
Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie

Klinikum der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Jens Ricke

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung mit MRT-Korrelation zum
Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen
Melanommodell der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Georg Keinrath

aus

Klagenfurt am Wörthersee

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Lauber
Prof. Dr. Matthias Volkenandt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Philipp Kazmierczak

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Malignes Melanom	6
1.1.1. Epidemiologie	6
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren	9
1.1.3. Diagnostik und Therapie.....	11
1.1.4. Prognose und Nachsorge	14
1.2. BRAF-/MEK-Inhibitor-Therapie	16
1.3. Molekulare Bildgebung zum Therapiemonitoring	20
1.4. Optoakustische Bildgebung	23
1.5. $\alpha_v\beta_3$-Integrin	25
1.6. Hypothese	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Tumormodell und Versuchsprotokoll	28
2.1.1. Tumormodell	28
2.1.2. Inokulation und Wachstumsphase	30
2.1.3. Versuchsaufbau.....	31
2.1.4. Therapieprotokoll.....	32
2.2. Bildgebung	33
2.2.1. Optoakustische Bildgebung	33
2.2.2. Magnetresonanztomographie	36
2.2.3. Planare Ganztier-Kryofluoreszenz-Bildgebung	37
2.2.4. In-vivo-Blocking-Versuche.....	38

2.3. Histologie und Immunhistochemie	38
2.3.1. β_3 -Integrin	39
2.3.2. CD31	41
2.3.3. Ki-67	41
2.4. Statistik	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Bildgebung	44
3.1.1. Optoakustische Bildgebung	44
3.1.2. Morphologische Beurteilung des Therapieansprechens	49
3.2. Immunhistochemie	51
3.2.1. β_3 -Integrin	53
3.2.2. CD31	54
3.2.3. Ki-67	54
4. Diskussion	55
4.1. $\alpha_v\beta_3$-Integrin-spezifische Bildgebung zum Therapiemonitoring	56
4.2. Optoakustische Tumorbildgebung und klinische Kontrastmittelanwendung	60
4.3. Klinische Perspektive im multimodalen Vergleich.....	63
5. Limitationen	65
6. Conclusio	67
7. Literaturverzeichnis.....	68
8. Abbildungsverzeichnis	79
8. Tabellenverzeichnis	81
9. Abkürzungsverzeichnis	82

10. Danksagung.....	84
11. Eidesstattliche Versicherung	85

1. Einleitung

1.1. Malignes Melanom

1.1.1. Epidemiologie

Das maligne Melanom ist mit einem Anteil von 4,8 % bei den Frauen die vierthäufigste und 4,7 % bei den Männern die fünfthäufigste aller Krebsneuerkrankungen exklusive dem nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland. Der prozentuale Anteil an allen Krebssterbefällen in Deutschland beträgt 1,2 % bei den Frauen und 1,4 % bei den Männern. Wie vom Robert Koch-Institut im Jahr 2019 veröffentlicht, zeigt Abbildung (Abb.) 1 die Verteilung der häufigsten Krebsneuerkrankungen und Abb. 2 deren Anteil an den Krebssterbefällen für das Jahr 2016 in Deutschland für das jeweilige Geschlecht [1].

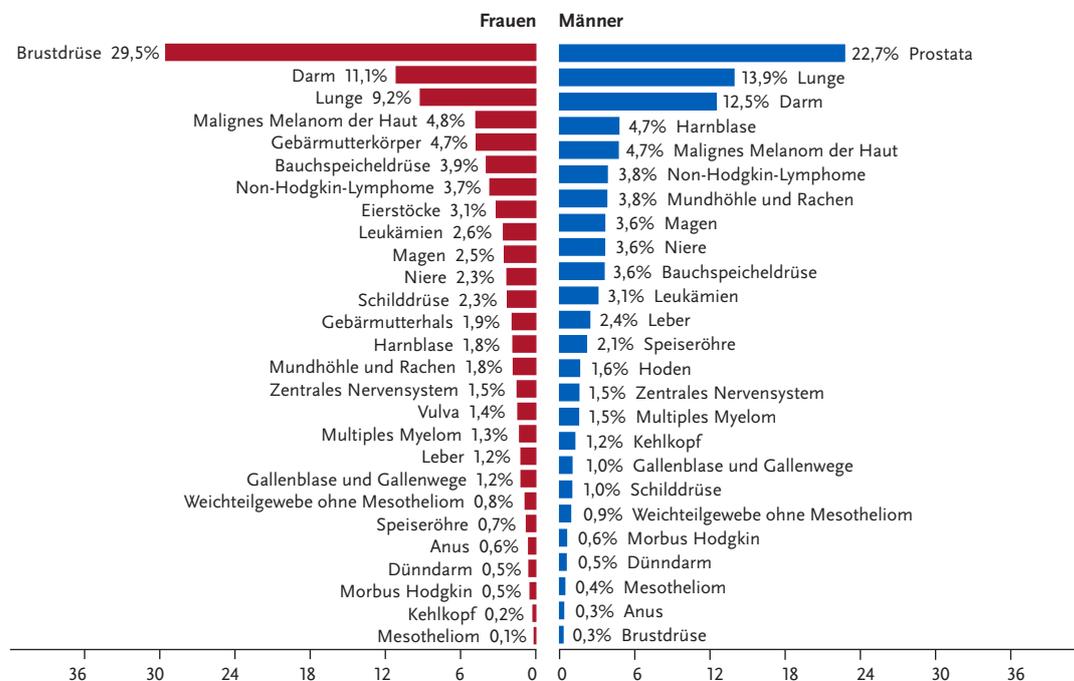


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen an allen malignen Neuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2016 (exklusive nicht-melanotischen Hautkrebs); aus [1], 2019 (mit Genehmigung durch den Herausgeber).

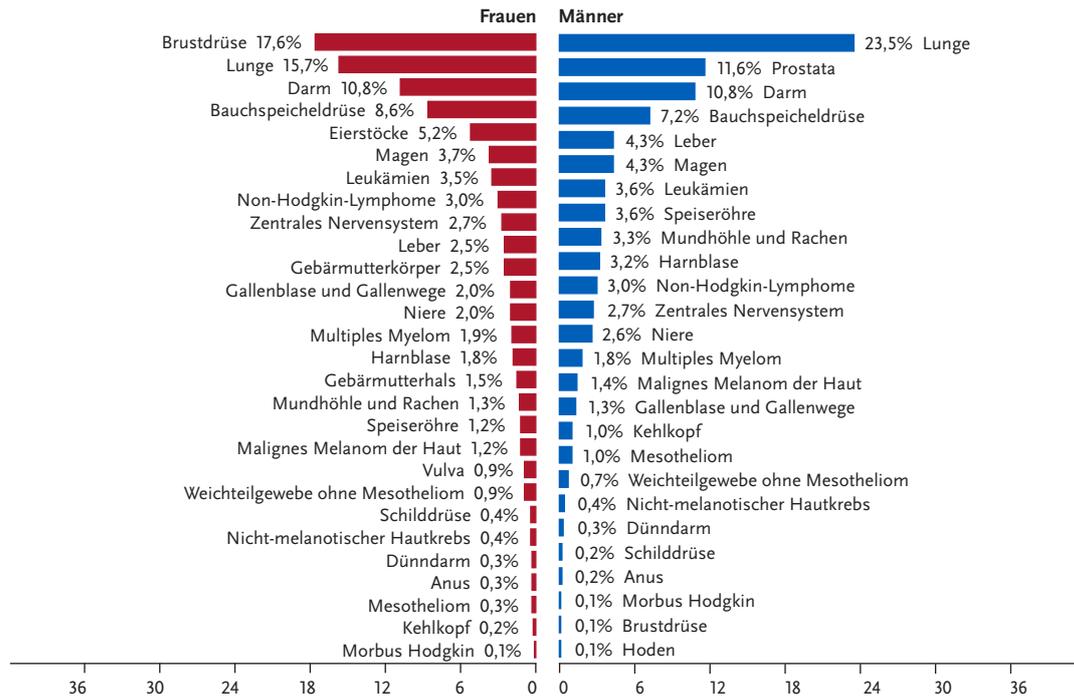


Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen an allen krebbedingten Sterbefällen in Deutschland für das Jahr 2016; aus [1], 2019 (mit Genehmigung durch den Herausgeber).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim malignen Melanom beträgt 93 % bei Frauen und 91 % bei Männern und ist damit im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen als günstig einzustufen. Bei Diagnosestellung befinden sich etwa zwei Drittel der Fälle in einem frühen Tumorstadium (T1). Histopathologisch differenziert handelt es sich überwiegend um das superfiziell spreitende Melanom, welches mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist [1, 2]. Seit dem Jahr 1970 ist bezüglich der Inzidenz des malignen Melanoms in Deutschland ein Anstieg auf mehr als das Fünffache zu beobachten, die Sterberaten sind währenddessen nur bei den Männer leicht gestiegen. Der sprunghafte Anstieg der Erkrankungsraten im Jahr 2008 ist wahrscheinlich auf die Einführung des Hautkrebsscreenings als Leistung der gesetzlichen Krankenkasse in Deutschland zurückzuführen und basiert größtenteils auf den Diagnosen von frühen

Erkrankungsstadien [1, 2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 60 Jahren und für Männer bei 67 Jahren [1].

Analog zu Deutschland sind die altersstandardisierten Inzidenzraten auch in anderen Gebieten wie den USA und Skandinavien seit den 1970er Jahren langfristig betrachtet gestiegen. Dies ist am ehesten auf die veränderten Freizeitgewohnheiten der Bevölkerung zurückzuführen. Hier sind die Zunahme von Aktivitäten im Freien, Sonnenbaden und Reisen in äquatornahe Gebiete zu nennen. Im EU-weiten Vergleich liegt die altersstandardisierte Inzidenz des malignen Melanoms in Deutschland deutlich über dem Durchschnitt. Die Sterblichkeit liegt dabei im Mittelfeld. In der Europäischen Union zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle mit der höchsten Sterblichkeit in Skandinavien, den Niederlanden und Slowenien. Dementsprechend zeigen sich in den meisten Staaten Südeuropas wesentlich niedrigere Mortalitäts- und Inzidenzraten. Global betrachtet ist die Inzidenz und Mortalität in Ozeanien am höchsten und im Anschluss darauf in Nordamerika sowie in Europa. In Asien sowie in Afrika kommt es indessen nur sehr selten zum Auftreten von Fällen. Ursächlich hierfür sind zum einen der genetische Hauttyp und zum anderen die klimatischen Bedingungen [2]. Abb. 3 zeigt die im Jahr 2019 vom Robert Koch-Institut veröffentlichten altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten des malignen Melanoms in Deutschland je 100.000 Einwohner für die Jahre 1999 – 2016/17 inklusive Prognose bis 2020 [1].

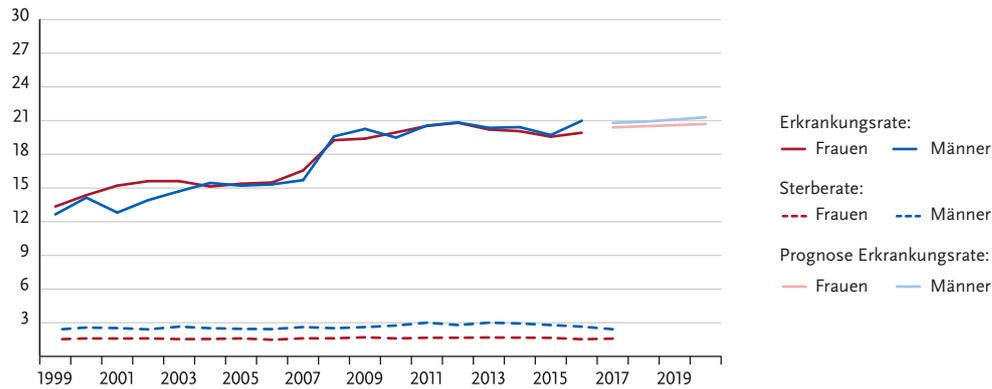


Abb. 3: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des malignen Melanoms in Deutschland je 100.000 Einwohner für die Jahre 1999 – 2016/17 inklusive Prognose bis 2020; aus [1] (mit Genehmigung durch den Herausgeber).

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Risikofaktoren für das maligne Melanom können entweder konstitutionell, erworben oder Expositions-Risikofaktoren sein. In der Ätiologie des malignen Melanoms, die bisher noch nicht vollständig geklärt ist, stellt die Exposition mit UV-Strahlung den bedeutendsten Risikofaktor dar. Durch Interaktion mit zellulären Komponenten kommt es auf direktem oder indirektem Weg zur Entstehung von DNA-Schäden. Mangels Behebung dieser Schäden durch zelluläre Reparatursysteme, beispielsweise bei Xeroderma-Pigmentosum-Patienten durch eine defekte Nukleotid-Exzisionsreperatur, können diese zur Entstehung von Mutationen im Genom führen [3]. Die karzinogene Wirkung von UV-Strahlen konnte bereits im Rahmen mehrerer Arbeiten gezeigt werden [3]. Durch den überwiegenden Nachweis sogenannter *signature mutations* für UV-Strahlung bei der Sequenzierung eines Melanomgenoms, konnte der Zusammenhang zwischen Exposition und der Entstehung maligner Melanome auch molekulargenetisch belegt werden [4]. Studien haben gezeigt, dass dabei im Gegensatz zu anderen Hautkrebsformen nicht die kumulative UV-Dosis, sondern intermittierende Exposition

und schwere Sonnenbrände vor allem in Kindheit und Jugend besonders relevant sind [5-7]. Neben dem hauptsächlichen Vorkommen an sämtlichen Stellen der Haut, kann das maligne Melanom auch an den Schleimhäuten, dem Auge sowie den Hirnhäuten auftreten [8]. Im Gegensatz zu den kutanen Melanomen zeigen diese keine Assoziation zur Exposition mit UV-Strahlung, jedoch konnte für eine Reihe von Mutationen ein gehäuftes Auftreten gezeigt werden [9, 10].

Bei den konstitutionellen Risikofaktoren konnte gezeigt werden, dass die helleren Hauttypen ein erhöhtes Risiko aufweisen [11]. Spezifische Mutationen im Melanocortin-1-Rezeptor sind neben einem rothaarigen und hellhäutigen Phänotyp auch mit einem erhöhten Risiko ein malignes Melanom zu entwickeln assoziiert [12-14]. Etwa 10 % der Fälle treten familiär gehäuft auf, wobei ein autosomal dominanter Erbgang vermutet wird [11, 15, 16]. Für diese Fälle konnten bereits Suszeptibilitätsgene wie *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A), welches in etwa einem Drittel der Fälle mutiert ist, oder *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) identifiziert werden [15, 16]. Neben weiteren Prädispositionsgenen die mit dem malignen Melanom assoziiert sind, spielen Mutationen im *B-rapidly accelerated fibrosarcoma* (BRAF)-Gen, die bei rund 50 % der malignen Melanome vorkommen, eine entscheidende Rolle bei der Melanomentstehung [15, 17]. Aufgrund der besonderen Relevanz wird auf diese im Kapitel 1.2. genauer eingegangen. Außerdem besteht bei den von Geburt an vorhandenen kongenitalen Nävi ein Risiko der malignen Entartung, welches mit deren Größe korreliert [18]. Erworbene Risikofaktoren sind eine hohe Anzahl erworbener Nävi, das Vorkommen atypischer Nävi und ein malignes Melanom in der Vorgeschichte oder Familienanamnese [16, 19, 20]. Es gibt starke Evidenz dafür, dass der Anzahl erworbener Nävi hierbei die größte Bedeutung zukommt [19]. Auch wenn für etwa 20 - 30 % der malignen Melanome

eine Assoziation mit melanozytären Nävi gezeigt werden konnte, entwickelt sich der Großteil der Fälle de novo ohne vorangehende Hautveränderung [14].

1.1.3. Diagnostik und Therapie

Die S3-Leitlinie, die aktuell in der Version 3.2 aus dem Jahr 2019 vorliegt, bietet den behandelnden Ärztinnen und Ärzten Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des malignen Melanoms. Die Konsultationskonferenz der Version 3.2 geht von der 7. Edition der American Joint Committee on Cancer (AJCC)- und Tumor-Node-Metastasis (TNM)-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) aus [21, 22]. Nachdem zu Beginn des Jahres 2017 die revidierte 8. Fassung der AJCC-Klassifikation publiziert wurde, ist diese seit Beginn des Jahres 2018 zu verwenden [22, 23]. Beide Fassungen sind in der aktuellen S3-Leitlinie einsehbar. Die Stadien 1 und 2 definieren Primärtumoren ohne Metastasierung, das Stadium 3 wird mit bestehender lokoregionärer Metastasierung erreicht und das Stadium 4 mit Fernmetastasierung. Bei klinischem Verdacht auf ein malignes Melanom erfolgt die Exzision mit anschließender histologischer Untersuchung. Bei Vorliegen eines malignen Melanoms, soll therapeutisch mit entsprechendem Sicherheitsabstand abhängig von der Tumordicke nach Breslow exzidiert werden. Histologisch ist unbedingt ein Staging gemäß der gültigen TNM-Klassifikation durchzuführen und eine Bestimmung des Tumortyps unter Mitbeurteilung histopathologischer Besonderheiten empfohlen. Liegt eine R1 oder R2 Situation vor, soll in der Region des Primärtumors unbedingt eine Nachresektion vorgenommen werden, sofern dadurch eine R0-Situation zu erreichen ist [22].

