vol.-% Isofluran bei einem Sauerstofffluss von 1 L/min in einer dedizierten Induktionskammer aus Acryl. Die Tiere wurden einzeln in einer speziellen Messvorrichtung mit Wärmekissen in einer 16-Kanal-Handspule (Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) in Bauchlage positioniert. Während der Messung im MRT wurde die Narkose bei 1,5 Vol.-% Isofluran und unverändertem Sauerstofffluss mit Verlängerungsschlauch und Beatmungsmaske aufrechterhalten. Zur räumlichen Orientierung des Tieres im MRT wurden Lokalisierungssequenzen und wassergefüllte Testkörper verwendet und das Messfeld definiert. Für die morphologische Beurteilung wurden anschließend räumlich hochaufgelöste T2-Sequenzen in axialer und coronarer Schnittführung akquiriert. Hierfür wurde eine 2D Turbo Spin-Echo-Sequenz (TR = 5470 ms, TE = 91 ms, planare Auflösung 0,3 x 0,3 mm<sup>2</sup>, Matrixgröße 192 x 192, Schichtdicke 1,5 mm) verwendet. Die DWI wurde mit einer echoplanaren Sequenz (TR = 3200 ms, TE = 50 ms, FOV=84 mm, Aufnahmematrix 64 x 64, Rekonstruktionsmatrix 128 x 128, Schichtdicke 2,0 mm, Aufnahmezeit 180 s, 3 b-Werte: b = 0 s/mm<sup>2</sup>, 200 s/mm<sup>2</sup>, 800 s/mm<sup>2</sup>) durchgeführt.

### ***2.3.3.3 Postprocessing und Auswertung***

Die DICOM-Datensätze wurden mit einer am Josef Lissner Laboratory for Biomedical Imaging der Klinik und Poliklinik für Radiologie etablierten Software (PMI Version 0.4, *Platform for Research in Medical Imaging*) analysiert [74]. Die PMI-Software wurde mit IDL Version 6.4 (*ITT Visual Information Solutions*, Boulder, CO) programmiert. Der Untersucher wurde verblindet. Die Volumetrie wurde in axialen, T2-gewichteten Datensätzen durchgeführt, um die VOI als konventioneller Surrogat-Parameter für das Tumor-Therapieansprechen zu bestimmen. Der ADC wurde unter manueller Differenzierung von Gefäßen und Nekrosezonen nach vorangegangener morphologischer Demarkierung des Tumors erfasst.

## ***2.4 Histologische und immunhistochemische Färbungen***

Zur Validierung der in vivo durchgeführten Bildgebung wurden die Ergebnisse mit dem Referenzstandard der Immunhistochemie verglichen.

### **2.4.1 Plastination der Proben in Paraffin**

Nachdem die Proben für 4 Stunden unter fließendem Wasser ausgewaschen wurden, erfolgte die maschinelle Einbettung (Excelsior™ ES Tissue Processor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) des Gewebes in Paraffin. In einem standardisierten Programm wurde das Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, mit Toluol von Restflüssigkeit befreit und mit Paraffin ausgegossen.

### **2.4.2 Anfertigung von Schnittpräparaten**

Aus der Zielregion der Proben wurden 3 µm dicke Schnitte im Schlittenmikrotom gewonnen. Im warmen Wasserbecken wurden diese gestreckt und einzeln auf Super Frost Plus Objektträgern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) aufgezogen. Die Schnittpräparate wurden danach für histologische und immunhistochemische Färbungen im Inkubator bei 40 °C über Nacht getrocknet.

### **2.4.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Für eine erste Übersicht und zur Beurteilung nekrotischer Areale wurde die H&E-Färbung durchgeführt. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Präparate im Färbegestell zwei Mal für 10 Minuten in NeoClear und anschließend in Becken einer absteigenden Alkoholreihe getaucht (je 2 x 5 Minuten in 100 %, je 1 x 5 Minuten in 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Ethanol). Danach wurden die Proben zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die entparaffinierten Präparate wurden für 3 Minuten in Hämalaun-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) inkubiert, anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut und zweimal für jeweils 1 Minute mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Nun wurden die Präparate in Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) gefärbt und in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol entwässert (2 x 5 Minuten in 96 %, 3 x 5 Minuten in 100 % Ethanol und 2 x 10 Minuten in Xylol. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Neo-Mount (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### **2.4.4 Immunhistochemische Färbung proliferierender Zellen (Ki-67)**

Zur Entparaffinierung wurden die Schnittpräparate 2 x 5 Minuten in NeoClear getaucht. Zur Rehydrierung wurden sie anschließend 2 x 3 Minuten in 100 %, je einmal in 95 %, 80 % und 70 % Ethanol getaucht, bevor sie abschließend 2 x 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O gespült wurden. Danach wurden die Gewebeschnitte zur Demaskierung mit Citrat-Puffer benetzt, bei 600 W für 20 Minuten in 0,1 M Citrat-Puffer (pH 6,0) gekocht und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach zwei Waschschritten (je 10 Minuten in ddH<sub>2</sub>O und 1 x 0,05 % TBS-Tween) erfolgte die Inkubation der Objektträger mit gebrauchsfertiger Peroxidase-Lösung (DAKO Envision + System, Glostrup, Dänemark). Nach einem weiteren Waschschriff (2 x 10 Minuten mit 0,05 % TBS-Tween) wurden die Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C mit dem primären Ki-67-Antikörper (ab 16667, abcam, Cambridge, Großbritannien), gelöst in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5 und 1 % BSA), inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte nach einem Waschschriff (2 x 10 Minuten in 0,05 % TBS-Tween) für 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, gebrauchsfertige Lösung aus dem Envision-DAKO Kit) und nach einem erneuten Waschschriff (2 x 10 Minuten 0,05 % TBS-Tween) mit 3-3' Diaminobenzidin (DAB Chromogen) für 5 - 30 Minuten inkubiert, bis sich die charakteristische braune Färbung entwickelte. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gespült, für 10 Sekunden in Mayers Hämalaun gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zuletzt erfolgte die Eindeckung der Gewebeschnitte mit Kaisers Glycerin Gelatine (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden gleichermaßen angefertigt. Die Objektträger wurden unter einem Lichtmikroskop (Leica DM 2500, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) untersucht und pro Gewebeschnitt wurden je 10 repräsentative Ausschnitte bei 200-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert. Die positiv gefärbten Zellkerne wurden durch eine MATLAB Applikation ausgezählt.

#### **2.4.5 Immunhistochemische Darstellung der Gefäßdichte (CD31)**

Wie zuvor beschrieben, wurden auch hier die Präparate bis zur Inkubation mit dem primären Antikörper prozessiert. Dann wurde der polyklonale Kaninchen-Anti-CD31 Antikörper (ab 28364, abcam, Cambridge, Großbritannien) in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen. Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 2 x 10 Minuten in 0,05 % TBS-Tween gewaschen und daraufhin mit dem zweiten Antikörper aus dem DAKO-Kit für 30 Minuten bei Raumtemperatur und in der feuchten Kammer inkubiert. Erneut wurden die Präparate 2 x 10 Minuten in 0,05 % TBS-Tween

gewaschen und anschließend mit 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC Chromogen) für 5 - 30 Minuten inkubiert. Danach wurden sie für 10 Minuten in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, für 10 Sekunden in Mayers Hämalaun gegengefärbt und zum Abschluss unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Präparate mit Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckt. Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden in gleicher Art und Weise angefertigt. Die Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht. Pro Tumor wurden 10 repräsentative Ausschnitte bei 200-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert. Positiv gefärbte Gefäßanschnitte wurden manuell ausgezählt.

## 2.5 Statistik

Die Daten wurden mit einer kommerziellen Statistik-Software (SPSS Version 23, IBM Corp., Armonk, NY) ausgewertet. In der Analyse wurde aufgrund der kleinen Stichprobengröße beider Gruppen von einer nicht-parametrischen Verteilung ausgegangen. Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine randomisierte, kontrollierte Interventionsstudie. Die Messwerte werden jeweils mit Standardabweichung (SD) und SI-Einheit angegeben. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wird im zweiseitigen Test als  $p = 0,05$  definiert. Die Variablen aus multiparametrischer MRT, PET/CT und Immunhistochemie wurden zwischen erster Messung am Tag 0 und Verlaufskontrolle am Tag 7 im Inter- und Intragruppenvergleich statistisch untersucht. Durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben wurde die Gleichheit der zentralen Tendenzen der Baseline-Messung gegenüber der Follow-up-Untersuchung in beiden Testgruppen geprüft. Für den Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben genutzt. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen den diagnostischen Modalitäten und der Immunhistochemie wurde der Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. Die Qualität der Korrelation wurde nach Cohen graduiert.

### **3 Ergebnisse**

Das Untersuchungsprotokoll konnte bei 21 Tieren erfolgreich abgeschlossen werden. Die Primärdaten sind im Anhang in den Tabellen 3, 4 und 5 aufgeführt. Für die bei der Baseline akquirierten Parameter konnten in keiner der Untersuchungen signifikante Unterschiede im Intergruppentest festgestellt werden. Es ist also von einer vergleichbaren Grundverteilung der Gruppen auszugehen.

#### **3.1 *<sup>18</sup>F-FDG-PET/CT***

##### **3.1.1 Tumor-to-Liver-Ratio**

Bei der Baseline-Messung zeigten sich keine Unterschiede in der TTL-R zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ( $4,19 \pm 0,97$  gegenüber  $3,70 \pm 0,90$ ;  $p = 0,193$ ). Nach Applikation der Kombinationstherapie zeigte sich eine Suppression der Stoffwechselaktivität (<sup>18</sup>F-FDG Aufnahme) der Melanom Xenografts mit einer signifikanten Abnahme der TTL-R ( $4,19 \pm 0,97$  gegenüber  $3,19 \pm 0,97$ ;  $p = 0,015$ ). Im Gegensatz dazu kam es in der Kontrollgruppe über den Behandlungsverlauf zu einer nicht signifikanten Zunahme der TTL-R ( $3,70 \pm 0,90$  gegenüber  $4,55 \pm 0,91$ ;  $p = 0,072$ ). Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich zum Follow-up ein signifikanter Unterschied der TTL-R ( $3,19 \pm 0,97$  gegenüber  $4,55 \pm 0,91$ ;  $p = 0,015$ ) mit einer signifikant niedrigeren Stoffwechselaktivität in der Therapiegruppe. Die Daten aus Therapie- und Kontrollgruppe sind als Box-Plots in Abbildung 4, repräsentative CT und PET/CT-Fusionsbilder in Abbildung 5 dargestellt.