Die weitere Ausbreitungsdiagnostik richtet sich nach dem Tumorstadium. Bis einschließlich Stadium 2B soll neben der klinischen Ganzkörperuntersuchung inklusive

Palpation der Lymphabstromgebiete und Lymphknotenstationen ab Stadium 1B eine sonographische Untersuchung der lokoregionären Lymphknoten erfolgen und der Tumormarker S100B kann zusätzlich erhoben werden. Ohne Hinweis auf lokoregionäre oder Fernmetastasierung erfolgt leitliniengerecht ab einer Tumordicke von 1,0 mm eine Biopsie des Sentinel-Lymphknotens. Bei Ulzerationen, erhöhter Mitoserate oder einem Lebensalter unter 40 Jahren sollte diese bereits ab 0,75 mm Tumordicke geschehen [22]. Das Resultat der Sentinel-Lymphknotenbiopsie stellt einen bedeutsamen Parameter für die Prognose dar [24, 25]. Ab Stadium 2C soll darüber hinaus eine Ganzkörper-Schnittbildgebung erfolgen, wobei hier extrazerebral die Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/Computertomographie (CT) mit ^{18}F -Fluordesoxyglukose (^{18}F -FDG) die höchste diagnostische Genauigkeit besitzt, gefolgt von der Magnetresonanztomographie (MRT) und CT. Zur Detektion von zerebralen Metastasen stellt die Schädel-MRT die Methode mit der höchsten diagnostischen Genauigkeit dar. Neben der empfohlenen Bestimmung von S100B kann in diesen Stadien auch die Lactatdehydrogenase (LDH) als zusätzlicher Tumormarker bestimmt werden [22]. Ab dem Stadium 3B sollte eine molekularpathologische Diagnostik mit der Suche nach Mutationen erfolgen, für die spezifische Therapieoptionen existieren [22]. Da die BRAF-Mutation mit etwa 50 % am häufigsten ist, und eine *neuroblastoma rat sarcoma* (NRAS)-Mutation, die in etwa 15 % der Fälle nachweisbar ist ausschließt, sollte stufendiagnostisch zuerst auf eine BRAF-Mutation getestet werden [22, 26]. Nur bei akralen und mukosalen Melanomen empfiehlt sich die Testung auf eine KIT-Mutation, die in diesen Gruppen bei etwa 5 % vorkommt [22, 27].

Das therapeutische Vorgehen ab Stadium 3 sollte im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz diskutiert werden. Beim Nachweis einer lymphogenen Metastasierung

ohne Fernmetastasen soll therapeutisch eine Lymphadenektomie erfolgen, welche bei Vorliegen von Risikofaktoren durch eine adjuvante Radiotherapie ergänzt werden sollte [22]. Bei einer Metastasierung im Sentinel-Lymphknoten ist eine komplettierende Lymphadenektomie abhängig vom maximalen Metastasendurchmesser und dem Vorliegen weiterer Risikofaktoren empfohlen [22, 28]. Bei lokoregionären kutanen oder subkutanen Metastasen soll eine operative Entfernung erfolgen wenn eine R0-Resektion möglich ist und kein Hinweis auf Fernmetastasierung vorliegt. Bei Inoperabilität der Metastasen können eine lokale Radiotherapie sowie verschiedene lokale Verfahren, beispielsweise die intratumorale Injektion von Interleukin-2 zur Anwendung kommen. Unter strenger Abwägung und Rücksprache mit den Patienten, soll in den Stadien 2B und 2C die Gabe einer adjuvanten Interferontherapie angeboten werden, in niedrigdosierter Form kann dies auch im Stadium 2A erfolgen. Patienten in den Stadien 3A - D und 4 sollen als adjuvante Therapie einen *anti-programmed cell death protein 1* (PD1)-Antikörper, sowie in den Stadien 3A - D bei Vorliegen einer BRAF V600E oder V600K Mutation einen BRAF- und einen *mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase* (MEK)-Inhibitor angeboten bekommen [22].

Ab Stadium 4 soll zusätzlich zu den diagnostischen Maßnahmen der vorangehenden Stadien die Bestimmung von LDH als Tumormarker erfolgen, außerdem kann eine Skelettszintigraphie bei ossären Schmerzen zur zusätzlichen Metastasensuche durchgeführt werden. Bei Fernmetastasen sollte unter Abwägung anderer Verfahren eine Resektion diskutiert werden, wenn dadurch ohne untragbare funktionelle Defizite ein R0-Zustand erreicht werden kann, und eine resektionsbefürwortende Situation mit niedriger Metastasenzahl und langem metastasenfremem Intervall besteht. Bei einer BRAF V600-Mutation soll eine BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie oder eine

Checkpoint-Inhibitor-Therapie in Form einer anti-PD1-Antikörper-Monotherapie oder einer Kombination mit *anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4)-Antikörpern erfolgen. Die Möglichkeit einer c-KIT-Kinaseinhibitor-Therapie besteht bei sensitiver c-KIT Mutation und Nichtansprechen auf eine Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren. Eine Poly- oder Monochemotherapie ist diesen genannten Therapieoptionen unterlegen. Bei nicht resektablen Metastasen soll die Gabe einer Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren, bevorzugt als PD-1-Antikörper-Monotherapie oder in Kombination mit dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab gegenüber einer Monotherapie mit Ipilimumab diskutiert werden. Im Falle eines Ausschlusses der überlegenen Therapieformen können diesen Patienten eine Poly- oder Monochemotherapie angeboten werden. Ein adäquates interdisziplinäres Nebenwirkungsmanagement ist hier von grundlegender Bedeutung. Zur zusätzlichen Behandlung symptomatischer ossärer und zerebraler Metastasen sollte eine Radiotherapie erfolgen. Trotz der verbesserten lokalen Kontrollrate und der Symptomkontrolle konnte bisher kein Einfluss der Radiotherapie auf das Gesamtüberleben gezeigt werden [22].

1.1.4. Prognose und Nachsorge

Die Tumordicke, Ulzeration und die Mitoserate stellen wichtige Prognoseparameter dar [21, 23]. Die Prognose des malignen Melanoms variiert je nach initialem Tumorstadium sehr stark [21]. In den Stadien 1 und 2 reicht die 10-Jahres-Überlebensrate von 98 % im Stadium 1A bis 75 % im Stadium 2C. Im Stadium 3 reicht die 5-Jahres-Überlebensrate von 93 % im Stadium 3A bis 32 % im Stadium 3D [23]. Im Stadium der Fernmetastasierung liegt die 1-Jahres-Überlebensrate nur noch zwischen 33 und 62 %. Hierbei sind ein erhöhter Serum-LDH-Wert sowie eine viszerale Lokalisation der Metastasen mit einer schlechteren Prognose assoziiert [21]. Aufgrund der neuen Therapiemöglichkeiten für

Patienten in diesem Stadium wird für die Zukunft mit einer Verbesserung der Prognose gerechnet [23].

Für die Nachsorge empfiehlt sich ein risikoadaptiertes Vorgehen über einen Zeitraum von 10 Jahren. Da 80 % der Rezidive innerhalb der ersten 3 Jahre und die meisten Zweitmelanome innerhalb der erste 2 Jahre vorkommen, ist es sinnvoll in diesem Zeitraum eine engmaschigere Nachsorge durchzuführen. Nach 10 Jahren werden die regelmäßige Selbstuntersuchung durch den Patienten, sowie eine jährliche Ganzkörperuntersuchung empfohlen. Die nachfolgende Abb. 4 zeigt nach welchem Schema die stadienadaptierte Nachsorge erfolgen sollte. Zur bildgebenden Untersuchung im Rahmen der Nachsorge wird ein Schnittbildverfahren empfohlen [22].

Stadium	Körperliche Untersuchung			Lymphknoten-Sonographie			Labor S100B			Bildgebende Untersuchungen			
	Jahr	1-3	4 + 5	6-10	1-3	4 + 5	6-10	1-3	4 + 5	6-10	1-3	4 + 5	6-10
IA		6-mtl.	12-mtl.	12-mtl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-IIB		3-mtl.	6-mtl.	6- bis 12-mtl.	6-mtl.**	-	-	3-mtl.	-	-	-	-	-
IIC-IV*		3-mtl.	3-mtl.	6-mtl.	3-mtl.	6-mtl.	-	3-mtl.	6-mtl.	-	6-mtl.	-	-

*für R0-resezierte Stadien, ** nur bei korrektem pathologischem Staging mittels WLKB, sonst wie IIC

Abb. 4: Stadienadaptiertes Nachsorgeschema beim malignen Melanom. WLKB = Wächterlymphknotenbiopsie; aus [22] (mit Genehmigung durch den Herausgeber).

1.2. BRAF-/MEK-Inhibitor-Therapie

Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg ist sowohl für normale Zellen als auch für maligne Zellen von großer Bedeutung. Durch diesen werden überlebenswichtige Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose gesteuert. Physiologisch wird der MAPK-Signalweg durch ein extrazelluläres Signal wie die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor aktiviert [29-32]. Ein Beispiel für einen solchen Wachstumsfaktor ist der *epidermal growth factor* [29]. Über die anschließende Signalkaskade werden *rat sarcoma* (RAS), RAF (A-RAF, B-RAF und C-RAF), MEK und schließlich *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) nacheinander aktiviert. Neben etlichen Substraten, die es im Zytosol besitzt, ist aktiviertes ERK auch befähigt in den Zellkern einzutreten. Dort ist es in der Lage, durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression zu regulieren [29, 30, 33]. Im Falle einer BRAF V600 Mutation ist BRAF unabhängig von der Bindung eines extrazellulären Liganden und der nachfolgenden Aktivierung von RAS grundsätzlich aktiviert. Folglich kommt es über MEK auch zur Aktivierung von ERK [32, 33].

Eine Überaktivierung dieses Signalweges führt zu unkontrollierter Proliferation, Zellwachstum, verlängertem Überleben und Apoptosehemmung der Zellen und ist ein zentraler Mechanismus in der Ätiopathogenese des malignen Melanoms [32, 34]. Der physiologische negative Feedbackmechanismus, der die Aktivierung des MAPK-Signalwegs supprimiert, ist durch ERK vermittelt. Durch die vermehrte Aktivierung von ERK bei einer BRAF V600 Mutation wird der negative Feedbackmechanismus verstärkt, wodurch BRAF V600 der Hauptaktivator des Signalwegs wird [32, 33]. Es konnte gezeigt werden, dass eine BRAF Mutation bei ungefähr 50 % der malignen Melanome nachweisbar ist. In 90 % der Fälle kommt es zu einer Mutation im Codon 600 [15, 22, 33].

Die weitaus häufigste Form ist die BRAF V600E-Mutation, bei der Valin mit Glutamat getauscht wird, gefolgt von der BRAF V600K-Mutation, bei der ein Austausch mit Lysin erfolgt [15]. Es konnte gezeigt werden, dass BRAF-Mutationen häufiger bei Melanomen an intermittierend sonnenexponierten Hautarealen vorkommen, als bei Melanomen an chronisch oder kaum exponierten Arealen [35]. Neben dem malignem Melanom sind BRAF-Mutationen auch bei anderen Malignomen wie zum Beispiel dem Schilddrüsenkarzinom, dem Ovarialkarzinom oder dem kolorektalen Karzinom vermehrt nachzuweisen [29, 33].

Selektive BRAF-Inhibitoren sind in der Lage, diese Überstimulation zu inhibieren. Eine Studie bei Patienten mit metastasiertem Melanom mit BRAF V600E-Mutation zeigte eine höhere Tumoransprechrates (48 % zu 5 %), und ein verlängertes Gesamt- (nach sechs Monaten 84 % zu 64 %) und progressionsfreies Überleben (5,3 Monate zu 1,6 Monaten median) durch die BRAF-Inhibitor-Therapie im Vergleich zu einer Chemotherapie [36]. In einer weiteren Studie mit einem längeren Follow-up-Zeitraum bei Patienten mit metastasiertem Melanom mit BRAF V600E- und V600K-Mutation wurde unter BRAF-Inhibitor-Therapie eine Gesamtansprechrates von 53 % und ein medianes Gesamtüberleben von 15,9 Monaten gezeigt [17]. Auch für die Therapie mit einem selektiven MEK-Inhibitor konnte bei Patienten mit metastasiertem Melanom mit BRAF V600E- und V600K-Mutation ein verlängertes progressionsfreies- (4,8 Monate zu 1,5 Monaten median) und Gesamtüberleben (nach sechs Monaten 81 % zu 67 %) im Vergleich zu einer Chemotherapie gezeigt werden [37].

Auch wenn eine hohe Effektivität einer Therapie mit BRAF-Inhibitoren gezeigt werden konnte, ist das langfristige Ansprechen auf eine Monotherapie bei einem Großteil der

Patienten eingeschränkt, sodass sich innerhalb von sechs bis acht Monaten unter Therapie eine Progression der Krankheit zeigt. Dies ist auf Resistenzmechanismen zurückzuführen, die entweder primär beziehungsweise intrinsisch oder sekundär beziehungsweise erworben sein können. Patienten mit intrinsischer Resistenz zeigen initial kein Ansprechen auf die Therapie. Bei den erworbenen Resistenzen kommt es nach einer initialen Regression unter Therapie zu einer Progression der Krankheit. Ein bedeutender Mechanismus für die Entwicklung erworbener BRAF-Inhibitor Resistenzen ist die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch die MEK, die mit Hilfe von MEK-Inhibitoren verhindert werden kann [38, 39]. Jedoch können Resistenzen auch noch bei der Kombination von BRAF- mit MEK-Inhibitoren auftreten [38]. Die kombinierte Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren zeigt sich als sehr effektiv in der Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms mit BRAF-Mutation und ist anderen Therapieoptionen überlegen. Die Kombinationstherapie zeigt eine signifikante Verlängerung des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens bei Patienten im Vergleich zur BRAF-Inhibitor-Monotherapie [40]. Daher stellt die BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie eine Erstlinientherapieoption beim metastasierten oder irresektablen malignen Melanom mit BRAF-Mutation dar [41].

Bei dem in unserer Studie verwendeten BRAF-Inhibitor Encorafenib und dem MEK-Inhibitor Binimetinib handelt es sich um Therapeutika zur oralen Anwendung [41]. Im Rahmen einer Phase-3-Studie konnte eine bessere Wirksamkeit einer Kombinationstherapie von Encorafenib plus Binimetinib im Vergleich zur Monotherapie mit Encorafenib oder dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib bei Patienten mit BRAF V600-positivem Melanom gezeigt werden. Das äußerte sich sowohl in einem längeren progressionsfreien Überleben als auch Gesamtüberleben bei Patienten unter dieser

Therapie [42-44]. Zusätzlich scheint die Verträglichkeit der Kombinationstherapie mit Encorafenib plus Binimetinib besser zu sein als die einer Monotherapie mit Encorafenib oder Vemurafenib [42]. Daraufhin folgte im Juni 2018 in den USA die erstmalige Zulassung beider Therapeutika als Kombinationstherapie für die Behandlung von Patienten mit metastasiertem oder irresektablen malignen Melanom mit BRAF V600E- oder V600K-Mutation [41].

1.3. Molekulare Bildgebung zum Therapiemonitoring

Zielgerichtete Therapien nehmen eine immer bedeutendere Rolle in der Behandlung von Krebserkrankungen ein. Sie wirken indem sie gezielt in Signalwege eingreifen, die an der Onkogenese beteiligt sind [45-47]. Durch die selektive Wirkungsweise unterscheiden sie sich von herkömmlichen Chemotherapien, welche ihre Wirkung durch eine generelle Zytotoxizität entfalten [46, 47]. Dabei wirken diese nicht nur toxisch auf maligne Zellen mit hoher Teilungsrate, sondern beispielsweise auch auf benigne intestinale Epithelzellen [45]. Durch die hohe Selektivität zielgerichteter Therapien auf molekularer Ebene ergibt sich das vergleichsweise günstige Nebenwirkungsprofil, aber auch die Begrenzung der Wirksamkeit auf bestimmte Patientengruppen [47, 48]. Trotz der hohen Selektivität, kann durch die gleichzeitige Expression der molekularen Zielstrukturen an normalen Zellen eine unerwünschte Wirkung auf diese auftreten. Beispielsweise kann eine Inhibition des *epidermal-growth-factor*-Rezeptors zu einer toxischen Wirkung auf physiologische Zellen der Haut führen [48]. Die Möglichkeit das frühe Therapieansprechen nichtinvasiv mit Bildgebung zu evaluieren ist von essentieller Bedeutung für das weitere Vorgehen und die Wahl der richtigen Behandlungsstrategie. Durch die frühzeitige Detektion molekularer Veränderungen, die bereits ohne morphologische Veränderungen des Tumors auftreten, können die Therapiewahl, Behandlungsdauer und Nebenwirkungen optimiert werden, und dadurch auch eine Reduktion der Kosten, die für zielgerichtete Therapien aktuell sehr hoch sind, erreicht werden [46, 47].

Bisher wurden zur Bewertung des Therapieansprechens Methoden verwendet, bei denen dieses rein anhand von morphologischen Kriterien im Sinne einer Änderung der Tumorgröße in CT- oder MRT-Untersuchungen beurteilt wird. Hierbei sind die *World*

Health Organisation (WHO) Kriterien sowie die im Jahr 2000 entwickelten *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) zu nennen [46, 47]. Letztere sollten eine vereinfachte Beurteilung ermöglichen, beispielsweise durch die ein- statt zweidimensionale Vermessung der Tumormanifestationen. Für die bildbasierte Bewertung der Effekte einer zytotoxischen Chemotherapie bei soliden Tumoren gelten diese Kriterien als allgemein anerkannt und sind für klinische Studien zur Zulassung von neuen Krebsmedikamenten auch von der *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA) anerkannt [46, 49, 50]. Allerdings ist die Wirkungsweise von zielgerichteten Therapien wesentlich komplexer. Dies führt dazu, dass die Effekte einer zielgerichteten Therapie, die häufig nicht primär in einer Änderung der Tumorgröße resultieren, bei der Evaluierung anhand von rein morphologischen Kriterien, nicht vollständig dargestellt und tendenziell unterschätzt werden. Aufgrund dieser Limitationen ist die Anwendbarkeit solcher Kriterien für die Evaluierung zielgerichteter Therapien eingeschränkt [46, 47].

Für mehrere Tumorentitäten konnte bereits der Nutzen von funktioneller Bildgebung mit ^{18}F -FDG -PET zum Monitoring der Therapieresponse gezeigt werden [51]. Beispielsweise demonstrierten klinische Studien bei Patienten mit Mammakarzinom, Hodgkin-Lymphom und Weichteilsarkom ihren Einsatz [52-54]. Im Vergleich zur Beurteilung allein anhand der morphologischen Informationen der CT konnte die Überlegenheit der Beurteilung des metabolischen Therapieansprechens mit den zusätzlichen funktionellen Informationen durch die PET gezeigt werden, nachdem die PET-Response früher objektivierbar war und eine höhere Korrelation mit dem progressionsfreien und krankheitsspezifischen Überleben zeigte [52, 54]. In der Studie von Borchmann et al. konnte durch die zusätzlichen metabolischen Informationen zur Tumorresponse die

Anwendung eines reduzierten Therapieschemas für bestimmte Patienten legitimiert, und so die behandlungsbedingten Risiken reduziert und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht werden [53].

Zur besseren Beurteilung der Effekte zielgerichteter Tumortherapien wurden in den letzten Jahren mehrere neue erweiterte Beurteilungskriterien für verschiedene Tumorentitäten entwickelt, die über die Morphologie hinausgehend komplementäre funktionelle Informationen berücksichtigen [55]. So wird beispielsweise bei den Choi-Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens von gastrointestinalen Stromatumoren die Tumorgröße durch die computertomographisch gemessene Dichte ergänzt oder bei den *modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (mRECIST)-Kriterien bei hepatozellulären Karzinomen der vitale, in der arteriellen Phase Kontrastmittel anreichernde Tumoranteil beurteilt [56, 57]. Bei den *Positron Emission Tomography Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (PERCIST)-Kriterien wird der Tumorglukosemetabolismus zur Beurteilung des Therapieansprechens solider Tumore genutzt [58]. Des Weiteren sind an dieser Stelle die Lugano-Kriterien bei Lymphomen zu nennen, die neben der Tumorgröße ebenfalls den Glukosemetabolismus berücksichtigen [59]. Zwar lässt sich unter Anwendung dieser erweiterten Kriterien eine bessere Beurteilung des Therapieansprechens erreichen, die Pathophysiologie des Tumors und Veränderungen im Microenvironment werden aber auch hierbei nur partiell dargestellt. Mit Hilfe der neuen funktionellen und molekularen Bildgebungsverfahren und ihrer Biomarker ist es möglich, den Tumor auf diesen Ebenen zu charakterisieren und somit umfassendere pathophysiologische Informationen zur Bewertung der Therapiereponse zu akquirieren [55].

1.4. Optoakustische Bildgebung

Optoakustische oder auch photoakustische Bildgebung ist eine *in vivo* Bildgebungsmethode, die auf dem photoakustischen Effekt basiert [60-64]. Dieses erstmals 1880 von Alexander Graham Bell beschriebene Phänomen erklärt die Umwandlung eines optischen in ein akustisches Signal [65]. Durch die Bestrahlung von Gewebe mit Laserpulsen im Nanosekunden Bereich kommt es durch die Absorption des Lichts kurzzeitig zu einer Erwärmung, welche zur thermoelastischen Expansion führt. Durch die Volumenänderung des Gewebes entstehen Schallwellen, die von Ultraschalldetektoren erkannt werden. Aus den so gewonnenen Informationen über die optische Absorption kann dann in Echtzeit und ohne ionisierende Strahlung ein Bild generiert werden [60-64, 66-68]. Akustische Wellen unterliegen beim Durchlaufen von Gewebe einer wesentlich geringeren Streuung als Licht. Dieser Umstand ermöglicht im Vergleich zur optischen Bildgebung auch in tieferen Gewebeabschnitten von bis zu mehreren Zentimetern eine hohe räumliche Auflösung [60, 62, 64, 66-68]. Optoakustische Bildgebung erlaubt Untersuchungen sowohl im makroskopischen als auch im mikroskopischen Bereich bis zur subzellulären Ebene. Die Auflösung und Eindringtiefe sind dabei abhängig von der gewählten Ultraschallfrequenz skalierbar, wobei die Auflösung positiv und die mögliche Tiefe negativ mit der gewählten Frequenz korrelieren [61, 62, 64].

Innerhalb einer Modalität können bei der optoakustischen Bildgebung neben strukturellen auch funktionelle und molekulare Informationen erfasst werden [61, 64]. Einer der bedeutendsten Vorteile der optoakustischen Bildgebung ist die Möglichkeit die intrinsischen Gewebechromophore ohne die Verwendung exogener Kontrastmittel zu visualisieren, da diese das emittierte Licht aufnehmen können. Aufgrund der

individuellen Lichtabsorptionseigenschaften der verschiedenen Gewebebestandteile, kann durch die Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen die Verteilung der körpereigenen Absorber, deren Absorptionsspektren bekannt sind, wie Oxy- und Deoxy-Hämoglobin, Melanin, Fett oder Wasser im Gewebe dargestellt werden [60-62, 64, 68]. Die Möglichkeit Gewebe in Hinblick auf die Konzentration und Verteilung dieser verschiedenen Komponenten zu analysieren, erlaubt die Bewertung mehrerer relevanter klinischer Parameter wie Neoangiogenese, Perfusion oder Hypoxie [62]. Damit das Licht tief genug in das Gewebe eindringen kann, werden Wellenlängen im Bereich des Nahinfrarot verwendet, da hier die Gewebeabsorption am geringsten ist [61, 62, 68]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Verwendung verschiedener exogener Kontrastmittel, deren Absorptionsspektren im Nahinfrarotbereich liegen [60-62, 64]. Bisher sind noch sehr wenige Substanzen, wie z.B. Indocyaningrün (ICG), für den klinischen Gebrauch zugelassen [62]. Neben den ungezielten Kontrastmitteln, besteht auch die Möglichkeit, mit Hilfe von gezielten Kontrastmitteln Informationen über spezifische molekulare Prozesse zu gewinnen [61, 62, 67, 68]. Es existieren sowohl tomographische als auch lineare Systeme. Während die Qualität der Aufnahme bei tomographischen Systemen höher ist, sind lineare Systeme flexibler und können dadurch auch in Ultraschallsysteme integriert werden und eignen sich auch zum endoskopischen Gebrauch [62].

1.5. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist ein Transmembranprotein, das an angiogenetisch aktiven Endothelzellen und an Tumorzellen überexprimiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin eine signifikante Rolle im Prozess der Tumormetastasierung und Neoangiogenese spielt [69-71]. Die Tatsache, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf aktiven Endothelzellen während der Angiogenese überexprimiert ist, nicht aber auf vorbestehenden inaktiven Endothelzellen, macht es zu einem geeigneten Marker für die angiogenetische Aktivität [69]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in verschiedenen Tumormodellen eine Zielstruktur für die nicht invasive in vivo Messung von Tumorangiogenese und Tumorzellpopulationen dar [72, 73]. Zusätzlich konnte beim malignen Melanom ein positiver Zusammenhang zwischen hoher ERK-Aktivität im MAPK-Signalweg, wie sie auch im Falle einer BRAF Mutation auftritt, und der Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin festgestellt werden. Analog dazu führte eine Inhibition des MAPK-Signalwegs mit MEK-Inhibitoren zu einer reduzierten Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin [74].

In einer vorangehenden Studie konnte bereits gezeigt werden, dass optoakustische Bildgebung mit einem gezielten Fluoreszenztracer in der Lage ist, den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus in Tumormodellen der Maus in vivo zu charakterisieren. Hierbei wurde mit optoakustischer Bildgebung die Biodistribution des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers der auch in unserer Studie verwendet wurde, im Modell des Ovarialkarzinoms, des kolorektalen Karzinoms und des Mammakarzinoms der Maus visualisiert [66]. Die Progression des malignen Melanoms besteht aus verschiedenen Phasen. In der Phase des radialen Wachstums breiten sich die Zellen vorwiegend in der Epidermis aus. Hierbei ist eine Metastasierung unwahrscheinlich und die Prognose folglich sehr gut [75]. In der darauffolgenden vertikalen Wachstumsphase, die mit einer

wesentlichen Verschlechterung der Prognose einhergeht, kommt es zur vertikalen Invasion der Zellen in die Dermis [75, 76]. Während der vertikalen Wachstumsphase herrscht eine hohe angiogenetische Aktivität, wodurch die Metastasierung des malignen Melanoms begünstigt wird [76]. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, dessen Expression auf Zellen des malignen Melanoms erhöht ist, eine wichtige Rolle bei der Progression von der nicht-invasiven radialen zu der invasiven und metastasierenden vertikalen Wachstumsphase beim malignen Melanom spielt [76, 77]. Die erhöhte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Zellen des malignen Melanoms, die Abnahme der Expression unter MEK-Inhibition und die Möglichkeit der Visualisierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracern mit optoakustischer Bildgebung deuten auf das große Potential des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen optoakustischen Signals als Imaging Biomarker der Therapieresponse einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie beim malignen Melanom [66, 74, 76].

1.6. Hypothese

Die Hypothese dieser tierexperimentellen Studie war, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung das nicht-invasive in vivo Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanom-Xenograft-Modell der Maus erlaubt. Ziel dieser Studie war die quantitative Untersuchung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen optoakustischen Signals als pathophysiologisches Surrogat für die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression des Tumorendothels und deren immunhistochemische Validierung als quantitativer Imaging Biomarker der Tumorresponse.

2. Material und Methoden

2.1. Tumormodell und Versuchsprotokoll

2.1.1. Tumormodell

Das Tierversuchsvorhaben wurde nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes von der Regierung von Oberbayern (Sachgebiet 54 Verbraucherschutz, Veterinärwesen und Lebensmittelhygiene) unter dem Aktenzeichen Gz. ROB-55.2-2532.Vet_02-15-204 genehmigt. Im Vorfeld wurde von mir, Georg Keinrath, sowohl eine theoretische Qualifikation im Rahmen des Moduls Versuchstierkunde (TransMIT, Marburg, Deutschland) erworben, als auch eine praktische Ausbildung (Aktenzeichen Gz. 55.2-1-54-2532.0-42-2016) absolviert. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Leitlinien für die Pflege und Nutzung von Labortieren des *US National Institute of Health* durchgeführt. Dabei wurden alle geltenden institutionellen und nationalen Leitlinien für Pflege und Nutzung von Labortieren befolgt. Die Tierhaltung erfolgte im Labor für Experimentelle Radiologie der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke).

Für die Experimente wurden $n = 10$ sechs bis acht Wochen alte weibliche, athymische BALB/c (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl) Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) untersucht. Es wurden sämtliche Maßnahmen ergriffen, um das Leiden der Tiere so gering wie möglich zu halten. Die Mäuse wurden in separat belüfteten Typ-2L-Käfigen gehalten ($n = 4$ Mäuse pro Käfig), die in einem geschlossenen Tierhaltungsschrank gehalten wurden. Unter kontrollierten Bedingungen betrug die relative Luftfeuchtigkeit 65 % bei $n = 18$ Raumlufwechsels pro Stunde, die Temperatur 26 °C und der Luftdruck 50 Pa. Es wurde ein Hell-/Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gewährleistet. Die

Ernährung der Tiere erfolgte mit steril filtriertem Wasser und Kleintiernahrung, welche zur freien Verfügung standen. Als *Enrichment*-Maßnahmen wurden Nistkästen und Nestbaumaterialien in den Käfigen bereitgestellt. Täglich wurden die Tiere inspiziert und Gewicht, Tumorstadium und Allgemeinzustand kontrolliert und protokolliert. Dabei wurden auch stets die klimatischen Bedingungen im Tierstall überprüft. Der Zustand der Tiere wurde anhand spezifischer *Scoresheets* dokumentiert. Die Größe der Tumoren wurde mit einem Lineal in zwei senkrecht zueinander stehenden Achsen vermessen. Die Messungen wurden unter inhalativer Isoflurananästhesie durchgeführt (2,5 % bei einer Flussrate von 1,0 L 100 % O₂ / min für die Einleitung sowie auch für die Aufrechterhaltung der Anästhesie). Abnorme Passivität und überdurchschnittliche Gewichtsabnahme wurde als Indikator für Schmerz angesehen und durch Analgesie (0,5 mg / kg Buprenorphin subkutan) behandelt, eine Beschwerdepersistenz über 12 Stunden führte zum vorzeitigen Versuchsabbruch. Veterinärmedizinische Endpunkte, die zum Abbruch im Sinne einer Euthanasie führten waren ein maximaler Tumordurchmesser >1,5 cm, Tumorexulzeration, Gewichtsverlust >15 %, Apathie, auffallende Abwehrreaktion bei Palpieren des Tumors, auffällige Atembeschwerden, Lähmungen oder eine auffällige unphysiologische Körperhaltung.

Für das Tumormodell wurden humane A375-Melanomzellen (ATCC® CRL-1619™, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland) als Xenografts verwendet. Diese Zelllinie konnte im Jahr 1973 aus einem humanen Melanom isoliert und etabliert werden [78]. Die Zelllinie besitzt eine BRAF-V600E Genmutation, die phänotypisch zur Entstehung eines amelanotischen Melanoms führt. Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter der Sterilbank. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Zellen aufgetaut. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen mit

frischem Medium (*Dubecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g / L Glukose, 10 % *fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin) unter einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂, 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C. Subkonfluent gewachsene Kulturen wurden einmal in *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen, und zur Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche für 3 - 5 min bei 37 °C mit Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) inkubiert und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach der Kontrastierung der Zellen mit Trypanblau, wurde in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. 3 x 10⁶ A-375 Zellen wurden in 100 µL einer 1 : 1 Mischung von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS pH 7,4; GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) verdünnt. Diese Zell-Suspension wurde in einer Tuberkulin-Spritze aufgezogen und anschließend subkutan in die linke Abdomenflanke der Tiere injiziert.

2.1.2. Inokulation und Wachstumsphase

Nach Akklimatisierung der Tiere an die Bedingungen im Tierstall für mindestens eine Woche erfolgte die Inokulation der Tumorzellen. Dazu wurden menschliche BRAF V600E-positive Melanomzellen (A375; ATCC CRL-1619, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland) in 100 µL einer 1 : 1 Mischung von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS pH 7,4; GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) verdünnt. 3 × 10⁶ Zellen pro Maus wurden subkutan in die linke Abdomenflanke von n = 10 Tieren injiziert. Die Injektion erfolgte unter inhalativer Isoflurananästhesie (2,5 % bei einer Flussrate von 1,0 L 100 % O₂ / min für die Einleitung sowie auch für die Aufrechterhaltung) mit einer 24-Gauge-Nadel. Zum Ende der Wachstumsphase erreichten die Tiere einen durchschnittlichen größten

Durchmesser von 0,5 cm und wurden randomisiert entweder der Therapie- (n = 5) oder der Kontrollgruppe (n = 5) zugeordnet.

2.1.3. Versuchsaufbau

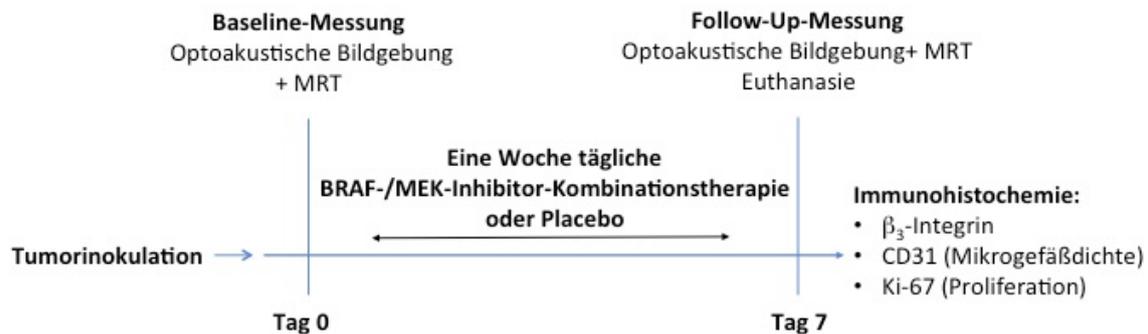


Abb. 5: Versuchsprotokoll. Optoakustische Bildgebung- und MRT-Baseline-Messungen wurden an Tag 0 durchgeführt. Danach erhielten die Tiere eine Woche täglich entweder eine BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie (Therapiegruppe) oder eine volumenäquivalente Menge eines Placebos (Kontrollgruppe). Nach den Follow-up-Messungen an Tag 7 wurden die Tiere euthanasiert. Die Tumoren wurden explantiert und zur immunohistochemischen Untersuchung weiterverarbeitet.

Eine multimodale Bildgebung bestehend aus $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischer optoakustischer Bildgebung und MRT wurde bei jedem Tier jeweils als Baseline-Messung an Tag 0 vor Therapiebeginn sowie als Follow-up-Messung an Tag 7 nach Therapieende durchgeführt, um das individuelle Ansprechen der Melanom-Xenografts auf die verabreichte Therapie nicht-invasiv zu untersuchen. Dabei wurde zunächst die optoakustische Bildgebung durchgeführt und anschließend die Tiere zur MRT transferiert. Nach Abschluss der Follow-up-Messungen wurden die Tiere unter adäquater inhalativer Isoflurananästhesie euthanasiert. In direktem Anschluss wurden die Tumoren explantiert und ex situ halbiert, wobei eine Hälfte in 10 % Formaldehyd-Lösung fixiert und die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurde. Die darauffolgende multiparametrische immunohistochemische Aufarbeitung umfasste die

Untersuchung der β_3 -Integrin-Expression, der Mikrogefäßdichte (Cluster of Differentiation 31 (CD31)), und der Tumorzellproliferation (Kiel 67 (Ki-67)).