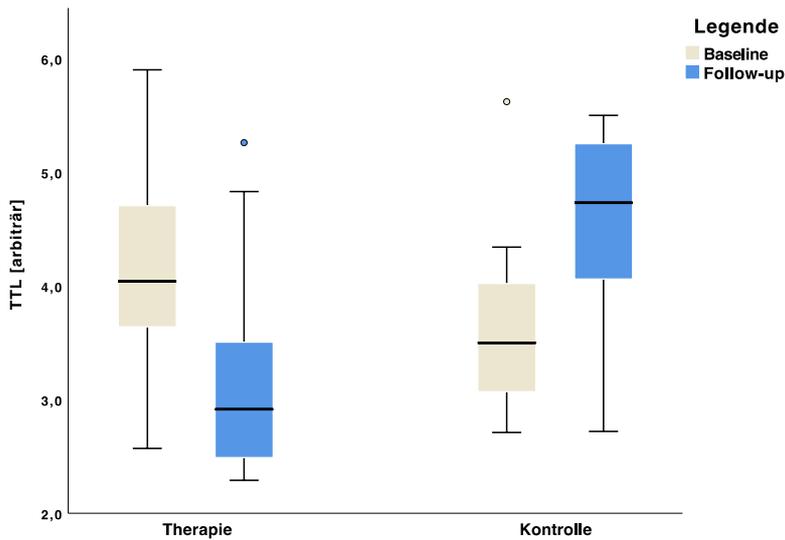


Abbildung 4: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung der TTL-R-Auswertung

Die Abnahme der TTL-R in der Therapiegruppe ist signifikant ( $p = 0,015$ ). In der Kontrollgruppe war die Zunahme nicht signifikant ( $p = 0,072$ ). Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Vergleichsgruppen zum Follow-up ( $p = 0,015$ ).

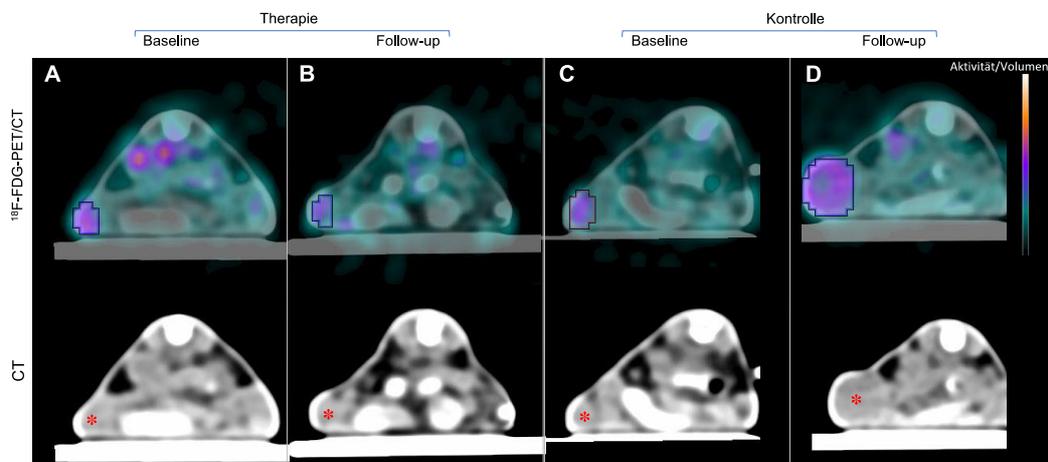


Abbildung 5: Axiale CT- und PET/CT-Bilder repräsentativer Tumor-Querschnitte

Exemplarische  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT Bilder in Therapie- und Kontrollgruppe: Die Kontur des Tumors ist im Fusionsbild umrandet, im CT-Bild ist der Tumor durch einen Stern gekennzeichnet. Im zeitlichen Verlauf sind deutliche Zunahmen von MTV- und Tumolvolumen in der Kontrollgruppe zu erkennen, regrediente Volumina in der Therapiegruppe.

### 3.1.2 Metabolisches Tumolvolumen

Das in der Baseline-PET/CT gemessene MTV zeigte zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied ( $161,1 \pm 86,5 \text{ mm}^3$  gegenüber  $217,9 \pm 145,8 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,464$ ). Während das MTV in der Therapiegruppe nach abgeschlossener Behandlung nicht signifikant zugenommen hat ( $161,1 \pm 86,5 \text{ mm}^3$  gegenüber  $211,6 \pm 139,4 \text{ mm}^3$ ,  $p = 0,308$ ), zeigte sich eine signifikante Größenzunahme des MTV in der Kontrollgruppe ( $217,9 \pm 145,8 \text{ mm}^3$  gegenüber  $573,5 \pm 294,7 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,008$ ). In der Follow-up Bildgebung weist die Kontrollgruppe ein signifikant größeres metabolisches Tumolvolumen auf als die Therapiegruppe ( $573,5 \pm 294,7 \text{ mm}^3$  gegenüber  $211,6 \pm 139,4 \text{ mm}^3$   $p = 0,001$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

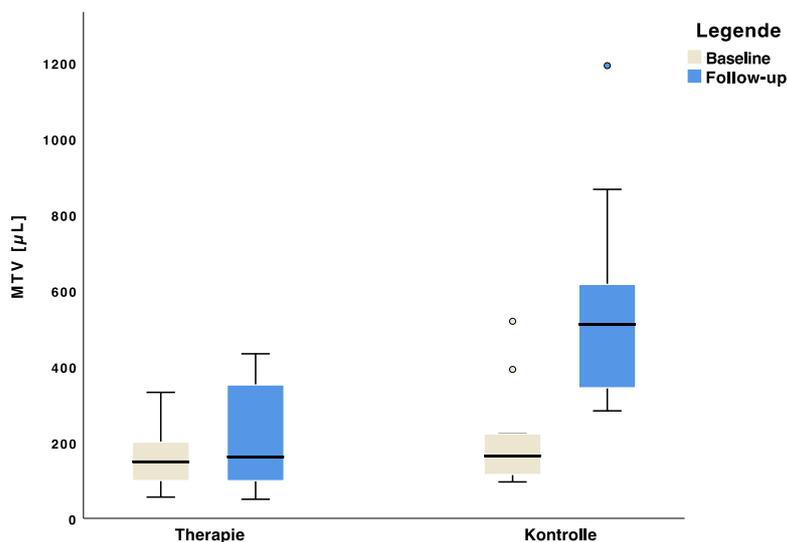


Abbildung 6: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung der MTV-Auswertung

Es zeigte sich eine nicht signifikante Größenprogression ( $p = 0,308$ ) des MTV in der Therapiegruppe bei signifikanter Zunahme ( $p = 0,008$ ) in der Kontrollgruppe. Der Unterschied der Vergleichsgruppen ist zum Follow-up signifikant ( $p=0,001$ ).

## 3.2 Magnetresonanztomographie

### 3.2.1 Apparent Diffusion Coefficient (ADC)

Zur Baseline-Bildgebung zeigt der Intergruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied in den ADC-Werten von Therapie- und Kontrollgruppe auf ( $0,78 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  gegenüber  $0,79 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p = 0,754$ ). In der Kontrollgruppe manifestierte sich über den Verlauf des Beobachtungszeitraumes eine signifikant zunehmende Diffusionsrestriktion des Melanom Xenografts ( $0,79 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  gegenüber  $0,68 \pm 0,06 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p = 0,012$ ). Im Gegensatz dazu ist in der Therapiegruppe eine signifikante Zunahme des ADC, entsprechend einer Abnahme der Diffusionsrestriktion, festzustellen ( $0,78 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  gegenüber  $0,90 \pm 0,13 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p = 0,026$ ). Im Vergleich zum Follow-up zeigt sich ein signifikant höherer ADC in der Therapie- als in der Kontrollgruppe ( $0,90 \pm 0,13 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  gegenüber  $0,68 \pm 0,06 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p < 0,001$ ). Das Boxplot-Diagramm in Abbildung 7 stellt diese Unterschiede graphisch dar. Repräsentative Bilder zeigt Abbildung 8.

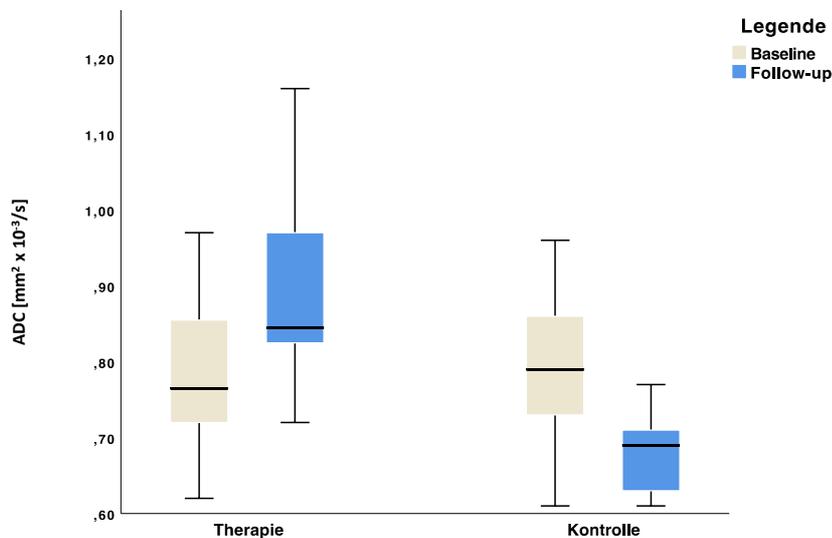


Abbildung 7: Box-Whiskers-Plot zur graphischen Darstellung der ADC-Auswertung

Signifikante Zunahme ( $p = 0,026$ ) des ADC Wertes in der Therapiegruppe und eine signifikante Diffusionsrestriktion ( $p = 0,012$ ) in der Kontrollgruppe. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der Vergleichsgruppen zum Follow-up.