2.1.4. Therapieprotokoll

Zwischen Baseline- und Follow-up-Messung erhielten die Tiere entsprechend ihrer randomisierten Zuteilung eine Woche täglich entweder das Therapeutikum oder das Placebo. Die Therapiegruppe wurde mit einer gewichtsadaptierten BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie behandelt (BRAF-Inhibitor: Encorafenib (Braftovi®): 1,3 mg / kg / Tag; MEK-Inhibitor: Binimetinib (Mektovi®): 0,6 mg / kg / Tag; beide Array BioPharma Inc., Boulder, CO). Die Kontrollgruppe erhielt eine volumenäquivalente Lösung eines Placebos (1 % Carboxymethylcellulose und 0,5 % Tween-80 in doppelt destilliertem Wasser). Die Applikation der BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie beziehungsweise des Placebos erfolgte einmal täglich oral über eine Knopfkanüle.

2.2. Bildgebung

2.2.1. Optoakustische Bildgebung

Die Untersuchungen fanden im Labor für Experimentelle Radiologie der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Jens Rieke) statt. Die optoakustische Bildgebung wurde mit einem speziell für die Kleintierbildgebung entwickelten System (Multispektrale optoakustische Tomographie (MSOT) inVision 256-TF, iThera Medical GmbH, München, Deutschland) durchgeführt [60]. Ein durchstimmbarer, optisch parametrischer Oszillator, der von einem Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granatlasers gepumpt wurde erzeugte Anregungspulse mit einer Dauer von 9 ns, bei Wellenlängen von 680 nm bis 980 nm, einer Frequenz von 10 Hz, einer Wellenlängen-Abstimmgeschwindigkeit von 10 ms und einer Spitzenpulsenenergie von 100 mJ bei 730 nm. Der Laserstrahl war mit einem zehnamigen Faserbündel verbunden. Davon waren jeweils fünf auf beiden Seiten des Detektorbereichs angeordnet und erzeugten einen gleichmäßig ausgeleuchteten ringförmigen Lichtstreifen von ca. 8 mm Breite auf dem Tier. Zur Ultraschalldetektion wurden 256 torusförmig fokussierte Ultraschallwandler mit einer Mittelfrequenz von 5 MHz (60 % Bandbreite) verwendet. Die konkav mit einem Krümmungsradius vom 4 cm angeordneten Detektoren deckten einen Winkel von 270 ° ab. Die Tiere wurden bei den folgenden $n = 11$ Wellenlängen gescannt: 700 nm, 730 nm, 740 nm, 750 nm, 760 nm, 770 nm, 780 nm, 790 nm, 800 nm, 850 nm und 900 nm. Um das Bild für eine bestimmte Wellenlänge anzufertigen, wurden die Signale von $n = 10$ aufeinanderfolgenden Pulsen gemittelt, was eine zeitliche Auflösung von 11 s pro Zyklus ergab. Dadurch konnte der Effekt von Schwankungen des Pulses und Bewegungsartefakte minimiert werden.

Zusätzlich konnte durch die Mittelung mehrerer Messungen das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden.

Die Mäuse befanden sich in Bauchlage in einer Halterung, die zur Messung in einen Wassertank eingetaucht wurde. Um den direkten Kontakt zwischen Wasser und den Tieren zu vermeiden, waren diese mit einer dünnen Polyethylenfolie umwickelt, wodurch die akustische Koppelung weiterhin gewährleistet war (siehe Abb. 7). Durch eine Atemmaske wurden die Tiere dabei mit Sauerstoff und Anästhesie versorgt (2,5 % bei einer Flussrate von 1,0 L 100 % O₂ / min für die Einleitung sowie auch für die Aufrechterhaltung). Während der Untersuchung wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur durch die Temperierung des umgebenden Wassers gewärmt. Das Tier konnte in seiner Position verschoben werden, um die Messung verschiedener Schichten zu ermöglichen. Nachdem die Tiere in das System eingeführt worden waren, wurden die Positionen der kranialen und kaudalen Enden des Tumors identifiziert, um die Start- und Stoppstellen der Messung (typischerweise ungefähr 1 cm) zu markieren. Der Tumor wurde in 0,5 mm-Schritten untersucht. Die Tiere wurden vor und 5 Stunden nach intravenöser Injektion des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen-Fluoreszenztracers (IntegriSense 750, 4 nmol; Perkin Elmer, Waltham, MA) via Schwanzvenenkatheter untersucht.

Die Daten wurden mit der Software ViewMSOT (iThera Medical GmbH, München, Deutschland) unter Verwendung der Rückprojektions-Methode rekonstruiert. Die rekonstruierten nativen Bilder vor der Applikation des Kontrastmittels wurden verwendet, um mit einem *adaptive-match-filter-spectral-unmixing*-Algorithmus ein Modell des optoakustischen Profils des Tumors zu erstellen [79]. Diese Modelle des

Tumorprofilen wurden dann für jedes einzelne Tier mit den 5-Stunden-Scans verglichen, wobei Änderungen, die mit der Aufnahme des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen-Fluoreszenztracers korrelierten, gezeigt wurden. *Regions of interest* (ROI) wurden manuell auf den Bildern der einzelnen Wellenlängen gezeichnet, um den Tumor zu identifizieren und das durchschnittliche durch *spectral unmixing* gefilterte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Signal wurde in *arbitrary units* (a.u.) quantifiziert. Hintergrundbilder bei einer einzelnen Wellenlänge wurden in Graustufen dargestellt. Zusätzlich wurde dabei ein Frangi-Filter angewendet, um die anatomische Darstellung zu verbessern [80].



Abb. 6: System zur multispektralen optoakustischen Tomographie von Kleintieren: MSOT inVision 128 (iThera Medical GmbH, München, Deutschland). Für die vorliegende Studie wurde die Version inVision 256-TF verwendet. (mit Genehmigung der iThera Medical GmbH).



Abb. 7: Das Versuchstier wird vor der Untersuchung unter Anästhesie in der Halterung platziert und mit Polyethylenfolie umwickelt. (mit Genehmigung der iThera Medical GmbH).

2.2.2. Magnetresonanztomographie

T2-gewichtete MRT-Untersuchungen wurden für die anatomische Kolokalisation und die morphologische Bewertung des Ansprechens des Tumors auf die Therapie (MR-Volumetrie) durchgeführt. Die MRT-Aufnahmen wurden an einem klinischen Gerät mit einer Feldstärke von 3 Tesla (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) an der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke) akquiriert. Zur Untersuchung befanden sich die Tiere einzeln in einer speziellen Halterung, die in einer 16-Kanal Handgelenks-Spule (Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) positioniert wurde. Die Tiere wurden in Bauchlage mit dem Kopf voraus gescannt und befanden sich während der gesamten Untersuchung unter Anästhesie (2,5 % bei einer Flussrate von 1,0 L 100 % O₂ / min für die Einleitung sowie auch für die Aufrechterhaltung), welche über einen in den Untersuchungsraum eingeführten Verlängerungsschlauch mit Beatmungsmaske verabreicht wurde. Zur

Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde die Untersuchungshalterung gewärmt. Wassergefüllte Testkörper, die zusätzlich in der Gantry platziert wurden, dienten der örtlichen Registrierung des Versuchstieres. Zuerst wurden Localizer-Sequenzen durchgeführt, um Informationen über die räumliche Positionierung des Tieres im MRT zu erhalten und folglich das Messfeld zu definieren. Anschließend wurden für die morphologische Beurteilung der Tumoren hochaufgelöste T2-gewichtete Sequenzen in axialer und coronarer Schnittführung durchgeführt. Bei der dafür verwendeten 2D-Turbo-Spin-Echo-Sequenz lagen folgenden Sequenzdetails vor: Repetitionszeit (TR = *Time of repetition*): 5470 ms, Echozeit (TE = *Time of echo*): 91 ms, planare Auflösung: 0,3 x 0,3 mm², Matrixgröße: 192 x 192, Schichtdicke: 1,5 mm. Die MR-Volumetrie wurde auf einem externen Arbeitsplatz mit PMI (*Platform for Research in Medical Imaging*)-Version 0.4 durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine im *Josef Lissner Laboratory for Biomedical Imaging* der Klinik und Poliklinik für Radiologie des Klinikums der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Jens Rieke) mit IDL Version 6.4 (ITT Visual Information Systems, Boulder, CO) eigens entwickelte Post-Processing-Software [81]. Für die Bestimmung des Tumolvolumens wurde in den T2-gewichteten Datensätzen unter verblindeten Untersucherbedingungen sowohl in den Baseline- als auch in den Follow-up-Aufnahmen alle den Tumor enthaltenden Voxel Schicht für Schicht markiert und so mit Hilfe der Software das entsprechende Volumen berechnet. Durch den Vergleich zwischen dem Tumolvolumen der Baseline- und der Follow-up-Messung für jedes Tier wurde das Tumorgrößenwachstum bestimmt.

2.2.3. Planare Ganztier-Kryofluoreszenz-Bildgebung

Um die Biodistribution des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers zu visualisieren, wurden planare Kryofluoreszenzbilder angefertigt. Dieses Verfahren bietet

die Möglichkeit zur Validierung von nicht invasiven Methoden. Die Akquisition der Bilder erfolgte wie in [82] beschrieben. Zusammenfassend wurden dabei mit Hilfe eines Kryomikrotoms axiale Ganzkörperschnitte des gefrorenen Tieres angefertigt und dann durch ein Bildgebungssystem, das vereinfacht aus einer Lichtquelle, verschiedenen Filtern und einer hochauflösenden Kamera besteht, Farb- und Fluoreszenzbilder aufgenommen.

2.2.4. In-vivo-Blocking-Versuche

Kompetitive In-vivo-Blocking-Versuche wurden durchgeführt, um die Zielstrukturspezifität des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers zu bestätigen. Um die Bindung zu blockieren wurde der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor-Antagonist Cilengitid (800 μg ; Selleck Chemicals, Houston, TX) 15 min vor der Injektion des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers intravenös injiziert. Mit Hilfe der optoakustischen Bildgebung wurde dann wie oben beschrieben das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Signal quantifiziert. Anschließend wurden die Signalintensitäten von Tieren, bei denen die Bindung des Kontrastmittels durch Applikation von Cilengitid geblockt wurde, mit denen von nicht geblockten Tieren entsprechend verglichen.

2.3. Histologie und Immunhistochemie

Zur Validierung der Effekte der BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie wurden immunhistochemische Untersuchungen als Referenzstandard durchgeführt. Dazu erfolgten verschiedene Färbungen: β_3 -Integrin zur Quantifizierung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, CD31 zur Quantifizierung der Mikrogefäßdichte und Ki-67 zur

Quantifizierung der proliferierenden Zellen. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die chirurgisch explantierten Tumoren in Formaldehyd (10 %) fixiert. Vor dem Einbetten wurde die Fixierlösung für 4 Stunden unter fließendem Wasser ausgewaschen. Im Anschluss erfolgte die maschinelle Einbettung (Excelsior ES Tissue Processor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) des Tumorgewebes in Paraffin. Dazu wurde das Gewebe mit steigenden Konzentrationen von Ethanol (je 1 mal 90 min in 70 %, 120 min in 80 % und 150 min 96 % und 3 mal in 100 % (60 min, 120 min, 240 min)) dehydriert und nach der Entfernung der Restflüssigkeit mittels Toluol (100 %) mit Paraffin ausgegossen. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 3 µm dicke Schnitte des in Paraffin eingebetteten Gewebes angefertigt. Diese wurden in warmen Wasser gestreckt, für die Mikroskopie auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40 °C im Inkubator getrocknet. Nach Vorwärmen der Schnitte für 10 min bei 60 °C wurden diese zur Entparaffinierung zweimal fünf min in NeoClear (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und anschließend zur Rehydrierung in einer absteigenden Reihe von Alkohol (2 mal 3 min in 100 %, je 1 mal 3 min in 96 %, 80 % und 70 % Ethanol) inkubiert. Danach wurden sie zweimal fünf min in doppelt destilliertem Wasser gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in 0,1 M Citrat-Puffer bei einem pH-Wert von 6,0 mit 600 W für 20 min in der Mikrowelle bestrahlt, danach erfolgte das Abkühlen für weitere 20 min bei Raumtemperatur. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend den einzelnen immunhistochemischen Färbungen.

2.3.1. β_3 -Integrin

Zur Quantifizierung der β_3 -Integrin-Expression wurde der aus Kaninchen gewonnene monoklonale anti- β_3 -Integrin Antikörper ab179473 (Abcam, Cambridge, Großbritannien)

verwendet. Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnitte für zweimal fünf min in 1 x Tris-buffered saline (TBS)-Triton gewaschen. Dann wurde die Gewebeschnitte für zwei Stunden in einer feuchten Kammer mit einer Blockierungslösung (10 % Normal Goat Serum, 1 % Bovines Serumalbumin (BSA) in 1 x TBS) inkubiert. Nach kurzem Trocknen der Schnitte erfolgte die Inkubation mit dem primären anti- β_3 -Integrin-Antikörper ab179473 in einer Verdünnung von 1 : 500 in 1 x PBS mit 1 % BSA verdünnt über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Zur Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt nur mit 1 x PBS mit 1 % BSA inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal fünf min in 1 x TBS-Triton gewaschen. Zum Abblocken der Peroxidase erfolgte die Inkubation mit 0,3 % H₂O₂ in TBS-Triton für 15 min. Nach anschließendem kurzen Waschen in TBS-Triton erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (SignalStain Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit) #8114 von Cell Signaling Technology, Danvers, MA) in einer feuchten Kammer für eine Stunde. Nach erneutem kurzen Waschen in PBS wurden die Schnitte zur Färbung für maximal 10 min mit 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC Chromogen aus dem DAKO-Kit EnVision+ System HRP, DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) inkubiert, und anschließend kurz mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun für 12 Sekunden und Bläuen unter fließendem Wasser für 10 min. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern in Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Die erstellten Präparate wurden mikroskopisch untersucht und die β_3 -Integrin-Expression wurde in zehn randomisierten *High-power fields* bei 200-facher Vergrößerung unter Verwendung der Applikation ImageJ („Fiji“-Version, www.fiji.sc) quantifiziert.

2.3.2. CD31

Zur Quantifizierung der Mikrogefäßdichte wurde der aus Kaninchen gewonnene polyklonale Anti-CD31-Antikörper ab28364 (Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnitte jeweils für 10 min in destilliertem Wasser und 1 x 0,05 % TBS-Tween gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Anti-CD31-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 50 über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Auch hier wurde je ein Präparat zur Negativkontrolle angefertigt. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zweimal zehn min mit 1 x 0,05 % TBS-Tween gewaschen bevor sie für 30 min mit dem sekundären Antikörper aus dem DAKO Envision+ System HRP-Kit in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen für zweimal zehn min mit 1 x 0,05 % TBS-Tween wurden die Schnitte mit 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC Chromogen aus dem DAKO Envision+ System HRP-Kit) für 5 - 30 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 10 min mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun für 10 Sekunden und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern in Kaisers Glycerin Gelatine eingebettet. Die erstellten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht. Pro Präparat wurden die positiv gefärbten Gefäßanschnitte in zehn randomisierten *High-power fields* bei 200-facher Vergrößerung manuell ausgezählt.

2.3.3. Ki-67

Zur Quantifizierung der proliferierenden Tumorzellen wurde der aus Kaninchen gewonnene monoklonale Anti-Ki-67 Antikörper ab16667 (Abcam, Cambridge,

Großbritannien) verwendet. Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnitte jeweils für 10 min in destilliertem Wasser und 1 x 0,05 % TBS-Tween gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit gebrauchsfertiger Peroxidase Lösung (DAKO Envision+ System HRP-Kit). Nachdem die Schnitte zweimal zehn min mit 1 x 0,05 % TBS-Tween gewaschen wurden, erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Anti-Ki-67-Antikörper ab16667 in einer Verdünnung von 1: 100 in 0,05 M Tris HCl (pH 7,5 und 1 % BSA). Zur Negativkontrolle wurde auch jeweils ein Schnitt nur mit 0,05 M Tris HCl (pH 7,5 und 1 % BSA) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zweimal für zehn min mit 1 x 0,05 % TBS-Tween gewaschen bevor sie für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen, gebrauchsfertige Lösung aus dem DAKO Envision+ System HRP-Kit) inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen für zweimal zehn min mit 1 x 0,05 % TBS-Tween wurden die Schnitte mit 3-3' Diaminobenzidin (DAB Chromogen aus dem DAKO Envision+ System HRP-Kit) je nach Farbintensität für 5 - 30 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 10 min mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) für 10 Sekunden und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern in Kaisers Glycerin Gelatine eingebettet. Die erstellten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica DM 2500, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Pro Präparat wurden die positiv gefärbten Zellkerne in zehn randomisierten *High-power fields* bei 200-facher Vergrößerung durch eine eigens programmierte MATLAB Applikation am Computer quantifiziert.

2.4. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS (Version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) durchgeführt. Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine placebokontrollierte, randomisierte Studie. Die Auswertung erfolgte anhand von nicht parametrischen Tests, da aufgrund der niedrigen Tierzahl nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden darf. Die Messwerte werden mit SI Einheiten und die Mittelwerte jeweils auch \pm Standardabweichung (95 % Konfidenzintervalle) angegeben. Die statistische Untersuchung der Messwerte aus optoakustischer Bildgebung, MRT und Immunhistochemie von Baseline und Follow-up wurde im Intra- und Intergruppenvergleich durchgeführt. Für Intragruppenvergleiche der Messwerte im Therapieverlauf zwischen Baseline und Follow-up wurde der Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewendet. Um Intergruppenvergleiche von Messwerten zwischen Therapie- und Kontrollgruppe aufzustellen wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben herangezogen. Anhand des Vergleichs zwischen den Baseline-Parametern wurde sichergestellt, dass nicht schon vor der Intervention signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen existierten, und durch den Vergleich der Follow-up-Parameter wurden die therapieinduzierten Unterschiede untersucht. Für die Korrektur der α -Niveaus wurde bei den konfirmatorischen Tests ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifisches optoakustisches Signal Follow-up vs. Baseline; β_3 -Integrin in der Therapie- vs. der Kontrollgruppe) die Formel nach Bonferroni-Holm angewendet und adjustierte α' -Niveaus definiert ($\alpha = 0.05$). Für alle anderen Tests wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$ festgelegt, da diese als explorativ betrachtet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Bildgebung

3.1.1. Optoakustische Bildgebung

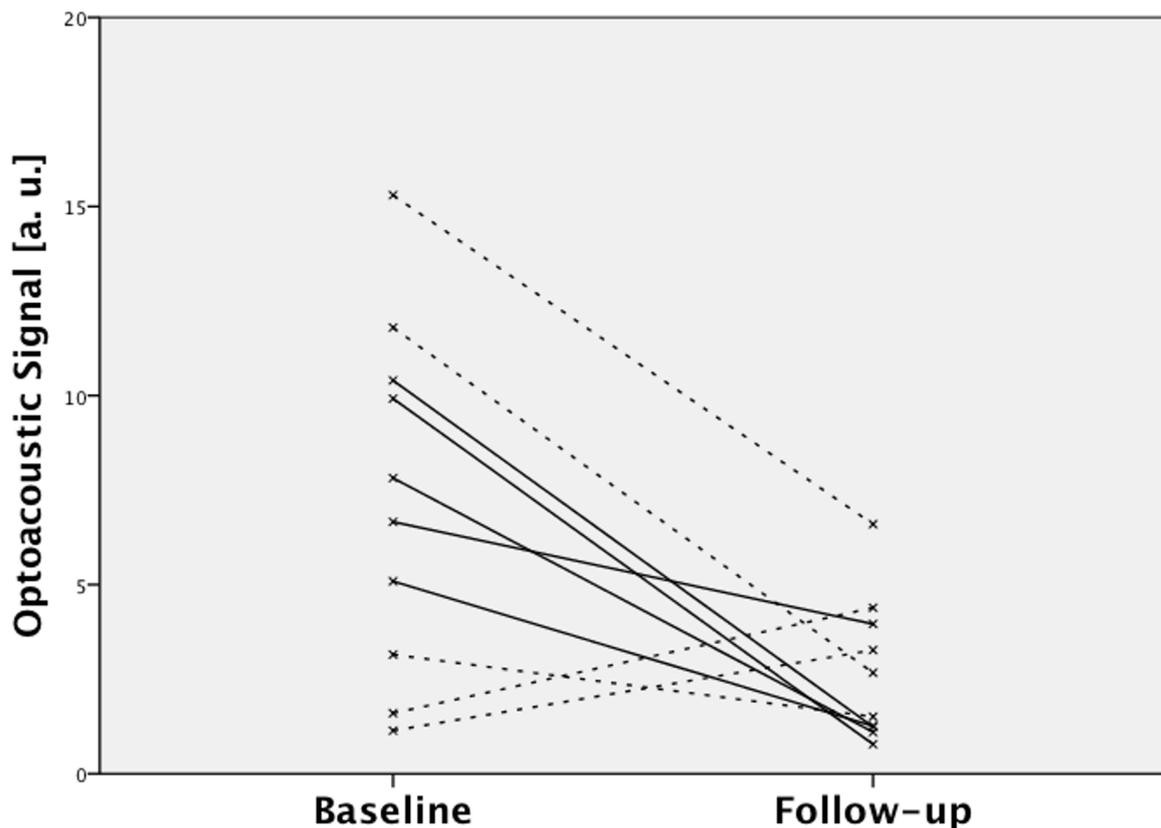


Abb. 8: Optoakustische Signalintensitäten zur Baseline- und Follow-up Untersuchung. Die Therapiegruppe ist durch die durchgehenden, die Kontrollgruppe durch die punktierten Linien dargestellt. Es zeigt sich eine unidirektionale Abnahme der Signalintensitäten in der Therapiegruppe bei einer heterogenen Entwicklung der Werte in der Kontrollgruppe [73].

Das mittlere $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Signal zeigte unter Therapie eine signifikante Reduktion mit einer unidirektionalen Abnahme bei allen Tieren (Tag 0: $7,98 \pm 2,22$ a. u. vs. Tag 7: $1,67 \pm 1,30$ a. u.; p-Wert = 0,043). In der Kontrollgruppe wurde keine statistisch signifikante Änderung des mittleren optoakustischen Signals beobachtet (Tag 0: $6,60 \pm 6,51$ a. u. vs. Tag 7: $3,67 \pm 1,93$ a. u.; p = 0,500). Hier zeigten die Einzelwerte eine heterogene Entwicklung. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in den

mittleren optoakustischen Signalen der Baseline-Untersuchung zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe (Therapiegruppe $7,98 \pm 2,22$ a. u. vs. Kontrollgruppe $6,60 \pm 6,51$ a. u.; $p = 0,690$). Die einzelnen optoakustischen Signalintensitäten der Baseline- und der Follow-up-Untersuchungen sind in Abb. 8 und Tabelle (Tab.) 1 dargestellt.

Tiernummer	Gruppe	Signal _{Baseline}	Signal _{Follow-up}	Vol _{Baseline}	Vol _{Follow-up}	Δ Vol
1	Therapie	10,40	1,24	23,5	190,7	167,7
2	Therapie	9,92	0,78	32,0	143,4	111,4
3	Therapie	7,82	1,10	51,1	144,8	93,7
4	Therapie	5,09	1,26	38,6	88,1	49,5
5	Therapie	6,66	3,96	30,0	144,2	114,2
MW \pm SA	Therapie	$7,98 \pm 2,22^*$	$1,67 \pm 1,30^*$	35 ± 10	142 ± 36	107 ± 43
1	Kontrolle	15,30	6,60	117,1	244,6	127,5
2	Kontrolle	11,80	2,67	60,4	120,4	60,0
3	Kontrolle	3,15	1,51	57,4	205,7	148,3
4	Kontrolle	1,14	3,27	43,5	197,3	153,8
5	Kontrolle	1,60	4,39	29,4	101,8	72,4
MW \pm SA	Kontrolle	$6,60 \pm 6,51$	$3,67 \pm 1,93$	62 ± 33	174 ± 54	112 ± 39
MW = Mittelwert ; SA = Standardabweichung						
Vol = Volumen						
*Statistisch signifikant						

Tab. 1: Optoakustisches Tumorsignal und Tumorumfänge aller Tiere aus der Therapie- und Kontrollgruppe zur Baseline- (Tag 0) und Follow-up-Untersuchung (Tag 7) sowie die Änderung der Tumorumfänge im Verlauf der Behandlung. Die optoakustischen Signalintensitäten werden in a. u., die Tumorumfänge in mm^3 angegeben [73].

Abb. 9 zeigt das optoakustische Bild bei einer Wellenlänge von 850 nm für die anatomische Orientierung in Graustufen sowie das durch *spectral unmixing* gefilterte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Signal. Abb. 10 zeigt repräsentative farbkodierte Tumor-Maps von Tieren aus der Therapie- und der Kontrollgruppe jeweils vor und nach der Behandlung.

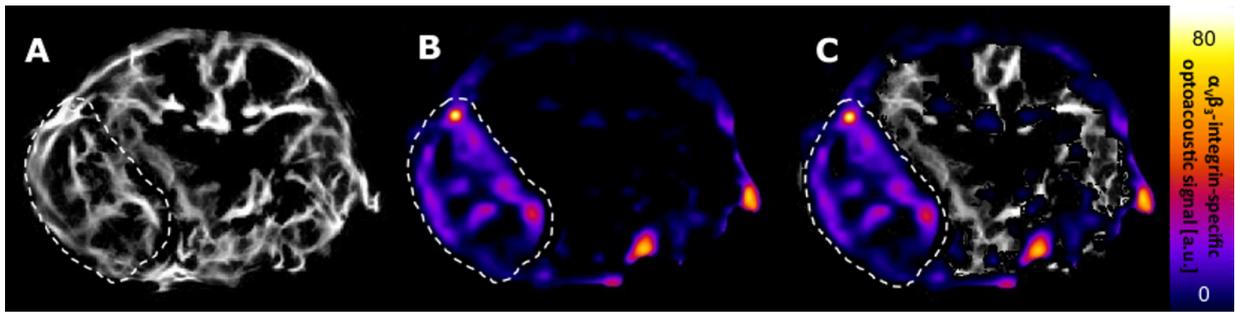


Abb. 9: Axialer Schnitt der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Bildgebung einer BALB/c Nacktmaus. Die Tumorränder sind durch die weiß punktierten Linien gekennzeichnet. A: Optoakustisches Bild bei einer Wellenlänge von 850 nm zur anatomischen Orientierung. B: Durch *spectral unmixing* gefiltertes $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifisches Signal. C: Fusioniertes Bild aus A + B (Bildregistrierung). Die Abbildung zeigt die tumorspezifische Bindung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers. Die Bilder stammen von der Follow-Up Untersuchung von Tier Nummer 1 aus der Kontrollgruppe in Tab.1 [73].

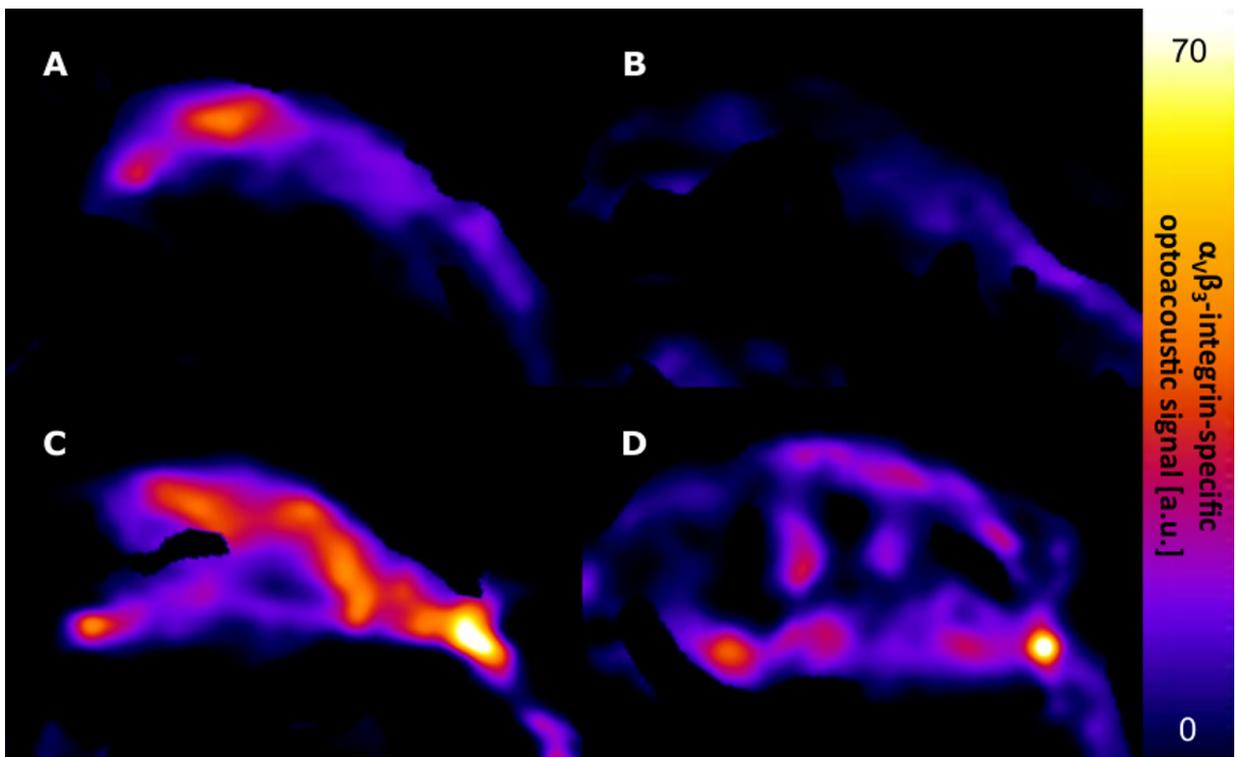


Abb. 10: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifisches optoakustisches Signal vor und nach Behandlung einer BALB/c Nacktmaus aus der Therapie- und der Kontrollgruppe. A: Therapiegruppe Baseline. B: Therapiegruppe Follow-up. C: Kontrollgruppe Baseline. D: Kontrollgruppe Follow-up. Die Abbildung zeigt die signifikante Abnahme des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen optoakustischen Signals durch die BRAF-MEK-Inhibitor-Therapie (B vs. A) wohingegen sich in der Kontrollgruppe keine signifikante Änderung beobachten lässt (D vs. C). Bild A und B stammen von Tier Nummer 3 aus der Therapiegruppe, C und D von Tier Nummer 1 aus der Kontrollgruppe in Tab. 1 [73].

Abb. 11 demonstriert das Ergebnis der kompetitiven Blocking-Versuche, die die Zielspezifität des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Fluoreszenztracers bestätigten. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Kontrastmittel zeigte eine tumorspezifische Bindung bei allen Tieren. Abb. 12 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Biodistribution des Fluoreszenztracers.

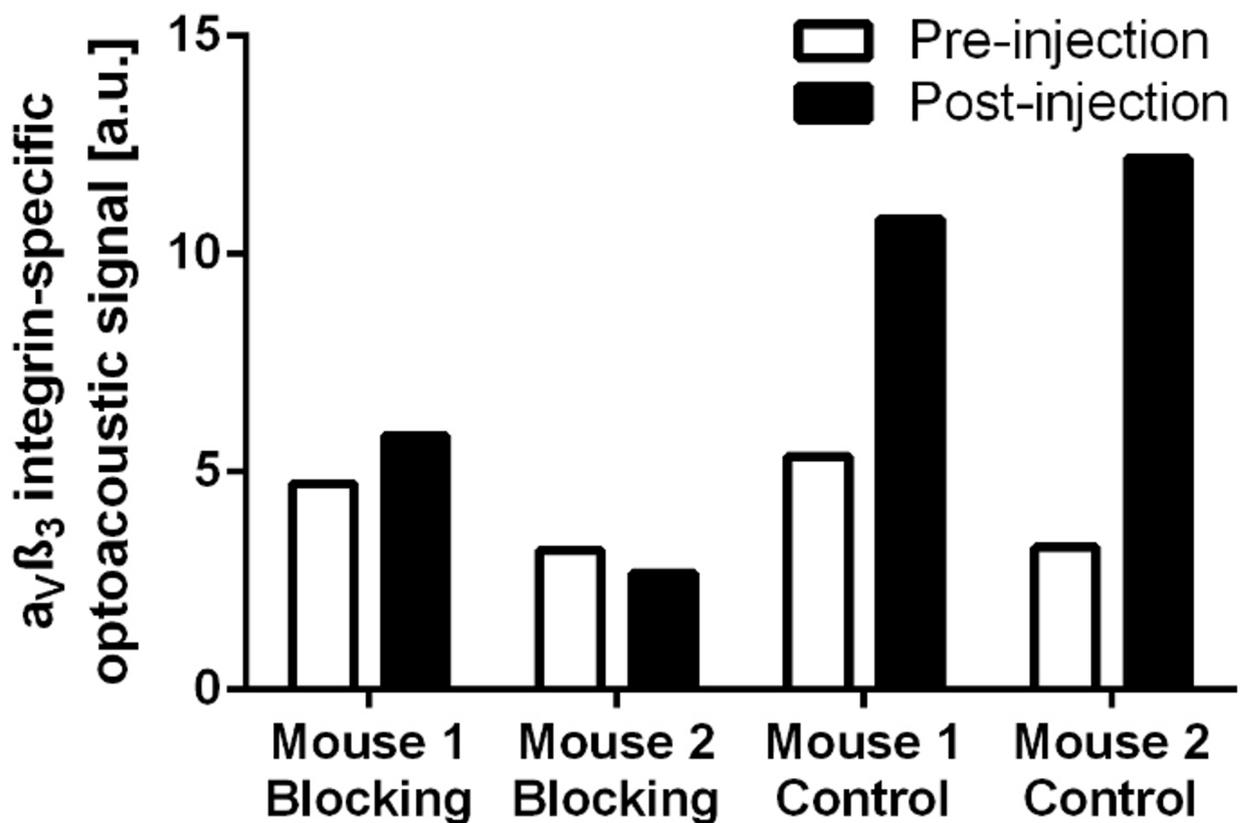


Abb. 11: In-vivo-Blocking-Versuche. Kompetitive In-vivo-Blocking-Versuche mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorantagonisten Cilengitid bestätigten die spezifische Bindung des Fluoreszenztracers an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Die Abbildung zeigt den signifikanten Anstieg des optoakustischen Tumorsignals in den nicht geblockten Tieren, wohingegen sich keine signifikante Änderung bei den geblockten Tieren beobachten lässt [73].