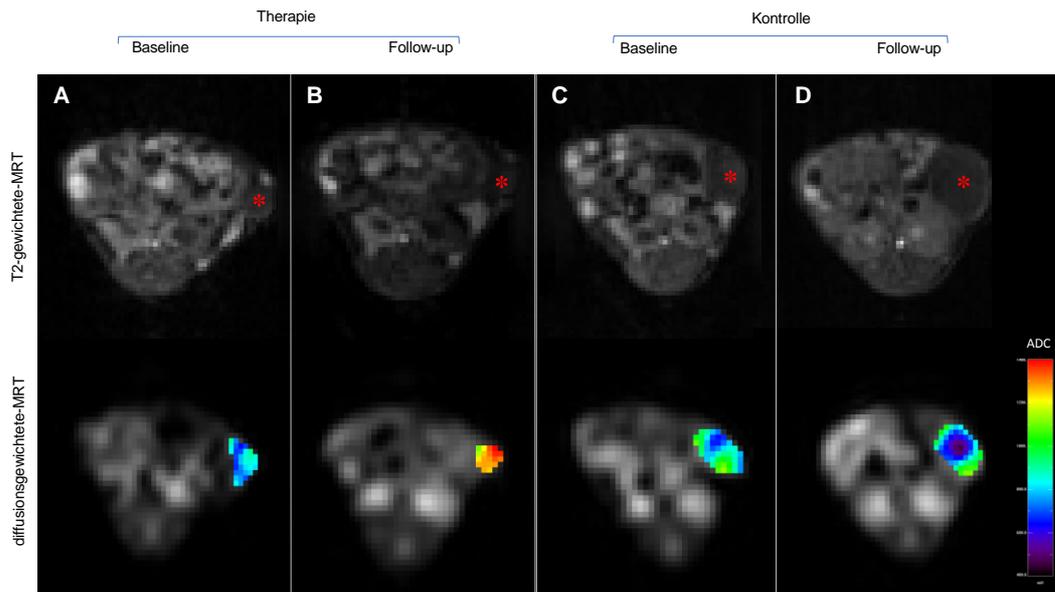


Abbildung 8: Axiale MRT Querschnitte repräsentativer Tumor-Läsionen im Vergleich

Exemplarische MRT in Therapie- und Kontrollgruppe: Die obere Zeile zeigt T2-gewichtete MRT Bilder (Tumor mit Stern markiert). Die untere Zeile zeigt DWI-Bilder, der Tumor ist hier durch die ADC-Map hervorgehoben. Die mediane Zunahme des ADC in der Therapiegruppe und die Abnahme in der Kontrollgruppe wird durch die ADC Legende ergänzt.

### 3.2.2 Morphologisches Tumolvolumen

In der Ausgangsgröße der Tumoren bestand an Tag 0 zwischen den Gruppen ( $94,6 \pm 71,4 \text{ mm}^3$  gegenüber  $134,3 \pm 89,0 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,219$ ) kein signifikanter Unterschied. Nach einwöchiger Kombinationstherapie zeigte sich eine nicht signifikante Größenzunahme des morphologischen Tumolvolumens in der Therapiegruppe ( $94,6 \pm 71,4 \text{ mm}^3$  gegenüber  $130,8 \pm 91,3 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,071$ ). Unter Placebo-Gabe ist das Tumolvolumen im Verlauf signifikant angestiegen ( $134,3 \pm 89,0 \text{ mm}^3$  gegenüber  $381,9 \pm 179,4 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,008$ ). Dieser Unterschied zeigt sich auch im Intergruppenvergleich mit einem signifikant größeren Tumolvolumen in der Kontrollgruppe gegenüber der Therapiegruppe im Follow-up ( $381,9 \pm 179,4 \text{ mm}^3$  gegenüber  $130,8 \pm 91,3 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,001$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

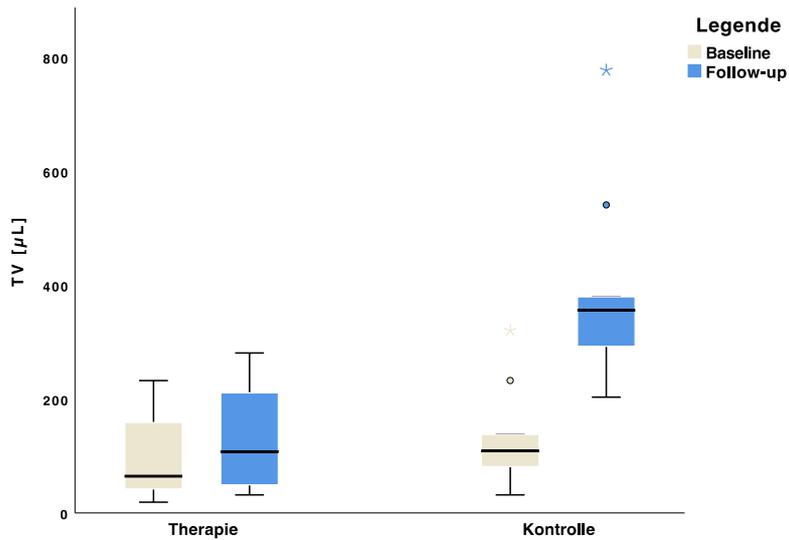


Abbildung 9: Box-Whiskers-Plot zur Darstellung des Tumorvolumens

Die nicht signifikante Zunahme ( $p = 0,071$ ) des Tumorvolumens in der Therapiegruppe steht der signifikanten Volumenzunahme ( $p = 0,008$ ) in der Kontrollgruppe gegenüber. Entsprechend ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der Vergleichsgruppen zum Follow-up.

### 3.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der explantierten Tumoren zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression der mikrovaskulären Dichte (CD31:  $147 \pm 48$  gegenüber  $287 \pm 92$ ;  $p < 0,001$ ) sowie der Tumorzellproliferation (Ki-67:  $3718 \pm 998$  gegenüber  $5389 \pm 1332$ ;  $p = 0,007$ ) im Intergruppen-Vergleich. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

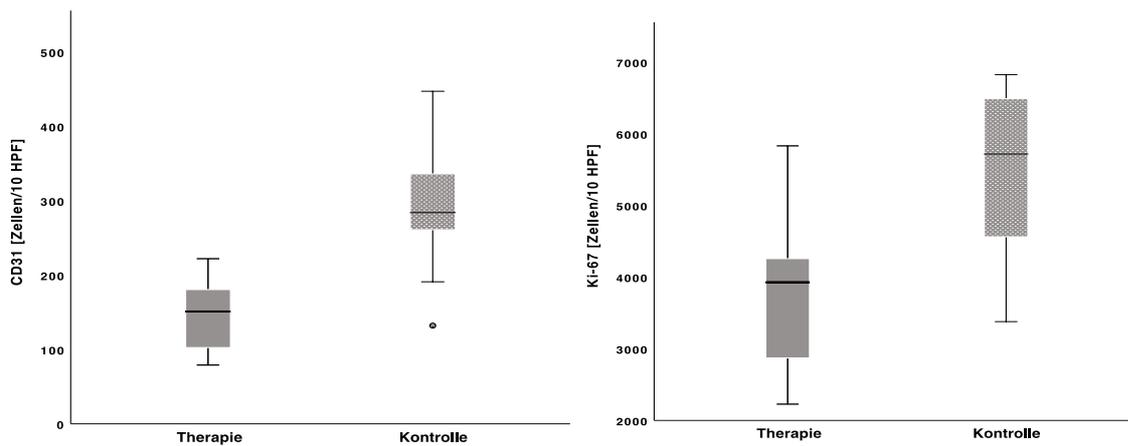
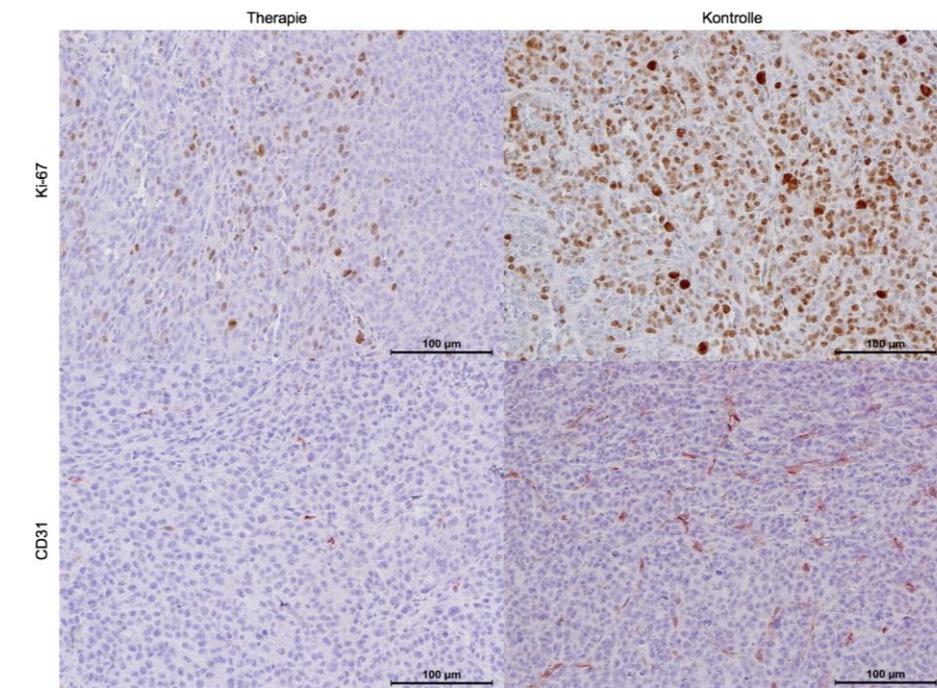


Abbildung 10: Box-Whiskers-Plots zur Immunhistochemie-Auswertung

Quantitative Auswertung der Immunhistochemie; CD31 links und Ki-67 rechts. Signifikante Unterschiede der Antigen-Dichte von CD31 ( $p < 0,001$ ) und Ki-67 ( $p = 0,007$ ) sind zwischen Therapie- und Kontrollgruppe feststellbar.