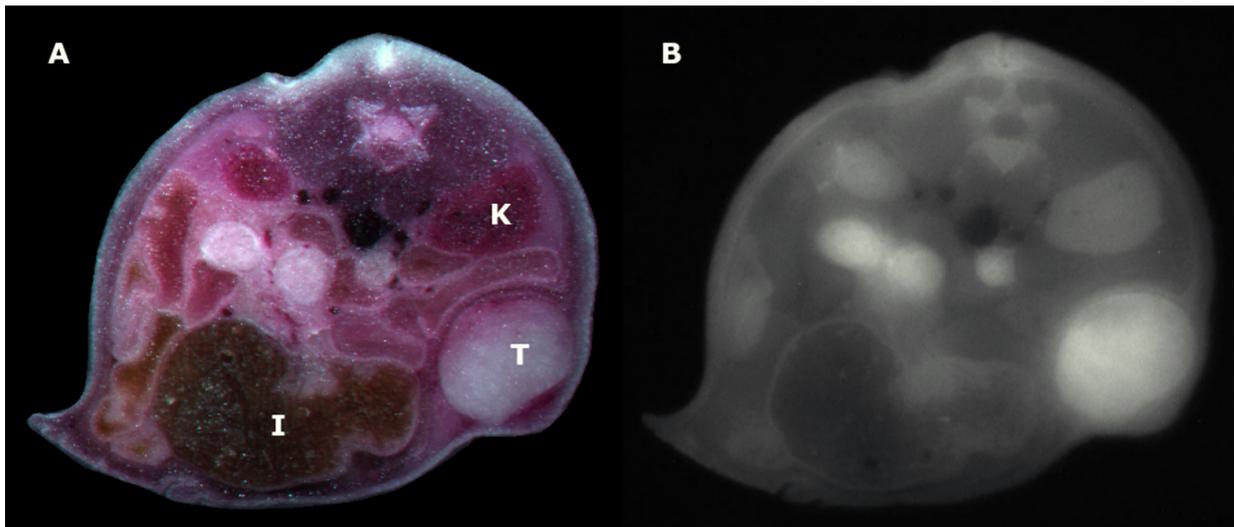


Abb. 12: Axialer Schnitt der Ganztier-Kryofluoreszenz-Bildgebung einer BALB/c Nacktmaus. A: Makroskopisches Farbbild. B: Fluoreszenzbild. T: Tumor; K: Nieren; I: Darm. Der Fluoreszenztracer zeigt eine tumorspezifische Bindung. Analog zu den optoakustischen in vivo Bildern zeigt sich nur ein geringes Hintergrundsignal im Darm [73].

3.1.2. Morphologische Beurteilung des Therapieansprechens

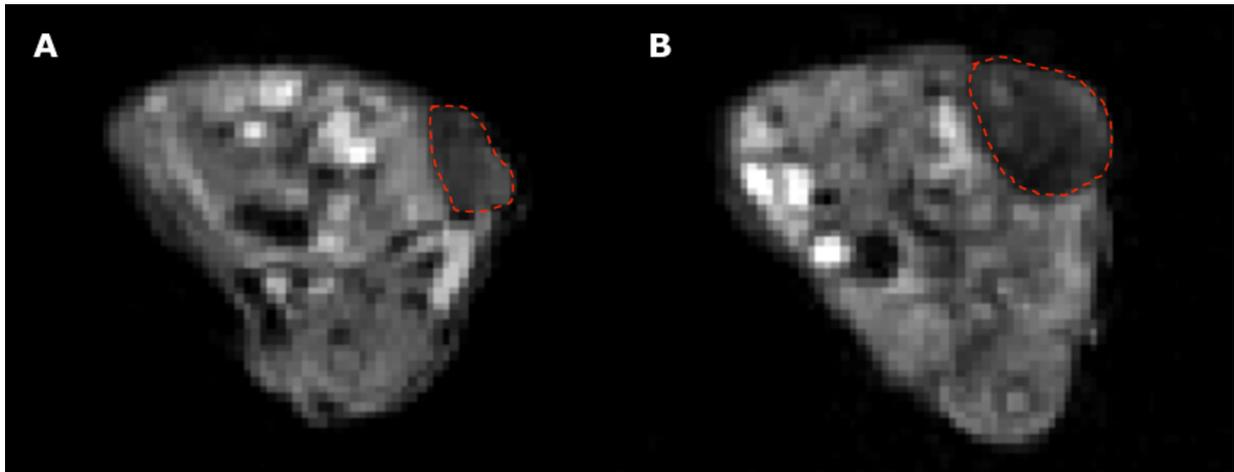


Abb. 13: Repräsentative morphologische axiale T2-gewichtete MRT Aufnahmen der Abdominalregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe der Baseline- und Follow-up-Untersuchung. Die Ränder des über der linken Flanke implantierten Tumors sind durch die rot punktierten Linien dargestellt. Die Abbildung zeigt den Anstieg des Tumolvolumens von der Baseline- zur Follow-up-Untersuchung [73].

Die Tumolvolumina zeigten sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe einen Anstieg ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($\Delta_{\text{Volumen Therapie: } + 107 \pm 42 \text{ mm}^3$ vs. $\Delta_{\text{Volumen Kontrolle: } + 112 \pm 44 \text{ mm}^3$; $p = 0,841$). Es gab keinen Unterschied in den Ausgangs-Tumolvolumina zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe (Volumen Therapiegruppe Baseline: $35 \pm 10 \text{ mm}^3$ vs. Volumen Kontrollgruppe Baseline: $62 \pm 33 \text{ mm}^3$; $p = 0,151$). Die individuellen Tumolvolumina bei der Baseline- und bei der Follow-up-Untersuchung sind in Tab. 1 und Abb. 14 dargestellt. Abb. 13 zeigt repräsentative T2-gewichtete Bilder eines Tieres aus der Kontrollgruppe bei der Baseline- und der Follow-up Untersuchung.

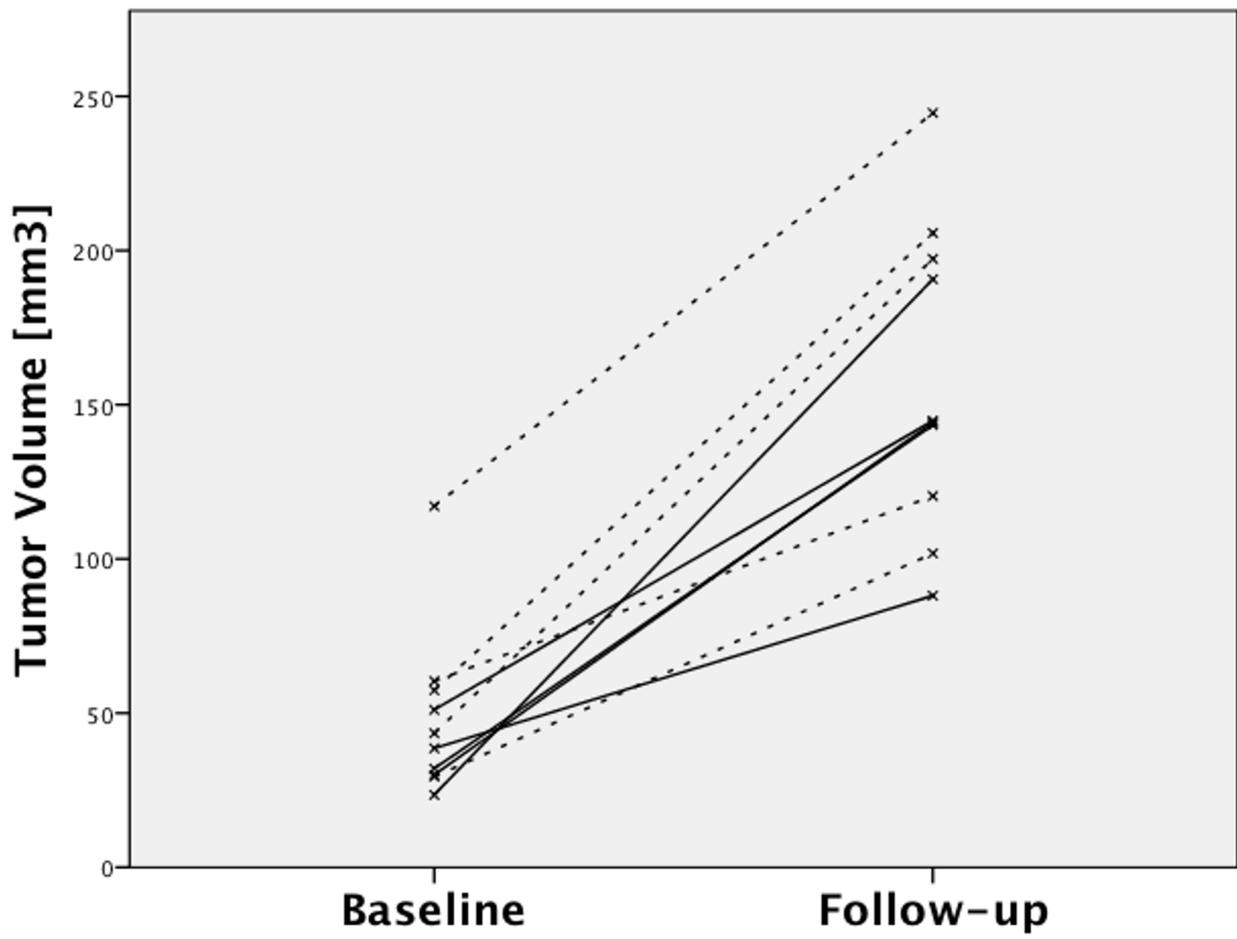


Abb. 14: Tumolvolumina zur Baseline- und Follow-up-Untersuchung. Die Therapiegruppe ist durch die durchgehenden, die Kontrollgruppe durch die punktierten Linien dargestellt. Sowohl in der Therapie- als auch der Kontrollgruppe zeigte sich ein Anstieg der Tumolvolumina im Behandlungsverlauf ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen [73].

3.2. Immunhistochemie

Tiernummer	Gruppe	β_3 -Integrin	CD31	Ki-67
1	Therapie	0,172	133	2.937
2	Therapie	0,178	123	2.587
3	Therapie	0,209	123	2.713
4	Therapie	0,205	93	6.389
5	Therapie	0,218	121	5.001
MW \pm SA	Therapie	0,20 \pm 0,02*	119 \pm 15*	3.925 \pm 1.693
6	Kontrolle	0,358	300	4.623
7	Kontrolle	0,475	254	6.508
8	Kontrolle	0,371	371	4.700
9	Kontrolle	0,352	282	6.000
10	Kontrolle	0,402	252	7.078
MW \pm SA	Kontrolle	0,39 \pm 0,05*	292 \pm 49*	5.782 \pm 1.092
MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung * Statistisch signifikant Einheiten: positiv gefärbte Gefäße (CD31) / positiv gefärbte Zellkerne (Ki-67) / Färbeintensität (β_3 -Integrin) pro High-power field (Mittelwerte aus jeweils 10 High-power fields pro Tier)				

Tab. 2: Immunhistochemische Parameter der untersuchten Tiere aus Therapie- und Kontrollgruppe [73].

Bei jeder der $n = 10$ BALB/c Nacktmäuse wurden drei verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt: β_3 -Integrin, CD31 und Ki-67. Die individuellen Werte der immunhistochemischen Parameter jedes Tieres aus der Therapie- und der Kontrollgruppe sind in Tab. 2 dargestellt. Abb. 15 zeigt repräsentative Ausschnitte der Färbungen β_3 -Integrin, CD31 und Ki-67 von Tieren aus der Therapie- und der Kontrollgruppe.

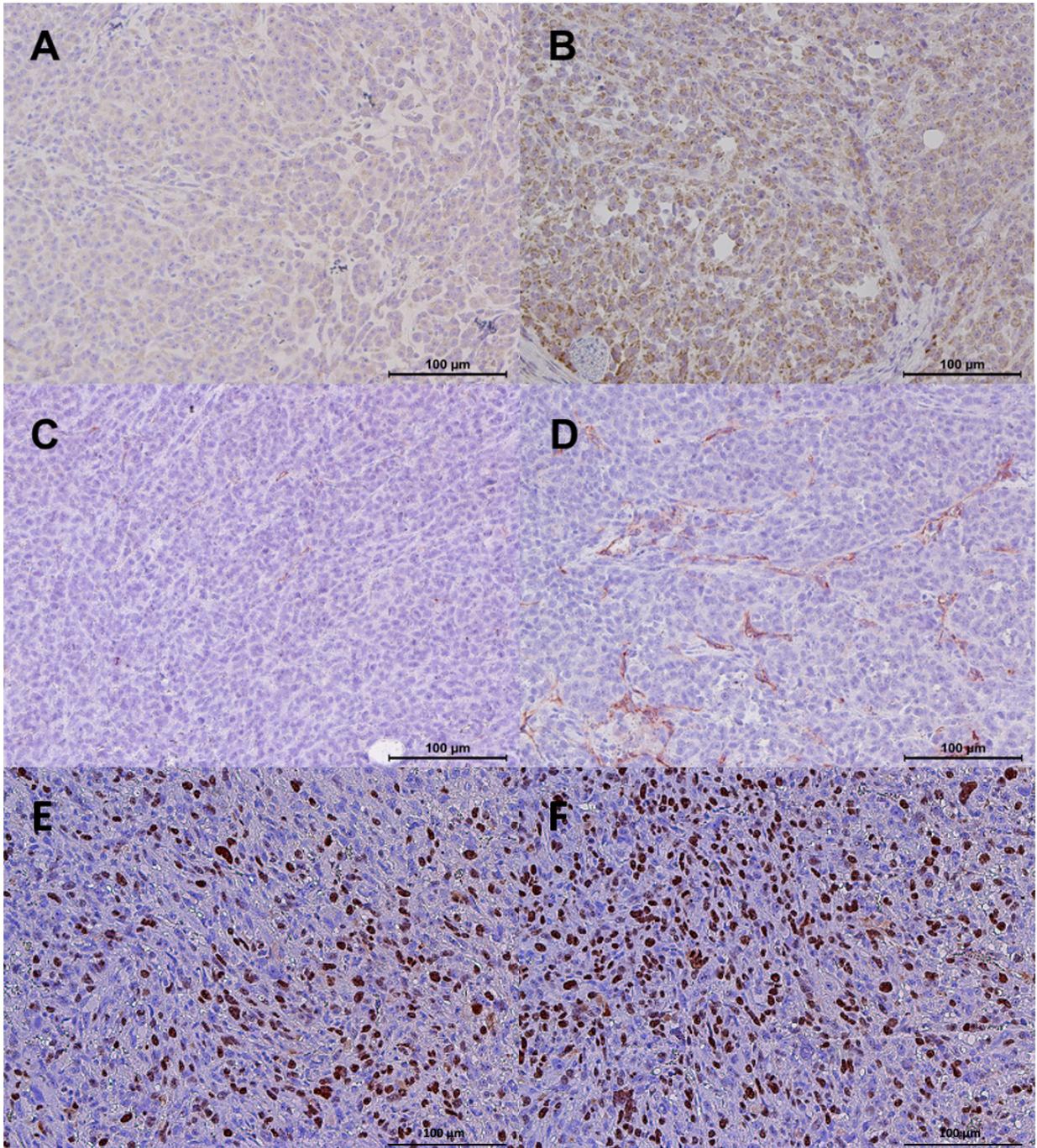


Abb. 15: Immunhistochemische Schnitte von repräsentativen Tumorabschnitten von Tieren aus Therapie- und Kontrollgruppe im Vergleich. A: β_3 -Integrin, Therapiegruppe. B: β_3 -Integrin, Kontrollgruppe. C: CD31, Therapie. D: CD31, Kontrollgruppe. E: Ki-67, Therapiegruppe. F: Ki-67, Kontrollgruppe. Die Abbildung zeigt die signifikant niedrigere β_3 -Integrin-Expression (A vs. B; $p = 0.008$), die signifikant geringere Mikrogefäßdichte (CD31, C vs. D; $p = 0.008$), und die statistisch nicht signifikante verminderte Tumorzellproliferation (Ki-67, E vs. F; $p = 0.151$) in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [73].

3.2.1. β_3 -Integrin

In Korrelation mit den Ergebnissen der optoakustischen Bildgebung war die β_3 -Integrin-Expression in der Therapiegruppe statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (β_3 -Integrin-Expression Therapiegruppe: $0,20 \pm 0,02$ vs. $0,39 \pm 0,05$; $p = 0,008$).