*Abbildung 11: Repräsentative Gewebeschnitte nach Immunhistochemie und Gegenfärbung*

*Die obere Zeile zeigt repräsentative Schnittpräparate aus Therapie- und Kontrollgruppe nach Färbung des Proliferationsantigens Ki-67. Die untere Zeile vergleicht die mikrovaskuläre Dichte (CD31) zwischen den beiden Gruppen. Die exemplarischen Gewebepreparate zeigen eine deutliche, therapieinduzierte Reduktion beider Oberflächen-Antigene.*

### ***3.4 Korrelation der Studienergebnisse***

#### **3.4.1 Validierung der Ergebnisse der PET/CT mit der Immunhistochemie**

Die TTL-R zeigte eine signifikante und hohe Korrelation zur immunhistochemischen mikrovaskulären Dichte (CD31,  $\rho = 0,79$ ;  $p < 0,001$ ), jedoch keine signifikante und nur geringe Korrelation zur Proliferation (Ki-67,  $\rho = 0,33$ ;  $p = 0,144$ ). Das MTV zeigte eine signifikante und hohe Korrelation zur mikrovaskulären Dichte des Tumors (CD31,  $\rho = 0,78$ ;  $p < 0,001$ ), aber nicht zur Tumorzellproliferation (Ki-67,  $\rho = 0,19$ ;  $p = 0,414$ ).

#### **3.4.2 Validierung der Ergebnisse aus der MRT mit der Immunhistochemie**

Für den ADC wurde eine negative, signifikante und hohe Korrelation zur mikrovaskulären Dichte (CD31,  $\rho = -0,80$ ;  $p < 0,001$ ), aber keine signifikante und nur moderate Korrelation zur Proliferation (Ki-67,  $\rho = -0,42$ ;  $p = 0,061$ ) festgestellt. Das im MRT gemessene morphologische Tumolvolumen korrelierte signifikant und hoch mit der mikrovaskulären Dichte (CD31,  $\rho = 0,75$ ;  $p < 0,001$ ), jedoch nicht signifikant und nur moderat mit der zellulären Proliferation (Ki-67,  $\rho = 0,31$ ;  $p = 0,169$ ).

#### **3.4.3 Korrelation der Ergebnisse aus der PET/CT und der MRT**

$\Delta$ TTL-R und  $\Delta$ ADC korrelierten signifikant und hoch ( $\rho = -0,75$ ;  $p = 0,002$ ). Werden die Differenzen der morphologischen ( $\Delta$ Tumolvolumen) und metabolischen ( $\Delta$ MTV) Tumorummetrie verglichen, lässt sich ebenfalls eine signifikante und hohe Korrelation nachweisen ( $\rho = 0,94$ ;  $p < 0,001$ ).

## **4 Diskussion**

### **4.1 *BRAF und CDK4/6-Inhibitor Kombinationstherapie***

Vor Einführung molekularer Pharmazeutika und der Immuntherapie lag das mediane Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom unter konventioneller Chemotherapie mit Dacarbazin zwischen 7 bis 11 Monaten. Ein Therapieansprechen wurde in lediglich 9 % der Fälle erreicht [75]. Die aktuelle S3-Leitlinie wertet die Mono- und Polychemotherapie inzwischen als nachrangige Ansätze, wenn der Einsatz von BRAF-/MEK-Inhibitoren oder PD-1-Antikörpern nicht indiziert ist [23, 76, 77]. Obwohl die Kombination von Dacarbazin mit anderen Chemotherapeutika das Gesamtüberleben bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom moderat verbessert, hat die Polychemotherapie aufgrund der deutlichen Zunahme an Nebenwirkungen keine klinische Relevanz [78]. Neben der klassischen Metastektomie, Chemo- und Strahlentherapie hat der Einsatz von Signaltransduktions- und Checkpoint-Inhibitoren zur Behandlung definierter Patientenkollektive Eingang in die Leitlinien gefunden [23]. In den Zulassungsstudien von Ipilimumab, Vemurafenib, Dabrafenib und einer Reihe weiterer MEK-Inhibitoren konnte das Therapieansprechen auf bis zu 68 % und das mediane Überleben auf bis zu 25 Monate gesteigert werden [79]. Die Relevanz und Aktualität dieser Therapiemechanismen wird durch die Nobelpreisverleihung an Allison und Honjo in 2018 unterstrichen. Vor allem Kombinationstherapien konnten bisher vielversprechende Ergebnisse aufweisen. Diese gelten aber in der Regel nur für Subpopulationen von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom. So können zwei Drittel aller Patienten mit fortgeschrittenem Melanom nicht von Signaltransduktionsinhibitoren profitieren; einerseits weisen ungefähr 50 % der Patienten keine BRAF-V600-Mutation auf, andererseits bilden sich bei ungefähr einem Drittel der behandelten Patienten bereits im frühen Verlauf therapielimitierende Resistenzen aus [38, 80].

In der coBRIM-Studie konnte durch Einsatz einer Kombinationstherapie aus Vemurafenib und Cobimetinib ein Therapieansprechen in 70 % der Fälle erreicht werden. Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei 12 Monaten [81, 82]. Da eine anhaltende Remission unter Monotherapie aufgrund zellulärer Resistenzmechanismen in der Regel nicht erreicht werden kann, wird vor allem die Kombination wirkungsverschiedener Therapieformen untersucht. Dadurch wird versucht synergistisches und längerfristiges Therapieansprechen zu erzielen [55]. Auch durch die Kombination von BRAF- und CDK4/6-Inhibitoren könnte eine Restitution des

MAPK-Signalweges erreicht werden [41]. Direkte Vergleichsstudien molekularer Kombinationstherapien in der Therapie des fortgeschrittenen Melanoms existieren bisher nicht [83]. In einer indirekten Vergleichsstudie haben Daud et al. die Ergebnisse der COMBI-v- und coBRIM-Studien mit einer von Bucher et al. entwickelten Methode analysiert. Hierbei wurden zugelassene Leitlinien-gerechte BRAF-/ MEK-Inhibitor-Kombinationstherapien, bestehend aus Dabrafenib und Trametinib sowie Vemurafenib und Cobimetinib, verglichen. Zusammenfassend konnte bezüglich des Therapieansprechens, progressionsfreien Überlebens sowie Gesamtüberlebens kein Unterschied festgestellt werden. Die Therapie mit Dabrafenib und Trametinib war jedoch mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil assoziiert und wird daher als Erstlinien-Therapie diskutiert [83-85]. In 2017 haben Ascierto et al. erstmalig Daten einer Triple-Therapie zur Behandlung des malignen Melanoms publiziert. Die Therapie bestand aus dem BRAF-Inhibitor Encorafenib, dem MET-Inhibitor Binimetinib und dem CDK4/6-Inhibitor Ribociclib. 22 von 42 Patienten zeigten eine vollständige oder partielle Therapieantwort, auch das progressionsfreie Überleben konnte auf 9,2 Monate verlängert werden. Dabei wurde eine deutliche Zunahme an Nebenwirkungen beobachtet. Bei kleiner Patientenkohorte, hohen Therapiekosten und ausgeprägtem Nebenwirkungsprofil leiten die Autoren der Studie daher keine klinische Relevanz ab [86]. Studien, die einen direkten Vergleich zielgerichteter Therapien und Immuntherapien untersuchen sind ausstehend. Die Kombination dieser beiden Therapieformen erlaubt in ersten Untersuchungsphasen einen erwartungsvollen Ausblick [87]. Mangels weiterer Evidenz existieren in Europa bis dato allein nationale Empfehlungen in der Therapie des BRAF-mutierten, fortgeschrittenen Melanoms [88].

## 4.2 Beurteilung des Therapieansprechens im malignen Melanom

In 2006 haben Michaelis et al. unter dem Titel „Beurteilung des Therapieansprechens in einer Nach-RECIST-Welt: Von Schwarz und Weiß zu Stufen aus Grau“ über Perspektiven morphologischer Kriterien in der diagnostischen Radiologie berichtet [89]. Diese stellen eine vereinfachte, modellhafte Tumorcharakterisierung dar. Gemäß dem aktuellen Verständnis komplexer Zusammenhänge bedarf es multidimensionaler Modelle und der Validierung spezifischer Biomarker, um eine präzise Therapiesteuerung zu ermöglichen.

Die Beurteilung des Therapieansprechens nimmt im therapeutischen Gesamtkonzept des fortgeschrittenen malignen Melanoms eine relevante Rolle ein. Das Therapieansprechen wird als Surrogat patientenrelevanter Endpunkte, wie dem progressionsfreien Überleben oder dem Überleben, interpretiert und ermöglicht eine Objektivierung der Prognose und Identifikation von *Non-Respondern* [90]. Eine entscheidende Frage lautet: „Wie kann das Therapieansprechen im fortgeschrittenen malignen Melanom ganzheitlich objektiviert werden?“. Eine abschließende Antwort steht aus und bleibt Gegenstand aktueller und künftiger Forschung [2, 89, 91].

Die zielgerichtete Therapie ist mit relevanten Nebenwirkungen assoziiert und bisweilen sehr kostenintensiv, sodass eine nutzenadaptierte Stratifizierung der Patienten vor Indikationsstellung und Therapiebeginn notwendig ist [90]. Durch Differenzierung von BRAF-V600E- und Wildtyp-Mutationen kann der VE1-Antikörper als prädiktiver immunhistochemischer Biomarker vor MAPK-Inhibitor Einsatz verwendet werden [92]. In einer retrospektiven Untersuchung der BRF113220-, COMBI-d- und COMBI-v Studien konnten Long et al. weitere Indikatoren des initialen Therapieansprechens identifizieren. Neben dem BRAF-Status umfassen diese den ECOG-Status, die Anzahl der Metastasen, den Krankheitsfokus und das T-Stadium [82, 93]. In Anbetracht primärer, sekundärer und adaptiver Resistenzmechanismen dienen diese einer initialen Stratifizierung [40, 41, 82]. Um die Dynamik des Therapieansprechens im Verlauf zu erfassen ist eine fortwährende Evaluation notwendig. Seit Entwicklung und Einsatz erster zielgerichteter Medikamente in der Behandlung des fortgeschrittenen malignen Melanoms wurde eine Reihe prädiktiver Biomarker hierzu beschrieben. Neben klinischen Biomarkern wie S100B, LDH oder auch CRP, existiert eine Reihe weiterer nicht-invasiver sogenannter *Liquid Biomarkers*. Hierunter lassen sich Tumorzellen, -metabolite, Nukleinsäuren und zelluläre Vesikel zusammenfassen, die im Blutserum isoliert werden können [82].

Aufgrund der dynamischen Entwicklungen im Bereich der Therapieevaluation wird die Definition neuer Referenzstandards notwendig, um wissenschaftliche Erkenntnisse mittel- und langfristig zu kommunizieren. Ziel der kommenden Jahre wird es sein, ein geeignetes multimodales Konzept, entsprechend dem aktuellen Verständnis der Tumorbilogie des malignen Melanoms, zur Beurteilung der onkologischen Therapie zu entwickeln.

#### **4.2.1 Molekulare PET/CT Bildgebung**

Die hier verwendete Kombinationstherapie führte zu einer signifikanten Abnahme der TTL-R und einer nicht signifikanten Zunahme des MTV. Im Intergruppenvergleich konnten in der Therapiegruppe eine verminderte Expression CD31- und Ki-67-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Während zwischen dem Glukosestoffwechsel und der CD31 Expression eine hoch-signifikante Korrelation festgestellt wurde, war keine signifikante Korrelation zu Ki-67 nachweisbar. Das Ergebnis bestätigt, dass die frühe molekulare Therapieantwort durch die Beurteilung der maximalen  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme durch den Tumor sensitiv erfasst werden kann, durch das MTV hingegen nicht.

Seit Beschreibung durch Otto Warburg ist bekannt, dass maligne Zellen aus bioenergetischen Gründen eine deutlich gesteigerte aerobe Glykolyse aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und dem Zuckerstoffwechsel von Tumoren wurde bereits durch Lawan et al. beschrieben und diskutiert [94, 95]. Der Radiotracer  $^{18}\text{F}$ -FDG wird seit Einführung erster europäischer Konsensus-Empfehlungen in 1999 zum Staging und zur Beurteilung des Therapieansprechens in onkologischen Fragestellungen herangezogen [20, 67]. In einer methodisch vergleichbaren präklinischen Studie führte eine BRAF-Therapie bereits nach dem dritten Therapie-Tag zu einer signifikant reduzierten Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG im Tumor [96]. Im klinischen Rahmen konnte das Therapie Monitoring verschiedener Primärtumoren durch quantitative Parameter der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT bereits nach 2 - 7 Wochen objektiviert werden [97]. In der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des fortgeschrittenen Melanoms unter BRAF-/MEK-Inhibitor- und Immun-Therapie konnten quantitative Parameter der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT als prädiktive Biomarker bestätigt werden [98-100]. Schmitt et al. zeigten hier aber relevante Limitation auf. So konnte nur in Sub-Gruppen mit geringem Therapieansprechen eine signifikante Korrelation zwischen dem  $\text{SUV}_{\text{max}}$  und dem progressionsfreien Überleben nachgewiesen werden, nicht jedoch bei gutem Therapieansprechen [99]. Ob dies eine Translation der präklinischen Ergebnisse relativiert, muss durch weiterführende Studien und den Einsatz patientenrelevanter Endpunkte überprüft werden. Das  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT Mapping

der Heterogenität des Glukose-Stoffwechsels erlaubte eine intra- und interindividuelle Differenzierung fortgeschrittener maligner Melanome und erbrachte unabhängige Biomarker [68]. Pfannenbergs et al. zeigten, dass das onkologische Staging mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT bei 46 % der Melanom-Patienten zu einer Änderung des Therapie-Regimes führte [101]. In der Beurteilung der regionalen Metastasierung des malignen Melanoms ist die  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion jedoch unterlegen, sodass sie invasive Verfahren bei Patienten im Stadium III nicht substituieren kann. Eine Hybrid-Bildgebung mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/MRT unter Einbeziehung diffusionsgewichteter Sequenzen war der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT in Bezug auf die Spezifität sogar unterlegen [102, 103]. Dies zeigt, dass eine multimodale Phänotypisierung nicht unbedingt eine präzisere Diagnostik ermöglicht. Inwieweit die in diesem Versuch untersuchten Modalitäten komplementär zueinander und gegenüber einer einzelnen Bildgebung überlegen sind, wurde nicht untersucht.

#### **4.2.2 Diffusionsgewichtete MRT**

Seit Erstbeschreibung durch Stejskal und Tanner im Jahr 1965 wurden DWI-Sequenzen in präklinischen und klinischen Studien erfolgreich eingesetzt, unter anderem im Bereich des Therapie Monitorings. Es zeigte sich, dass eine erhöhte scheinbare Diffusivität der Regression des Tumolvolumens bereits früh vorausgeht und sich dabei dosisabhängig, Therapie-unabhängig und proportional zur therapeutischen Wirkung verhält [69]. In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Zunahme des ADC unter molekularer Therapie festgestellt werden. Dies ist in der Untersuchung anderer Malignome ebenfalls beschrieben worden und wird als Zeichen einer zellulären und interstitiellen Reaktion auf die Therapie interpretiert [70]. In einem vergleichbaren Melanom-Modell konnten Gaustad et al. den ADC als Biomarker des frühen Therapieansprechens in vivo durch MRT-Perfusionsmessungen sowie ex vivo durch immunhistochemische Marker der Vaskularisierung (CD31) und hypoxischen Fraktion (Pimonidazole) validieren [104]. In der Kontrollgruppe nahm der ADC im Sinne einer zunehmenden Diffusionsrestriktion signifikant ab, was durch eine zunehmende Proliferation und Verdichtung des Tumors erklärt werden kann. Hompland et al. erzielten im Therapie-naiven murinen Modell humaner A-07 und R-18 Melanom-Xenografts vergleichbare Ergebnisse. Sie validierten diese mit präklinischen Endpunkten, wie der Zelldichte, der hypoxischen Fraktion (Pimonidazole), dem interstitiellen Flüssigkeitsdruck und dem metastatischem Status [105]. In der hier vorliegenden Studie konnte eine signifikante und hohe Korrelation zwischen dem ADC und CD31 festgestellt werden, jedoch nicht mit dem Proliferationsmarker Ki-67.

### **4.2.3 Morphologisch-radiologische Biomarker**

Die in der Therapiegruppe festgestellte, nicht signifikante Größenzunahme der Tumoren kann durch die primär zytostatische Wirkung der molekularen Therapie erklärt werden. Ihre Wirkung ist von den Mechanismen zytotoxischer, beziehungsweise zytoreduktiver konventioneller Chemotherapeutika zu unterscheiden, vor allem im frühen Verlauf [9, 17]. Die Wirkung der molekularen Therapie unterscheidet sich ebenfalls von der der Immuntherapie in der Behandlung des malignen Melanoms. Durch pharmakologische Stimulation des Immunsystems kommt es zu einer lokalen Infiltration der Tumorkläsion durch Immunzellen, was zu einer fokalen Größengredienz führt, die als Pseudoprogredienz bezeichnet wird. Unter Immuntherapie sind ebenfalls Verläufe mit verzögerter Regression und teils sehr heterogenem Ansprechen beschrieben worden, die eine rein Morphologie-orientierte Beurteilung der Therapieantwort erschweren [106]. In dieser Studie wäre die nicht signifikante Zunahme des Tumolvolumens als Zeichen der stabilen Erkrankung oder sogar Progredienz interpretiert worden. Die molekulare Wirkung wäre so im kurzfristigen Verlauf unterschätzt worden. Weitere morphologische Eigenschaften, wie Form und Struktur des Tumors, wurden hingegen nicht untersucht.

### ***4.3 Limitationen des Studiendesigns***

#### **4.3.1 Qualifizierung der Biomarker durch immunhistochemische Verfahren**

Im Gegensatz zur nicht-invasiven Bildgebung erfordert die Biopsie eine iatrogene Manipulation am Tumor. Daher wurden erst bei Abschluss der Versuchsreihe Gewebeproben entnommen, um eine interindividuelle Dynamik der immunhistochemischen Parameter zu untersuchen. Retrospektiv kann die intraindividuelle Dynamik der Antigen-Expression somit nur indirekt beurteilt werden. Des Weiteren wird durch die Immunhistochemie nur ein partieller Volumenanteil des Tumors erfasst, sodass es vor allem im mutationsanfälligen und heterogenen Melanom zu Stichprobenfehlern kommen kann. Aufgrund des kurzen Beobachtungsintervalls war eine direkte Korrelation zwischen den Imaging Biomarkern und klinisch relevanten Endpunkten nicht möglich. Die Validierung dieser Biomarker durch Einsatz immunhistochemischer Referenzstandards ist im Rahmen präklinischer Studien etabliert [73]. So haben Cyran et al. ein frühes Therapieansprechen unter Verwendung verschiedener bildgebender Modalitäten durch immunhistochemische Validierung mit Ki-67 und CD31 feststellen können [107-109].

##### ***4.3.1.1 Validierung der Studienergebnisse durch Ki-67***

Ki-67 ist ein Antigen, das während aktiver Phasen des Zellzyklus im Kern der Zelle für kurze Zeit exprimiert wird und als Biomarker der Proliferation und Dormanz im Tumor gilt. In einer vergleichbaren präklinischen Studie konnte in drei sequentiellen Gewebeproben eines A-375-Xenografts an den Tagen 1, 4 und 7 nach Beginn einer BRAF-Inhibition keine Veränderung der Ki-67 Expression festgestellt werden [96]. Ob dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war, lässt sich retrospektiv nicht beantworten. Zwar zeigt sich ein signifikanter Intergruppenunterschied in der Ki-67 Expression, eine signifikante Korrelation mit anderen Parametern wurde nicht gefunden. Rothberg et al. konnten in einer Metaanalyse eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Ki-67 und der Melanom-spezifischen Mortalität feststellen [110]. In einer Phase-II Verlaufsstudie konnten Slingluff et al. durch sequentielle Protokoll-Biopsien zeigen, dass die Therapie des fortgeschrittenen, BRAF-V600E- mutierten Melanoms bereits nach 24 Stunden durch eine verminderte Expression von Ki-67 begleitet wird [111]. In der coBRIM-Studie wurde Ki-67 als Baseline-Prädiktor einer zielgerichteten Therapie im fortgeschrittenen Melanom untersucht. Anhand der Ki-67 Expression ließ sich keine allgemeine Aussage über das Therapieansprechen und andere klinische Endpunkte ableiten

[81]. Die bislang fehlende methodische Standardisierung und ausstehende Validierung eines diagnostischen Schwellenwertes könnten den Einsatz von Ki-67 als Biomarker und Referenzstandard limitieren [81, 112].