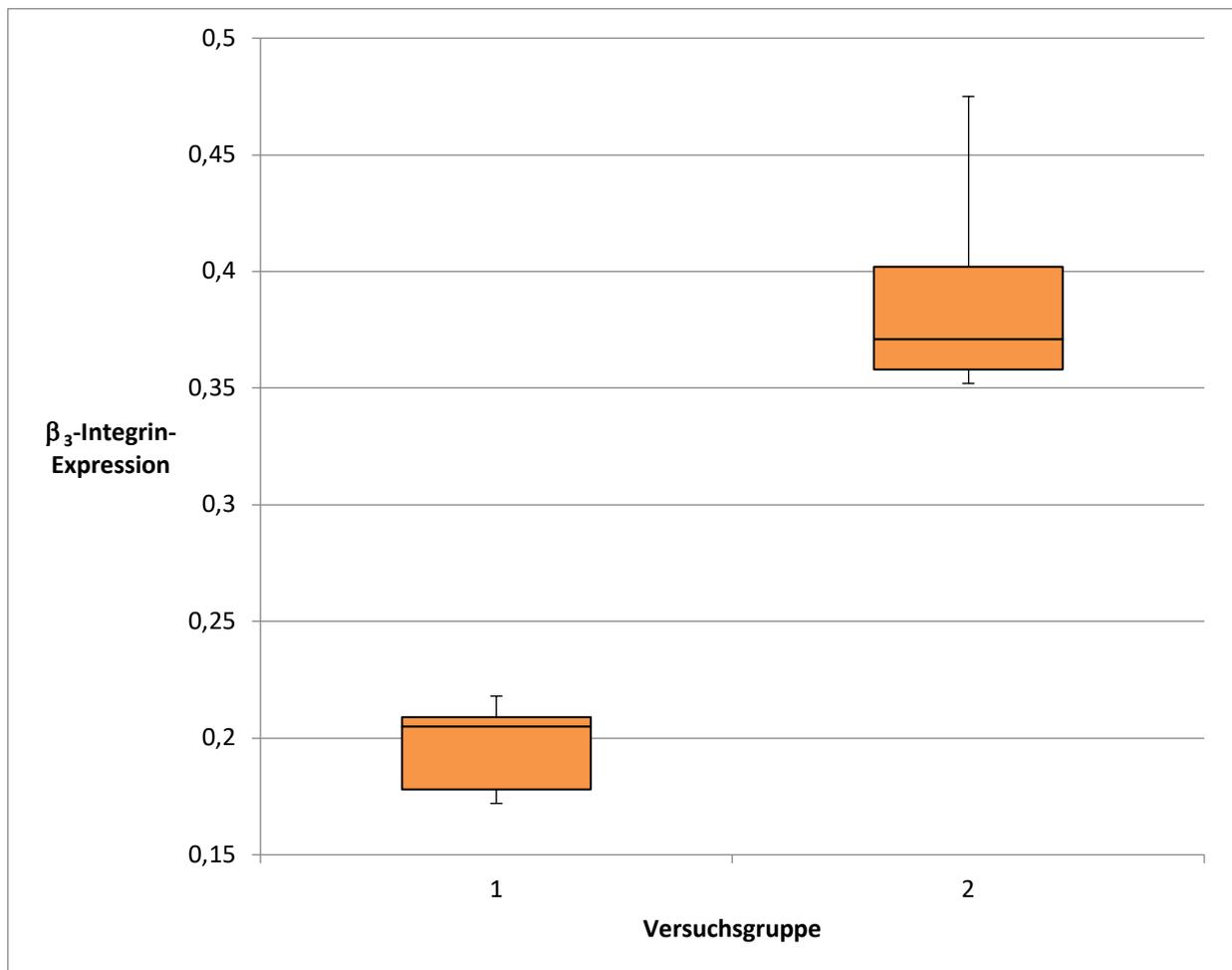


Abb. 16: Darstellung der β_3 -Integrin-Expression mit Boxplot Diagrammen. Auf der X-Achse Versuchsgruppe: 1 = Therapiegruppe, 2 = Kontrollgruppe; auf der Y-Achse: β_3 -Integrin-Expression (Färbeintensität pro High-power field (Mittelwerte aus jeweils 10 High-power fields pro Tier)).

3.2.2. CD31

Wir beobachteten eine statistisch signifikant niedrigere Mikrogefäßdichte in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Therapiegruppe: 119 ± 15 vs. Kontrollgruppe: 292 ± 49 ; $p = 0,008$).

3.2.3. Ki-67

Im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigte sich eine statistisch nicht signifikante geringere Tumorzellproliferation in der Therapiegruppe (Therapiegruppe: 3.925 ± 1.693 vs. Kontrollgruppe: 5.782 ± 1.092 ; $p = 0,151$).

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten wir $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische molekulare optoakustische Bildgebung in Korrelation zu morphologischer MRT und dem immunhistochemischen Referenzstandard zum nichtinvasiven in vivo Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanom-Xenograft-Modell der Maus. Zur Validierung der Bildgebung wurden sowohl in vivo als auch ex vivo Verfahren angewendet. Die optoakustische Bildgebung zeigte eine statistisch signifikante Reduktion des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Signals unter der BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie. Für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Signal in der Kontrollgruppe konnte hingegen keine statistisch signifikante Änderung gezeigt werden. Das Ergebnis der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Bildgebung konnte ex vivo durch die immunhistochemische Untersuchung validiert werden, die analog dazu in der Therapiegruppe eine signifikant niedrigere β_3 -Integrin-Expression und Mikrogefäßdichte, sowie eine statistisch nicht signifikant niedrigere Tumorzellproliferation als in der Kontrollgruppe zeigte. Die Zielstrukturspezifität des verwendeten Fluoreszenztracers wurde auf zwei Wegen bestätigt. In vivo demonstrierten Blocking-Versuche die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Spezifität und ex vivo konnte die planare Ganztier-Kryofluoreszenz-Bildgebung die tumorspezifische Bindung zeigen. Bei der morphologischen Untersuchung der Tumoren mit MRT zeigte sich im Verlauf der Behandlung sowohl in der Therapie- als auch der Kontrollgruppe ein Anstieg der Tumorumfänge ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen [73].

4.1. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung zum Therapiemonitoring

Zwei vorangehende Studien von Kazmierczak et al. untersuchten ebenfalls den Einsatz von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischer Bildgebung mit PET und MRT zum Monitoring einer gezielten Therapie im Tiermodell. Hierbei wurde das Monitoring der frühen Effekte einer antiangiogenetischen Therapie mit dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Inhibitor Bevacizumab im humanen Mammakarzinom-Modell der Maus evaluiert. Analog zu unserer Studie gab es eine Therapie- und eine Kontrollgruppe und die Bildgebung zum Monitoring erfolgte jeweils vor und nach einer einwöchigen Gabe der Therapie oder des Placebos. Zur Korrelation mit der Bildgebung wurden die Tumoren ebenfalls explantiert und immunhistochemisch analysiert [72, 83]. In der ersten dieser Studien erfolgte die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung mit MRT mit einem auf superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln basierenden Kontrastmittel. Neben der R2-Relaxationsrate als Messgröße für die Kontrastmittelbindung im Tumor wurde auch das Tumolvolumen im Verlauf bestimmt [83]. In der zweiten Studie erfolgte die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung mit PET und dem Radiotracer ^{68}Ga -TRAP-(RGD)₃ mit Bestimmung der *Target-to-Background Ratio* als Messgröße für die Tracerbindung. Zusätzlich wurde eine native CT zur anatomischen Koregistrierung und Tumorumetrie durchgeführt. Zur Vermeidung kompetitiver Bindungseffekte zwischen dem Radiotracer und dem Antikörper für die immunhistochemische Färbung wurde die immunhistochemische Untersuchung der Tumoren innerhalb einer dedizierten Gruppe von Tieren durchgeführt, denen kein Radiotracer appliziert wurde. Um die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bindung des Radiotracers ^{68}Ga -TRAP-(RGD)₃ zu bestätigen, wurden die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren mit einem spezifischen Antikörper blockiert und anschließend Untersuchungen mit Autoradiographie und optischer Bildgebung durchgeführt [72]. Analog zu den

Ergebnissen unserer Studie zeigte sich eine signifikant verminderte Bindung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Kontrastmittels bei korrespondierend immunhistochemisch signifikant reduzierter $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapiegruppe. Ebenso zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung der Tumervolumina zwischen den beiden Gruppen [72, 83]. Auch Cui et al. untersuchten den Einsatz von MRT mit einem auf superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln basierenden Kontrastmittel zur $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Bildgebung. Ziel der Studie war es, die frühen antiangiogenetischen Effekte der Therapie mit einem Endostatin im humanen Nasopharynxkarzinom-Modell der Maus zu beurteilen. Analog zu unserer Studie gab es eine Therapie- und Kontrollgruppe, für die Baseline- und Follow-up-Bildgebung durchgeführt wurden. Um die longitudinale Entwicklung der frühen Therapieeffekte zu untersuchen, wurden hier für die Follow-up-Bildgebung zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt, an Tag 4 und Tag 14 nach Therapiebeginn. Zur Validierung der Bildgebung erfolgte im Anschluss ebenfalls eine immunhistochemische Untersuchung der Tumoren. Sowohl die Ergebnisse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen MRT zu beiden Follow-up-Zeitpunkten, als auch korrelierend dazu der immunhistochemischen Untersuchung zeigten signifikante Effekte der antiangiogenetischen Therapie. Während durch die molekulare Bildgebung bereits an Tag 4 Therapieeffekte detektiert werden konnten, zeigten sich erst ab Tag 8 signifikante Unterschiede des Tumervolumens, das regelmäßig durch Vermessung mit einer Schieblehre bestimmt wurde [84]. Des Weiteren verglichen Cui et al. in einer anderen Studie funktionelle ^{18}F -FDG-PET mit molekularer $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischer PET mit dem Tracer ^{18}F -AlF-NOTA-PRGD2 zum Monitoring einer Endostatin-Therapie im humanen Nasopharynxkarzinom-Xenograft-Modell. Nach der Baseline-Untersuchung wurden die Tiere der Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-up an Tag 2, 4, 7 und 14 untersucht, zusätzlich wurden die Tumoren

immunhistochemisch untersucht. Dabei konnten die therapieinduzierten Veränderungen früher detektiert werden als mit der ^{18}F -FDG-PET, die bei der Darstellung des Glukosemetabolismus keinen tumorspezifischen Tracer verwendet. Während für ^{18}F -FDG erst ab Tag 7 eine signifikant reduzierte Traceraufnahme in der Therapiegruppe gezeigt werden konnte, war dies für ^{18}F -AIF-NOTA-PRGD2 bereits ab Tag 2 möglich. Visuell stellte sich die Verteilung des Tracers in der Therapiegruppe als Ausdruck der Tumornekrose im Verlauf immer heterogener dar, während sich diese in der Kontrollgruppe relativ homogen zeigte. Erst ab Tag 8 zeigte sich das Tumolvolumen in der Therapie- verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Auch immunhistochemisch konnte ab Tag 2 eine signifikante Angiogeneseinhibition in der Therapiegruppe validiert werden. Zusätzlich konnte nach Therapieende eine signifikante positive Korrelation zwischen der Aufnahme von ^{18}F -AIF-NOTA-PRGD2 und der Mikrogefäßdichte und eine signifikant niedrigere Mikrogefäßdichte in der Therapie- verglichen mit der Kontrollgruppe gezeigt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die antiangiogenetische Therapie im Untersuchungszeitraum zwar zu keiner Größenabnahme und erst relativ spät zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums führt, obwohl bereits frühzeitig eine effektive Inhibition der Gefäßbildung stattfindet [85]. In diesem Kontext bestehen für ^{18}F -FDG als Tracer zwei wesentliche Limitationen. Zum einen die unspezifische Aufnahme von nicht malignen Geweben wie beispielsweise Darm oder entzündlichen und granulomatösen Erkrankungen. Zum anderen kann sie für hochdifferenzierte Tumoren, die zum Teil keinen signifikant gesteigerten Glukosemetabolismus aufweisen, nicht ausreichend sensitiv sein [86].

Klinisch untersuchte eine Studie von Arrieta et al. bereits den Einsatz von molekularer Bildgebung mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Zielstruktur zum Monitoring einer zielgerichteten

molekularen Tumorthherapie. Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge erhielten eine Zweitlinientherapie mit dem antiangiogenetischen Angiokinase-Inhibitor Nintedanib plus dem Chemotherapeutikum Docetaxel. Vor Therapiebeginn und nach zwei Therapiezyklen wurden eine PET/CT mit dem Radiotracer ^{68}Ga -DOTA-E-[c(RGDfK)]₂ und die Abnahme von Blutproben mit Bestimmung von Angiogenesefaktoren durchgeführt. Als klinische Endpunkte wurden Überleben und Therapieresponse bestimmt. Die Daten von 31 Patienten konnten ausgewertet werden. Der Lungentumor/Milz-maximaler-Standardaufnahmewert-Index und das Lungentumorvolumen zeigten eine signifikante Reduktion unter der Therapie. Außerdem wurde gezeigt, dass Patienten mit einer größeren Reduktion des maximalen Standardaufnahmewerts des Lungentumors und des Lungentumor/Milz-maximaler-Standardaufnahmewert-Index eher ein längeres Gesamtüberleben haben. Dass Patienten mit einem größeren Baseline-Lungentumorvolumen eher ein längeres progressionsfreies Überleben zeigten, wurde auf die höhere Wirksamkeit aufgrund der größeren Angriffsfläche der zielgerichteten Therapie bei initial höherer Tumorlast zurückgeführt. Zusätzlich zeigte eine größere Reduktion des Lungentumorvolumens eine Assoziation mit einer höheren Krankheitskontrollrate. Es zeigte sich auch eine Korrelation zwischen dem Baseline-Tumorvolumen und dem Serumspiegel von VEGF sowie zwischen dem Baseline Lungentumor/Leber-maximaler-Standardaufnahmewert-Index und dem Serumspiegel von *platelet-derived growth factor AB*. Verglichen mit unserer Studie konnten hier durch die zusätzliche Bestimmung der Überlebens- und Therapieresponse-Raten unter anderem auch das prognostische Potential der molekularen Bildgebung demonstriert werden [87].

4.2. Optoakustische Tumorbildgebung und klinische Kontrastmittelanwendung

Im präklinischen Bereich gibt es bereits mehrere Studien, die den Einsatz der optoakustischen Bildgebung mit gezielten Tracern zur Charakterisierung des Tumormikroenvironment in vivo untersuchen [66, 88-91]. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Tracer wurden sowohl mit tomographischen, als auch nicht-tomographischen Systemen im humanen Mammakarzinom-, Glioblastom- und Plattenepithelkarzinommodell in vivo evaluiert [66, 90, 92]. Unsere Studie ergänzt die bestehende Literatur, indem sie einen Ansatz zum multimodalen Therapiemonitoring auf molekularer Ebene mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischer optoakustischer Bildgebung inklusive immunhistochemischer Validierung präsentiert. Somit demonstriert sie das Potential von optoakustischer Bildgebung zum Therapiemonitoring und bildet einen Ausgangspunkt für zukünftige Studien um diese vielversprechende Anwendung auch klinisch zu evaluieren. Bedingt durch die begrenzte Eindringtiefe ins Gewebe, ist das Potential für die klinische Anwendung von optoakustischer Bildgebung vor allem für die Untersuchung von Tumoren und anderen Pathologien, die nahe an der Körperoberfläche liegen besonders groß [73]. Demzufolge gibt es beispielsweise bereits klinische Studien die ihren Einsatz zur Untersuchung des Mammakarzinoms, des Schilddrüsenkarzinoms, entzündlicher Darmerkrankungen, vaskulärer Malformationen oder der Carotisstenose evaluieren [93-97]. Eine klinische Studie von Stoffels et al. untersuchte ebenfalls den Einsatz optoakustischer Bildgebung beim malignen Melanom. Anders als in unserer Studie, bei der die Visualisierung des Tumors durch molekulare Bildgebung mit einem exogenen spezifischen Tracer erreicht wurde, nutzte man hierbei den bedeutenden Vorteil der Optoakustik in der Melanom-Bildgebung, Melanin aufgrund seiner Absorptionseigenschaften auch ohne den Einsatz von exogenen Kontrastmittel detektieren zu können. Das Ziel der Studie war es, die Detektion von Melanommetastasen im Sentinel-Lymphknoten ex- und in vivo, sowie die

Detektion des Sentinel-Lymphknotens nach Injektion von ICG mit optoakustischer Bildgebung zu untersuchen. Sowohl für die in vivo und ex vivo Detektion von Metastasen konnte in Korrelation mit der histologischen Untersuchung eine Sensitivität von 100 % gezeigt werden, wenn auch bei niedriger Spezifität. In Korrelation mit der Lymphszintigraphie konnten 100 % der Sentinel-Lymphknoten detektiert werden. Somit konnte das Potential der optoakustischen Bildgebung zur strahlungsfreien Detektion und nicht invasiven Charakterisierung des Sentinel-Lymphknotens demonstriert werden [98]. Die Anwendung bei amelanotischen Melanomen stellt hier eine Limitation dar, die durch den Einsatz von tumorspezifischen Tracern überwunden werden könnte [98, 99].

Auch ohne den Einsatz von exogenen Kontrastmitteln ist die optoakustische Bildgebung durch die Detektion endogener Absorber in der Lage, neben anatomischen auch funktionelle Informationen zur Charakterisierung von Geweben zu generieren [60-62, 94, 98]. Um jedoch darüber hinaus komplementär molekulare Informationen, wie zum Beispiel den Status von Tumorrezeptoren zu gewinnen, ist auch diese Methode auf exogene zielgerichtete Kontrastmittel angewiesen [67, 68, 73]. Die klinische Translation ist hier allerdings noch unvollständig, denn bisher ist der Gebrauch von gezielten fluoreszierenden Kontrastmitteln beim Menschen nicht ausreichend untersucht und die Datenlage auf diesem Gebiet sehr eingeschränkt [73]. Zumindest im Bereich der unspezifischen Kontrastmittel gibt es mit ICG und Methylenblau (MB) bereits fluoreszierende Substanzen, die sich zur optoakustischen Bildgebung im Nahinfrarotbereich eignen und von der FDA und EMA für die Anwendung am Menschen zugelassen sind [100, 101]. Informationen über tumorspezifische Zielstrukturen können jedoch beide Kontrastmittel aufgrund ihres unspezifischen Verteilungsmusters nicht bieten [101]. Zusätzlich limitieren die sehr kurze Halbwertszeit im menschlichen Blut

von drei bis fünf Minuten, die geringe Photostabilität und die niedrige Löslichkeit von ICG sowie die relative Blauverschiebung des Absorptionsspektrums und die potentiell toxische Wirkung unter intensiver Lichtbestrahlung von MB den Einsatz dieser Kontrastmittel in der optoakustischen Bildgebung [67, 92]. Um das volle Potential der optoakustischen Bildgebung ausschöpfen zu können, müssen die Entwicklung und klinische Translation von gezielten fluoreszierenden Kontrastmitteln im Nahinfrarotbereich weiter voran getrieben, und die Limitationen durch deren Biodistribution und Biokompatibilität im menschlichen Organismus überwunden werden [73, 101, 102].