#### ***4.3.1.2 Validierung der Studienergebnisse durch CD31***

Das Protein CD31 wird als Antigen auf der Oberfläche früher, aber auch reifer Endothelzellen sowie bestimmter Blutzellen exprimiert und gilt als immunhistochemischer Biomarker der Tumervaskularität [113]. Überschreitet der Tumor eine kritische Größe von 1-2 mm kann weiteres Wachstum nicht mehr alleine durch Diffusion aufrechterhalten werden. Durch Ausbildung eines hypoxischen Milieus kommt es zu einer ausgeprägten tumornahen Angiogenese. Dieser Prozess wird als eines der Kennzeichen von Malignomen verstanden, mit patientenrelevanten Endpunkten in Verbindung gebracht und in der Beurteilung anti-angiogenetischer Medikamente routinemäßig eingesetzt [113, 114]. Die klinische Relevanz anti-angiogenetischer Inhibitoren zur Behandlung des malignen Melanoms ist fraglich [115]. An der hybriden Grenzfläche zwischen humanen Tumor- und murinen Wirtszellen des Xenografts kommt es zu einer komplexen Graft-Host-Interaktion [116]. Beide Gewebe nehmen Teil an der räumlichen Verzahnung und lokalen Angiogenese. Bei Verwendung Spezies-unspezifischer CD31-Antikörper kann diese Interaktion nicht aufgelöst und differenziert werden. Folglich ist nur begrenzt zu beurteilen, ob der anti-angiogenetische Effekt primär durch eine Reaktion der humanen Tumorzellen zu erklären ist. Zur Beantwortung dieser Frage wäre die Verwendung spezies-spezifischer CD31-Antikörper erforderlich.

#### **4.3.2 Standardisierung der Versuche und Segmentierung der Tumoren**

Aufgrund der unterschiedlich räumlichen Auflösung der bildgebenden Modalitäten ergeben sich abweichende VOIs. Dies wird beim Vergleich der T2-gewichteten MRT- und der PET/CT Rekonstruktionen deutlich. Bei scheinbar marginaler absoluter Abweichung sind relative Unterschiede signifikant. Eine Demarkierung des Tumors gegenüber umliegendem, teilweise ähnlichem Gewebe war durch die MRT nicht immer deutlich auflösbar. Dies gilt vor allem für Sequenzen der DWI. Eine direkte Hybrid-Bildgebung in einem kombinierten PET/MRT-Scanner hätte das Versuchsprotokoll und die Bestimmung einheitlicher VOIs methodisch optimieren können.

### **4.3.3 Morphologische Volumetrie des Tumors**

Die eindimensionale Vermessung eines Tumors wird als Surrogat des Tumolvolumens und des Therapieansprechens verstanden [117]. Gemäß aktuellen Kriterien wird eine Längenzunahme um mehr als 20 % über 12 Wochen als Krankheitsprogress definiert. Dies entspricht einer Volumenzunahme von mindestens 72,8 % ( $1,2^3 - 1$ ). Im umgekehrten Fall wird eine Längenabnahme um mehr als 30 % oder eine Volumenreduktion auf weniger als 34,3 % ( $0,7^3$ ) der Ursprungsgröße als partielles Therapieansprechen gewertet. Eine Dynamik zwischen -34,4 % und +72,8 % der ursprünglichen Tumorlast wird somit als stabile Erkrankung interpretiert [11]. Im Rahmen kurzer Untersuchungsintervalle und der Beurteilung molekularer Therapieformen, wie in dieser Studie, sind volumen-orientierte Kriterien zur Beurteilung zielgerichteter Therapien nicht validiert. Weitere potentielle morphologische Biomarker wurden nicht untersucht.

### **4.3.4 Beurteilung der molekularen Inhibitor-Kombinationstherapie**

In dieser Studie wurde eine Kombinationstherapie aus BRAF- und CDK4/6-Inhibitoren zur Behandlung des BRAF-mutierten Melanoms eingesetzt. Bei dem vorliegenden Studiendesign kann retrospektiv kein direkter Vergleich zu anderen Formen der Mono- oder Kombinationstherapie abgeleitet werden. Die Ausbildung von Resistenzen ist wesentlicher Grund für ein Therapieversagen. Inwieweit die hier untersuchte Kombinationstherapie zur Induktion von Resistenzen im Verlauf führt bleibt unbeantwortet. Auch ob die hier untersuchte multiparametrische Bildgebung eine Resistenzentwicklung frühzeitig und zuverlässig detektieren kann, wird durch diese Arbeit nicht erfasst. Für die Beurteilung der Wirksamkeit der von uns untersuchten Kombinationstherapie wäre eine Erweiterung des Versuchsprotokolls mit weiteren Therapiearmen erforderlich gewesen.

## 5 Zusammenfassung

Quantitative Parameter der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT und der diffusionsgewichteten MRT ergänzen morphologische *Imaging*-Biomarker um funktionelle und molekulare Aspekte der Tumorbiologie. Sie dienen der weiteren Präzisierung des onkologischen Phänotyps und könnten auch im fortgeschrittenen malignen Melanom als nicht-invasive Biomarker an Bedeutung gewinnen. Hypothese der Arbeit ist, dass das frühe Therapieansprechen bei Einsatz zielgerichteter molekularer Therapieformen durch eben diese funktionellen und molekularen Formen der Bildgebung bereits im frühen Intervall beurteilt werden kann.

Vor Einführung zielgerichteter Therapieansätze lag das mediane Überleben bei Diagnose eines fortgeschrittenen malignen Melanoms bei 9 Monaten, das Therapieansprechen unter 9 %. Die Hälfte aller metastasierten kutanen Melanome weisen eine BRAF-V600-Mutation auf, die zu einer Überaktivierung des MAPK-Signalweges führt. Durch gezielte Inhibition dieses Signalweges mit molekularen Therapieformen konnte eine signifikante Verbesserung patientenrelevanter Endpunkte erreicht werden.

In einem Xenograft-Modell aus BALB/c Nacktmäusen und humanen Melanomzellen (A-375) wurden  $n = 21$  Tiere randomisiert. Die Therapiegruppe erhielt über 6 Tage Dabrafenib und Ribociclib, die Kontrollgruppe ein volumenäquivalentes Placebo. Die Tiere wurden vor und nach Abschluss der Therapie durch eine multimodale Bildgebung aus  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT sowie T2- und diffusionsgewichteter MRT untersucht. Die *Tumor-to-Liver-Ratio* (TTL-R) und das metabolische Tumolvolumen (MTV) wurden als Maß des Glukosestoffwechsels bestimmt. Der ADC wurde zur Objektivierung der Diffusivität bestimmt. Das Tumolvolumen wurde in T2-Sequenzen der MRT quantifiziert. Nach Abschluss der letzten Bildgebung wurden die Tumoren ex vivo auf ihre mikrovaskuläre Dichte (CD31) und Zellproliferation (Ki-67) untersucht.

Die maximale Glukoseaufnahme des Tumors wurde durch die Therapie signifikant reduziert, während in der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung festgestellt wurde. Die Diffusivität nahm nach Therapie signifikant zu, in der Kontrollgruppe hingegen ab. Eine signifikante Größenzunahme wurde nur in der Kontrollgruppe beobachtet. Die Immunhistochemie zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression mikrovaskulärer und proliferativer Marker im Intergruppenvergleich.

Die in dieser Studie erhobenen funktionellen und molekularen Parameter erlaubten die Erfassung der frühen anti-angiogenetischen und anti-proliferativen Effekte einer molekularen BRAF- und CDK4/6-Inhibitor-Kombinationstherapie im präklinischen Modell eines humanen

Melanoms und können als *Imaging*-Biomarker des frühen Therapieansprechens bestätigt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Primärdaten

Nummer	Gruppe*	ADC <sub>Baseline</sub> (mm <sup>2</sup> /s/1000)	ADC <sub>Follow-Up</sub> (mm <sup>2</sup> /s/1000)	Δ ADC (mm <sup>2</sup> /s/1000)	Volumen <sub>Baseline</sub> (μL)	Volumen <sub>Follow-Up</sub> (μL)	Δ Volumen (μL)
1	T	0.84	0.84	0.00	163	166	3
2	T	0.88	1.16	0.28	26	34	8
3	T	0.74	0.72	-0.02	19	100	81
4	T	0.77	0.86	0.09	189	256	67
5	T	0.87	0.82	-0.05	89	281	192
6	T	0.62	0.84	0.22	155	108	-47
7	T	0.79	1.07	0.28	67	48	-19
8	T	0.71	0.87	0.15	39	51	12
9	T	0.66	0.83	0.17	233	264	31
10	T	0.73	0.81	0.07	62	123	61
11	T	0.76	1.07	0.31	49	32	-17
12	T	0.97	0.85	-0.12	46	108	62
<b>Durchschnitt ± SD†</b>	T	0.78 ± 0.10	0.89 ± 0.13	0.12 ± 0.14	95 ± 71	131 ± 91	36 ± 63
13	K	0.85	0.77	-0.08	119	356	237
14	K	0.70	0.63	-0.07	321	778	457
15	K	0.86	0.69	-0.07	103	380	277
16	K	0.96	0.76	-0.20	82	213	131
17	K	0.78	0.63	-0.15	138	371	233
18	K	0.73	0.61	-0.12	109	293	184
19	K	0.87	0.71	-0.16	73	302	229
20	K	0.61	0.61	0.00	233	541	308
21	K	0.79	0.69	-0.10	32	204	172
<b>Durchschnitt ± SD†</b>	K	0.79 ± 0.11	0.68 ± 0.06	-0.12 ± 0.06	134 ± 89	382 ± 179	248 ± 95

\*: T = Therapie-Gruppe,  
K = Kontroll-Gruppe;  
†: SD = Standard Abweichung

Tabelle 3: Individuelle Ergebnisse der MRT-Auswertung

Nummer	Gruppe*	TTL <sub>Baseline</sub>	TTL <sub>Follow-Up</sub>	Δ TTL	Volumen <sub>Baseline</sub> (μL)	Volumen <sub>Follow-up</sub> (μL)	Δ Volumen (μL)
1	T	5.6	4.8	-0.8	296	311	15
2	T	4.8	3.1	-1.7	87	50	-37
3	T	5.9	5.3	-0.6	56	163	107
4	T	3.7	2.7	-1.0	156	417	261
5	T	3.9	3.9	0.0	143	434	291
6	T	4.6	3.0	-1.6	231	185	-46
7	T	4.6	2.9	-1.7	113	78	-35
8	T	3.7	2.4	-1.3	163	118	-45
9	T	3.1	2.5	-0.6	332	392	60
10	T	3.6	2.5	-1.1	171	162	-9
11	T	4.1	2.9	-1.2	120	81	-39
12	T	2.6	2.3	-0.3	66	148	82
<b>Durchschnitt ± SD†</b>	T	<b>4.0 ± 0.8</b>	<b>3.0 ± 0.72</b>	<b>-1.0 ± 0.53</b>	<b>161 ± 82</b>	<b>212 ± 134</b>	<b>51 ± 118</b>
13	K	4.3	4.1	-0.2	97	344	247
14	K	3.1	5.1	2.0	519	1192	673
15	K	5.6	5.5	-0.1	213	616	403
16	K	2.9	4.0	2.1	140	329	189
17	K	4.0	4.1	0.1	223	598	375
18	K	3.3	5.3	2.0	165	511	346
19	K	3.5	5.5	2.0	116	421	305
20	K	2.7	4.7	2.0	293	867	474
21	K	3.8	2.7	-1.1	96	283	187
<b>Durchschnitt ± SD†</b>	K	<b>3.7 ± 0.9</b>	<b>4.6 ± 0.9</b>	<b>0.9 ± 1.21</b>	<b>218 ± 138</b>	<b>574 ± 278</b>	<b>356 ± 153</b>

\*: T = Therapie-Gruppe,  
K = Kontroll-Gruppe;  
†: SD = Standard Abweichung

Tabelle 4: Individuelle Ergebnisse der <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT-Auswertung

Nummer	Gruppe <sup>†</sup>	Ki-67	CD31
1	T	4433	166
2	T	5831	83
3	T	3189	212
4	T	2649	129
5	T	2832	222
6	T	3820	182
7	T	4033	79
8	T	2912	105
9	T	2227	100
10	T	4306	151
11	T	4210	179
12	T	4177	151
<b>Durchschnitt ± SD<sup>†</sup></b>	T	<b>3718 ± 998</b>	<b>147 ± 48</b>
13	K	6801	271
14	K	6349	336
15	K	6489	447
16	K	3799	191
17	K	4562	307
18	K	4582	358
19	K	3379	261
20	K	5718	284
21	K	6824	132
<b>Durchschnitt ± SD<sup>†</sup></b>	K	<b>5389 ± 1332</b>	<b>287 ± 92</b>

†: T = Therapie-Gruppe,  
K = Kontroll-Gruppe;  
†: SD = Standard Abweichung

Tabelle 5: Individuelle Ergebnisse der Immunhistochemie

## 6.2 Literaturverzeichnis

1. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. 69(3): p. 89-95.
2. O'Connor, J.P., et al., *Imaging biomarker roadmap for cancer studies*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. 14(3): p. 169-186.
3. Poste, G., *Bring on the biomarkers*. Nature, 2011. 469(7329): p. 156-7.
4. Goossens, N., et al., *Cancer biomarker discovery and validation*. Transl Cancer Res, 2015. 4(3): p. 256-269.
5. Luna, A., et al., *Functional Imaging in Oncology: Clinical Applications*. 2014: Springer Berlin Heidelberg.
6. Kim, C. and V. Prasad, *Cancer Drugs Approved on the Basis of a Surrogate End Point and Subsequent Overall Survival: An Analysis of 5 Years of US Food and Drug Administration Approvals*. JAMA Intern Med, 2015. 175(12): p. 1992-4.
7. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Curr Opin HIV AIDS, 2010. 5(6): p. 463-6.
8. Padhani, A.R. and K.A. Miles, *Multiparametric imaging of tumor response to therapy*. Radiology, 2010. 256(2): p. 348-64.
9. Desar, I.M., et al., *Beyond RECIST: molecular and functional imaging techniques for evaluation of response to targeted therapy*. Cancer Treat Rev, 2009. 35(4): p. 309-21.
10. Miller, A.B., et al., *Reporting results of cancer treatment*. Cancer, 1981. 47(1): p. 207-14.
11. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. Eur J Cancer, 2009. 45(2): p. 228-47.
12. Savina, M., et al., *Meta-analyses evaluating surrogate endpoints for overall survival in cancer randomized trials: A critical review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2018. 123: p. 21-41.
13. Rudin, M., *Imaging readouts as biomarkers or surrogate parameters for the assessment of therapeutic interventions*. Eur Radiol, 2007. 17(10): p. 2441-57.
14. Gillies, R.J., P.E. Kinahan, and H. Hricak, *Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data*. Radiology, 2016. 278(2): p. 563-77.
15. Schwartz, L.H., et al., *RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee*. Eur J Cancer, 2016. 62: p. 132-7.
16. Spiro, J., D. Maintz, and T. Persigehl, *[Response criteria for malignant melanoma: RECIST and irRC]*. Radiologe, 2015. 55(2): p. 127-35.

17. Seymour, L., et al., *iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics*. *Lancet Oncol*, 2017. 18(3): p. e143-e152.
18. Teng, F.F., et al., *New strategy for monitoring targeted therapy: molecular imaging*. *Int J Nanomedicine*, 2013. 8: p. 3703-13.
19. McNitt-Gray, M.F., et al., *Determining the Variability of Lesion Size Measurements from CT Patient Data Sets Acquired under "No Change" Conditions*. *Transl Oncol*, 2015. 8(1): p. 55-64.
20. Wahl, R.L., et al., *From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors*. *J Nucl Med*, 2009. 50 Suppl 1: p. 122S-50S.
21. Lomas, A., J. Leonardi-Bee, and F. Bath-Hextall, *A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer*. *Br J Dermatol*, 2012. 166(5): p. 1069-80.
22. Teramoto, Y., et al., *Acral lentiginous melanoma: a skin cancer with unfavourable prognostic features. A study of the German central malignant melanoma registry (CMMR) in 2050 patients*. *Br J Dermatol*, 2018. 178(2): p. 443-451.
23. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.0*, in *AWMF Registernummer: 032/024OL*. 2018. (Zugriff: 14.05.2019) [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-024OL\\_1\\_S3\\_Melanom-Diagnostik-Therapie-Nachsorge\\_2018-07\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-024OL_1_S3_Melanom-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-07_01.pdf)
24. American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2018*. 2018: Atlanta. p. 23-24. (Zugriff 14.05.2019) <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>
25. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.v. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017. 11. Ausgabe.
26. Hanly, P., I. Soerjomataram, and L. Sharp, *Measuring the societal burden of cancer: the cost of lost productivity due to premature cancer-related mortality in Europe*. *Int J Cancer*, 2015. 136(4): p. E136-45.
27. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. *Eur J Cancer*, 2005. 41(1): p. 28-44.
28. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. *Eur J Cancer*, 2005. 41(1): p. 45-60.
29. Garbe, C., *[The sun and malignant melanoma]*. *Hautarzt*, 1992. 43(5): p. 251-7.
30. Radespiel-Troger, M., et al., *Outdoor work and skin cancer incidence: a registry-based study in Bavaria*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2009. 82(3): p. 357-63.
31. Merrill, S.J., et al., *Exponentially increasing incidences of cutaneous malignant melanoma in Europe correlate with low personal annual UV doses and suggests 2 major risk factors*. *Dermatoendocrinol*, 2015. 7(1): p. e1004018.

32. Grob, J.J., et al., *Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma*. *Cancer*, 1990. 66(2): p. 387-95.
33. Tsao, H., et al., *The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate*. *Arch Dermatol*, 2003. 139(3): p. 282-8.
34. Goldstein, A.M. and M.A. Tucker, *Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective*. *Arch Dermatol*, 2001. 137(11): p. 1493-6.
35. Potrony, M., et al., *Update in genetic susceptibility in melanoma*. *Ann Transl Med*, 2015. 3(15): p. 210.
36. Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal transduction in cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015. 5(4).
37. Cancer Genome Atlas, N., *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma*. *Cell*, 2015. 161(7): p. 1681-96.
38. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. *Lancet*, 2012. 380(9839): p. 358-65.
39. Manzano, J.L., et al., *Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma*. *Ann Transl Med*, 2016. 4(12): p. 237.
40. Amaral, T., et al., *MAPK pathway in melanoma part II-secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition*. *Eur J Cancer*, 2017. 73: p. 93-101.
41. Amaral, T., et al., *The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition*. *Eur J Cancer*, 2017. 73: p. 85-92.
42. Tsao, H., et al., *Melanoma: from mutations to medicine*. *Genes Dev*, 2012. 26(11): p. 1131-55.
43. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. *Cancer Res*, 1969. 29(3): p. 705-27.
44. Garbe, C., *Management Des Melanoms*. 2006: Springer Berlin Heidelberg.
45. Gershenwald, J.E., et al., *Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. *CA Cancer J Clin*, 2017. 67(6): p. 472-492.
46. Cymerman, R.M., et al., *De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival*. *J Natl Cancer Inst*, 2016. 108(10).
47. Zbytek, B., et al., *Current concepts of metastasis in melanoma*. *Expert Rev Dermatol*, 2008. 3(5): p. 569-585.
48. Grob, J.J., et al., *Eighth American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma classification: Let us reconsider stage III*. *Eur J Cancer*, 2018. 91: p. 168-170.

49. Harrington, E., et al., *Diagnosing malignant melanoma in ambulatory care: a systematic review of clinical prediction rules*. *BMJ Open*, 2017. 7(3): p. e014096.
50. Morton, D.L., et al., *Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. 370(7): p. 599-609.
51. Hofmann, U., et al., *Primary staging and follow-up in melanoma patients--monocenter evaluation of methods, costs and patient survival*. *Br J Cancer*, 2002. 87(2): p. 151-7.
52. Xing, Y., et al., *Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. 103(2): p. 129-42.
53. Balch, C.M., et al., *Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(14): p. 2452-9.
54. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(36): p. 6199-206.
55. Khattak, M., et al., *Targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma: an evolving paradigm*. *Ther Adv Med Oncol*, 2013. 5(2): p. 105-18.
56. Garbe, C., et al., *Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy*. *J Clin Oncol*, 2003. 21(3): p. 520-9.
57. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(6): p. 473-80.
58. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. *Cancer Res*, 2008. 68(21): p. 8643-53.
59. Rowinsky, E.K., *Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer*. *Oncologist*, 2003. 8 Suppl 3: p. 5-17.
60. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. *Curr Drug Discov Technol*, 2015. 12(1): p. 3-20.
61. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.
62. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3291-310.
63. Welsh, S.J. and P.G. Corrie, *Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma*. *Ther Adv Med Oncol*, 2015. 7(2): p. 122-36.
64. Hamilton, E. and J.R. Infante, *Targeting CDK4/6 in patients with cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2016. 45: p. 129-38.
65. Dickson, M.A. and G.K. Schwartz, *Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy*. *Curr Oncol*, 2009. 16(2): p. 36-43.