4.3. Klinische Perspektive im multimodalen Vergleich

Viele der bereits etablierten Bildgebungsmodalitäten wurden zur Charakterisierung des Tumormikroenvironment untersucht. In den meisten Fällen ist die Anwendbarkeit aber durch die hohe Kostenintensität, die Notwendigkeit von exogenen Kontrastmitteln, die fehlende Möglichkeit mehrere Biomarker gleichzeitig zu untersuchen und die niedrige räumliche und zeitliche Auflösung limitiert. Optoakustische Bildgebung könnte einige der bestehenden Limitationen überwinden, und Fortschritte bei der Detektion, der Diagnose, dem Staging und dem Therapiemonitoring von Tumoren bringen, sowie wesentliche Unterstützung bei chirurgischen Resektionen liefern [99, 103]. Durch den Einsatz verschiedener Wellenlängen bei der Akquisition können mehrere pathophysiologische Parameter untersucht und innerhalb der möglichen Gewebetiefe im Zentimeterbereich eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung geboten werden [103]. In der bildgestützten Chirurgie mit zielgerichteten Nahinfrarot-Kontrastmitteln, die mit optischer Bildgebung bereits klinisch demonstriert wurde, könnte die optoakustische Bildgebung größere Gewebetiefen ermöglichen [73, 104].

Welche Rolle optoakustische Bildgebung in der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-gezielten Bildgebung verglichen mit anderen Methoden spielen wird ist noch unklar. Studien haben gezeigt, dass sich auch die PET mit gezielten Radiotracer und die MRT mit gezielten Kontrastmitteln zur nichtinvasiven Untersuchung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Rezeptorstatus eignen [72, 83-85, 87]. Während die PET hierbei eine hohe Sensitivität und Spezifität bietet, können bei der MRT auch zusätzlich anatomische Informationen bereitgestellt werden [105]. Die Tatsache, dass die Eindringtiefe ins Gewebe bei diesen Methoden nicht beschränkt ist, stellt einen bedeutenden Vorteil gegenüber der optoakustischen Bildgebung dar, bei der die Absorption und Streuung von Licht die Darstellung von

tiefere Gewebeabschnitten limitieren [61, 73]. Vor allem in Hinblick auf das Ganzkörper Tumorstaging ist dieser Umstand besonders relevant [73]. Demgegenüber stehen die Vorteile der optoakustischen Bildgebung. Relativ gesehen sind die Kosten gering, außerdem besteht durch mobile Systeme auch die Möglichkeit zur Anwendung am Patientenbett oder im Operationsaal. Im Vergleich zur PET verwendet die optoakustische Bildgebung keine ionisierende Strahlung, was vor allem bei jungen Patienten und wiederholten Untersuchungen, zum Beispiel im Rahmen eines Therapiemonitorings oder regelmäßiger Nachsorgeuntersuchungen, an Bedeutung gewinnt [73].

Zukünftig gut vorstellbar ist die klinische Anwendung von handgeführten optoakustischen Bildgebungssystemen zur Untersuchung von oberflächlich gelegenen Zielstrukturen, sowie die Integration in vorbestehende Ultraschallsysteme [73, 103]. Zielstrukturen könnten zum Beispiel Lymphknoten- oder kutane Metastasen sowie auch Primärtumoren sein. Optimal umgesetzt wäre dies im Rahmen eines multimodalen Bildgebungsprotokolls kombiniert mit anderen etablierten Verfahren wie ^{18}F -FDG-PET/CT oder MRT. Im Rahmen des multimodalen Ansatzes könnte eine Modalität die Limitationen der anderen kompensieren. Dadurch könnten die Effekte einer gezielten Therapie anhand einer Ganzkörperuntersuchung des Tumorrezeptorstatus beurteilt werden. Somit könnten Patienten, die potentiell von der Therapie profitieren identifiziert und von den Non-Respondern unterschieden werden, und dementsprechend ein an den Patienten angepasstes Therapieschema zur Anwendung kommen [73].

5. Limitationen

Bei der vorliegenden Studie gab es mehrere Limitationen. An erster Stelle ist hier die relativ geringe Anzahl an Tieren zu nennen. Zur Validierung der Ergebnisse und der Reproduzierbarkeit der erhobenen Daten müssen die Versuche in einer größeren Kohorte durchgeführt werden [73]. Jedenfalls konnte in einer vorangehenden Studie bereits eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von optoakustischer Kleintierbildgebung gezeigt werden [106]. Die Tatsache, dass es sich hierbei um eine *Proof-of-Principle*-Studie handelt, um quantitative optoakustische Bildgebung zu zwei Zeitpunkten zum Therapiemonitoring im Kleintiermodell des humanen Melanoms zu evaluieren, legitimiert allerdings die verwendete Tierzahl. Die Follow-up Untersuchung sowie die immunhistochemische Untersuchung wurde für alle Tiere nur einmalig und zum selben Zeitpunkt, also nach der konstant gleichen Therapiedauer durchgeführt. Dementsprechend gibt es auch nur Informationen zu den Therapieeffekten zu genau diesem Zeitpunkt. Es können daher keine dezidierten Aussagen darüber getroffen werden, wie sich die BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie davor oder über diesen Zeitraum hinaus ausgewirkt hat. Follow-up Messungen sowie immunhistochemische Untersuchungen zu zusätzlichen Zeitpunkten hätten eine weitreichendere Beurteilung der Entwicklung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression und des entsprechenden optoakustischen Signals im Therapieverlauf erlaubt [73]. Da $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nicht nur von Tumorzellen, sondern in geringerem Maße auch von anderen Geweben, hauptsächlich Organe im Bereich von Abdomen und Becken wie Darm und Leber exprimiert wird, könnte die Detektion von Tumorgewebe mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischer Bildgebung aufgrund des hohen Hintergrundsignals eingeschränkt sein [107]. Demnach kann die Lokalisation des Tumors die Quantifizierbarkeit des Signals beeinträchtigen, wobei das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische optoakustische Signal aufgrund der relativ hohen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression

dieses Melanommodells mit der A375 Zelllinie, in diesem Fall bei allen Tieren eine gute Darstellung des Tumors gegen den Hintergrund erlaubte [73].

6. Conclusio

In der vorliegenden experimentellen Studie ermöglichte die optoakustische Bildgebung das in vivo Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen Melanommodell in der Maus in Korrelation zu morphologischen Kriterien des Therapieansprechens und dem immunhistochemischen Referenzstandard. Die Ergebnisse dieser Studie stützen die Hypothese, dass therapieinduzierte Veränderungen auf molekularer Ebene auch ohne eine gleichzeitige entsprechende Größenänderung des Tumors auftreten. Es bestärkt die Aussage der bestehenden Literatur, dass eine rein morphologische Beurteilung vor allem die frühzeitigen Effekte der zielgerichteten molekularen Therapien nur unvollständig abbildet, und daher für ein präzises Therapiemonitoring nur eingeschränkt geeignet ist [46, 47]. Hierdurch unterstreicht unsere Studie die Bedeutung der Etablierung funktioneller und molekularer Bildgebungsverfahren und der Entwicklung neuer Imaging Biomarker zum Monitoring molekularer Krebstherapien. Unsere Studie demonstrierte, dass optoakustische Bildgebung mit einem gezielten fluoreszierenden Tracer zum quantitativen zweizeitigen Monitoring einer molekularen Krebstherapie in vivo geeignet ist und die morphologische Beurteilung des Therapieansprechens durch quantitative Informationen bezüglich des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus ergänzen kann [73].

7. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019.*
2. *Barnes, B., et al., Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016, Robert Koch-Institut.*
3. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs, Langversion 1. 1, 2014, AWMF Registernummer: 032/0520L, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am 12.03.2020).*
4. *Pleasant, E.D., et al., A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature, 2010. 463(7278): p. 191-6.*
5. *Dulon, M., et al., Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. J Clin Epidemiol, 2002. 55(11): p. 1075-81.*
6. *Armstrong, B.K. and A. Kricger, The epidemiology of UV induced skin cancer. J Photochem Photobiol B, 2001. 63(1-3): p. 8-18.*
7. *Gandini, S., et al., Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. Eur J Cancer, 2005. 41(1): p. 45-60.*
8. *Garbe, C., et al., Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. Eur J Cancer, 2016. 63: p. 201-17.*
9. *Hussein, M.R., Extracutaneous malignant melanomas. Cancer Invest, 2008. 26(5): p. 516-34.*
10. *Komatsubara, K.M., et al., Advances in the Treatment of Advanced Extracutaneous Melanomas and Nonmelanoma Skin Cancers. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017. 37: p. 641-650.*

11. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors*. Eur J Cancer, 2005. 41(14): p. 2040-59.
12. Raimondi, S., et al., *MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2008. 122(12): p. 2753-60.
13. Schaffer, J.V. and J.L. Bolognia, *The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond*. Arch Dermatol, 2001. 137(11): p. 1477-85.
14. Rivers, J.K., *Is there more than one road to melanoma?* Lancet, 2004. 363(9410): p. 728-30.
15. Eggermont, A.M., A. Spatz, and C. Robert, *Cutaneous melanoma*. Lancet, 2014. 383(9919): p. 816-27.
16. Bishop, J.N., et al., *Management of familial melanoma*. Lancet Oncol, 2007. 8(1): p. 46-54.
17. Sosman, J.A., et al., *Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib*. N Engl J Med, 2012. 366(8): p. 707-714.
18. Krengel, S., A. Hauschild, and T. Schafer, *Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review*. Br J Dermatol, 2006. 155(1): p. 1-8.
19. Garbe, C., et al., *Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society*. J Invest Dermatol, 1994. 102(5): p. 695-9.
20. Tucker, M.A., J.D. Boice, Jr., and D.A. Hoffman, *Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Connecticut, 1935-82*. Natl Cancer Inst Monogr, 1985. 68: p. 161-89.

21. Balch, C.M., et al., *Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification*. J Clin Oncol, 2009. 27(36): p. 6199-6206.
22. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.2, 2019, AWMF Registernummer: 032/0240L, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (abgerufen am: 12.03.2020).*
23. 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.
24. Balch, C.M. and N. Cascinelli, *Sentinel-node biopsy in melanoma*. N Engl J Med, 2006. 355(13): p. 1370-1.
25. Morton, D.L., et al., *Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma*. N Engl J Med, 2006. 355(13): p. 1307-1317.
26. Ascierto, P.A., et al., *MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study*. Lancet Oncol, 2013. 14(3): p. 249-56.
27. Carvajal, R.D., et al., *KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma*. Jama, 2011. 305(22): p. 2327-34.
28. Nagaraja, V. and G.D. Eslick, *Is complete lymph node dissection after a positive sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma always necessary? A meta-analysis*. Eur J Surg Oncol, 2013. 39(7): p. 669-80.
29. Guo, Y.J., et al., *ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis*. Exp Ther Med, 2020. 19(3): p. 1997-2007.

30. Meier, F., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma*. *Front Biosci*, 2005. 10: p. 2986-3001.
31. Zhao, Y. and A.A. Adjei, *The clinical development of MEK inhibitors*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. 11(7): p. 385-400.
32. Amaral, T., et al., *The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition*. *Euro. J. Cancer*, 2017. 73: p. 85-92.
33. Yadav, V., et al., *Co-targeting BRAF and cyclin dependent kinases 4/6 for BRAF mutant cancers*. *Pharmacol Ther*, 2015. 149: p. 139-149.
34. Shain, A.H., et al., *The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions*. *N Engl J Med*, 2015. 373(20): p. 1926-36.
35. Maldonado, J.L., et al., *Determinants of BRAF mutations in primary melanomas*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(24): p. 1878-90.
36. Chapman, P.B., et al., *Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation*. *N. Engl. J. Med.*, 2011. 364(26): p. 2507-2516.
37. Flaherty, K.T., et al., *Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma*. *N. Engl. J. Med.*, 2012. 367(2): p. 107-114.
38. Manzano, J.L., et al., *Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma*. *Ann Transl Med*, 2016. 4(12): p. 237.
39. Sullivan, R.J. and K.T. Flaherty, *Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma*. *Euro J Cancer*, 2013. 49(6): p. 1297-1304.
40. da Silveira Nogueira Lima, J.P., et al., *A systematic review and network meta-analysis of immunotherapy and targeted therapy for advanced melanoma*. *Cancer Med*, 2017. 6(6): p. 1143-1153.

41. Shirley, M., *Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals*. *Drugs*, 2018. 78(12): p. 1277-1284.
42. Dummer, R., et al., *Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2018. 19(5): p. 603-615.
43. Dummer, R., et al., *Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2018. 19(10): p. 1315-1327.
44. Dummer, R., et al., *Results of COLUMBUS Part 2: A phase 3 trial of encorafenib (ENCO) plus binimetinib (BINI) versus ENCO in BRAF-mutant melanoma*. *Ann Oncol*, 2017. 28(suppl_5): p. mdx377.002-mdx377.002.
45. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. *Curr Drug Discov Technol*, 2015. 12(1): p. 3-20.
46. Desai, I.M.E., et al., *Beyond RECIST: Molecular and functional imaging techniques for evaluation of response to targeted therapy*. *Cancer Treat. Rev.*, 2009. 35(4): p. 309-321.
47. Teng, F.F., et al., *New strategy for monitoring targeted therapy: molecular imaging*. *Int J Nanomedicine*, 2013. 8: p. 3703-13.
48. Widakowich, C., et al., *Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers*. *Oncologist*, 2007. 12(12): p. 1443-55.
49. 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.
50. Ganten, M.K., T.M. Ganten, and H.P. Schlemmer, *Radiological monitoring of the treatment of solid tumors in practice*. *Rofo*, 2014. 186(5): p. 466-73.

51. Juweid, M.E. and B.D. Cheson, *Positron-Emission Tomography and Assessment of Cancer Therapy*. N Engl J Med, 2006. 354(5): p. 496-507.
52. Riedl, C.C., et al., *Comparison of FDG-PET/CT and contrast-enhanced CT for monitoring therapy response in patients with metastatic breast cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2017. 44(9): p. 1428-1437.
53. Borchmann, P., et al., *PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group*. Lancet, 2018. 390(10114): p. 2790-2802.
54. Stroobants, S., et al., *¹⁸F-FDG-Positron emission tomography for the early prediction of response in advanced soft tissue sarcoma treated with imatinib mesylate (Glivec)*. Eur J Cancer, 2003. 39(14): p. 2012-20.
55. Kazmierczak, Philipp (2018): *Untersuchung funktioneller und molekularer Imaging Biomarker zum Monitoring zielgerichteter Tumortherapien im Tiermodell*. Habilitationsschrift, LMU München: Medizinische Fakultät.
56. Lencioni, R. and J.M. Llovet, *Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2010. 30(1): p. 52-60.
57. Choi, H., *Response evaluation of gastrointestinal stromal tumors*. Oncologist, 2008. 13 Suppl 2: p. 4-7.
58. 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.
59. Cheson, B.D., *Staging and response assessment in lymphomas: the new Lugano classification*. Chin Clin Oncol, 2015. 4(1): p. 5.

60. Morscher, S., et al., *Semi-quantitative Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) for volumetric PK imaging of gastric emptying*. Photoacoustics, 2014. 2(3): p. 103-110.
61. Ntziachristos, V. and D. Razansky, *Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT)*. Chem Rev, 2010. 110(5): p. 2783-94.
62. Zackrisson, S., S. van de Ven, and S.S. Gambhir, *Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging*. Cancer Res, 2014. 74(4): p. 979-1004.
63. Ma, R., et al., *Multispectral optoacoustic tomography (MSOT) scanner for whole-body small animal imaging*. Opt Express, 2009. 17(24): p. 21414-21426.
64. Wang, L.V. and S. Hu, *Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs*. Science, 2012. 335(6075): p. 1458-62.
65. Bell, A.G., *On the production of sound by light*. Am. J. Sci., 1880. 3(20): p. 305-324.
66. Herzog, E., et al., *Optical Imaging of Cancer Heterogeneity with Multispectral Optoacoustic Tomography*. Radiology, 2012. 263(2): p. 461-468.
67. Weber, J., P.C. Beard, and S.E. Bohndiek, *Contrast agents for molecular photoacoustic imaging*. Nat Methods, 2016. 13: p. 639.
68. Gujrati, V., A. Mishra, and V. Ntziachristos, *Molecular imaging probes for multi-spectral optoacoustic tomography*. Chem Commun (Camb), 2017. 53(34): p. 4653-4672.
69. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, *Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis*. Science, 1994. 264(5158): p. 569-71.
70. Gaertner, F.C., M. Schwaiger, and A.J. Beer, *Molecular imaging of $\alpha_v\beta_3$ expression in cancer patients*. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2010.

71. Beer, A.J. and M. Schwaiger, *PET imaging of $\alpha_v\beta_3$ expression in cancer patients*. *Methods Mol Biol*, 2011. 680: p. 183-200.
72. Kazmierczak, P.M., et al., *^{68}Ga -TRAP-(RGD) $_3$ Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer*. *PLoS One*, 2016. 11(12): p. e0168248.
73. Kazmierczak, P.M., et al., *Integrin-targeted quantitative optoacoustic imaging with MRI correlation for monitoring a BRAF/MEK inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma*. *PLoS One*, 2018. 13(10): p. e0204930.
74. Estrada, Y., J. Dong, and L. Ossowski, *Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation*. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 2009. 22(1): p. 66-76.
75. Elder, D.E., et al., *Neoplastic progression and prognosis in melanoma*. *Semin Cutan Med Surg*, 1996. 15(4): p. 336-48.
76. Mahabeleshwar, G.H. and T.V. Byzova, *Angiogenesis in melanoma*. *Semin oncol*, 2007. 34(6): p. 555-565.
77. Hsu, M.Y., et