66. Sherr, C.J., D. Beach, and G.I. Shapiro, *Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy*. *Cancer Discov*, 2016. 6(4): p. 353-67.
67. Shankar, L.K., et al., *Consensus recommendations for the use of 18F-FDG PET as an indicator of therapeutic response in patients in National Cancer Institute Trials*. *J Nucl Med*, 2006. 47(6): p. 1059-66.
68. de Heer, E.C., et al., *Mapping heterogeneity in glucose uptake in metastatic melanoma using quantitative*. *EJNMMI Res*, 2018. 8(1): p. 101.
69. Galban, C.J., et al., *Diffusion MRI in early cancer therapeutic response assessment*. *NMR Biomed*, 2017. 30(3).
70. Padhani, A.R., et al., *Therapy monitoring of skeletal metastases with whole-body diffusion MRI*. *J Magn Reson Imaging*, 2014. 39(5): p. 1049-78.
71. Miele, E., et al., *Positron Emission Tomography (PET) radiotracers in oncology--utility of 18F-Fluoro-deoxy-glucose (FDG)-PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC)*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008. 27: p. 52.
72. Le Bihan, D., *Apparent diffusion coefficient and beyond: what diffusion MR imaging can tell us about tissue structure*. *Radiology*, 2013. 268(2): p. 318-22.
73. Padhani, A.R., et al., *Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations*. *Neoplasia*, 2009. 11(2): p. 102-25.
74. Ingrisich, M. and S. Sourbron, *Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT: a primer*. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2013. 40(3): p. 281-300.
75. Maio, M., et al., *Five-year survival rates for treatment-naive patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2015. 33(10): p. 1191-6.
76. Chapman, P.B., et al., *Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 1999. 17(9): p. 2745-51.
77. Hersh, E.M., et al., *A randomized, controlled phase III trial of nab-Paclitaxel versus dacarbazine in chemotherapy-naive patients with metastatic melanoma*. *Ann Oncol*, 2015. 26(11): p. 2267-74.
78. Jiang, G., et al., *Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis*. *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e111920.
79. Ugurel, S., et al., *Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies*. *Eur J Cancer*, 2016. 53: p. 125-34.
80. Long, G.V., et al., *Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 5694.

81. Ascierto, P.A., et al., *Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2016. 17(9): p. 1248-60.
82. Lim, S.Y., et al., *Liquid biomarkers in melanoma: detection and discovery*. *Mol Cancer*, 2018. 17(1): p. 8.
83. Daud, A., et al., *Indirect treatment comparison of dabrafenib plus trametinib versus vemurafenib plus cobimetinib in previously untreated metastatic melanoma patients*. *J Hematol Oncol*, 2017. 10(1): p. 3.
84. Davies, M.A., et al., *Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600)-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2017. 18(7): p. 863-873.
85. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. 371(20): p. 1867-76.
86. Ascierto, P.A., et al., *A phase Ib/II dose-escalation study evaluating triple combination therapy with a BRAF (encorafenib), MEK (binimetinib), and CDK 4/6 (ribociclib) inhibitor in patients (Pts) with BRAF V600-mutant solid tumors and melanoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. 35(15): p. 9518-9518.
87. Mackiewicz, J. and A. Mackiewicz, *BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients*. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2018. 22(1A): p. 68-72.
88. Harries, M., et al., *Treatment patterns and outcomes of Stage IIIB/IIIC melanoma in France, Germany and the UK: A retrospective and prospective observational study (MELABIS)*. *Int J Clin Pract*, 2017. 71(5).
89. Michaelis, L.C. and M.J. Ratain, *Measuring response in a post-RECIST world: from black and white to shades of grey*. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(5): p. 409-14.
90. Amin, S. and O.F. Bathe, *Response biomarkers: re-envisioning the approach to tailoring drug therapy for cancer*. *BMC Cancer*, 2016. 16(1): p. 850.
91. Yu, R.X. and E. Holmgren, *Endpoints for agents that slow tumor growth*. *Contemp Clin Trials*, 2007. 28(1): p. 18-24.
92. Capper, D., et al., *Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody*. *Acta Neuropathol*, 2011. 122(1): p. 11-9.
93. Long, G.V., et al., *Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials*. *Lancet Oncol*, 2016. 17(12): p. 1743-1754.
94. Lawan, A. and A.M. Bennett, *Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2017. 28(12): p. 868-878.
95. Gillies, R.J., I. Robey, and R.A. Gatenby, *Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers*. *J Nucl Med*, 2008. 49 Suppl 2: p. 24S-42S.

96. Geven, E.J., et al., *Therapy response monitoring of the early effects of a new BRAF inhibitor on melanoma xenograft in mice: evaluation of (18) F-FDG-PET and (18) F-FLT-PET*. *Contrast Media Mol Imaging*, 2015. 10(3): p. 203-10.
97. Mountz, J.M., et al., *Early cancer therapy response assessment by quantitative F-18 FDG PET/CT*. *Clinical Cancer Research*, 2010. 16(19 Supplement): p. A13-A13.
98. Sachpekidis, C., et al., *The role of interim (18)F-FDG PET/CT in prediction of response to ipilimumab treatment in metastatic melanoma*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018. 45(8): p. 1289-1296.
99. Schmitt, R.J., et al., *Correlation between early 18F-FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma*. *Nucl Med Commun*, 2016. 37(2): p. 122-8.
100. Sachpekidis, C., et al., *18F-FDG PET/CT longitudinal studies in patients with advanced metastatic melanoma for response evaluation of combination treatment with vemurafenib and ipilimumab*. *Melanoma Res*, 2019. 29(2): p. 178-186.
101. Pfannenber, C., et al., *Practice-based evidence for the clinical benefit of PET/CT-results of the first oncologic PET/CT registry in Germany*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019. 46(1): p. 54-64.
102. Schaarschmidt, B.M., et al., *Can integrated 18F-FDG PET/MR replace sentinel lymph node resection in malignant melanoma?* *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018.
103. Perng, P., C. Marcus, and R.M. Subramaniam, *(18)F-FDG PET/CT and Melanoma: Staging, Immune Modulation and Mutation-Targeted Therapy Assessment, and Prognosis*. *AJR Am J Roentgenol*, 2015. 205(2): p. 259-70.
104. Gaustad, J.V., et al., *Magnetic resonance imaging identifies early effects of sunitinib treatment in human melanoma xenografts*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013. 32: p. 93.
105. Hompland, T., et al., *DW-MRI in assessment of the hypoxic fraction, interstitial fluid pressure, and metastatic propensity of melanoma xenografts*. *BMC Cancer*, 2014. 14: p. 92.
106. Chiou, V.L. and M. Burotto, *Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors*. *J Clin Oncol*, 2015. 33(31): p. 3541-3.
107. Eschbach, R.S., 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(1): p. e0169323.
108. Kazmierczak, P.M., et al., *alpha<sub>v</sub>ss3-Integrin-Targeted Magnetic Resonance Imaging for the Assessment of Early Antiangiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts*. *Invest Radiol*, 2016. 51(11): p. 746-755.
109. Kazmierczak, P.M., et al., *68Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of alpha<sub>v</sub>ss3-Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer*. *PLoS One*, 2016. 11(12): p. e0168248.

110. Gould Rothberg, B.E., M.B. Bracken, and D.L. Rimm, *Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2009. 101(7): p. 452-74.
111. Slingluff, C.L., Jr., et al., *Clinical activity and safety of combination therapy with temsirolimus and bevacizumab for advanced melanoma: a phase II trial (CTEP 7190/Mel47)*. Clin Cancer Res, 2013. 19(13): p. 3611-20.
112. Ladstein, R.G., et al., *Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma*. BMC Cancer, 2010. 10: p. 140.
113. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. 407(6801): p. 249-57.
114. Deshpande, N., et al., *Tumor angiogenic marker expression levels during tumor growth: longitudinal assessment with molecularly targeted microbubbles and US imaging*. Radiology, 2011. 258(3): p. 804-11.
115. Dunleavey, J.M., et al., *Vascular channels formed by subpopulations of PECAM1+ melanoma cells*. Nat Commun, 2014. 5: p. 5200.
116. Lehr, H.A., et al., *Microvascular endothelium of human tumor xenografts expresses mouse (= host) CD31*. Int J Microcirc Clin Exp, 1997. 17(3): p. 138-42.
117. McNitt-Gray, M.F., et al., *Computed tomography assessment of response to therapy: tumor volume change measurement, truth data, and error*. Transl Oncol, 2009. 2(4): p. 216-22.

### **6.3 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. C. Cyran, der mir die Promotion in seiner Arbeitsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Radiologie der LMU München ermöglicht und mich an die akademische Radiologie herangeführt hat. Auch Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser und Herrn Professor Dr. med. J. Ricke will ich für die besonderen Rahmenbedingungen an der Klinik danken.

Gleichermaßen möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. R. Eschbach sowie Herrn Dr. med. P. Kazmierczak bedanken. Beide haben mich stets geduldig unterstützt, beraten und gefördert.

Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Allen voran Frau Dr. rer. nat. H. Hirner-Eppeneder, die mit ihrer Expertise ganz besonders zum Gelingen beigetragen hat und G. Keinrath auf den stets Verlass war.

Ebenfalls gilt Herrn Professor Dr. med. P. Bartenstein und seinen Kollegen der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Dank, die die molekulare Bildgebung in Ihrem Forschungslabor ermöglicht und begleitet haben. Hierbei sind besonders Herr Dr. A. Todica, Frau J. Olivier und Frau R. Oos hervorzuheben.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie für den außerordentlichen Beistand und die uneingeschränkte Unterstützung danken, die sie mir seit jeher zukommen lässt. Ohne sie wäre mein Werdegang in dieser Art und Weise nicht möglich.

## **6.4 Eidesstattliche Erklärung**

Heimer, Maurice Maximilian

*Name, Vorname*

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

*<sup>18</sup>F-FDG-PET/CT und diffusionsgewichtete MRT zum Monitoring einer BRAF- und CDK4/6-Inhibitor Kombinationstherapie im murinen Modell eines humanen Melanoms*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 17.02.2020

Maurice Maximilian Heimer

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand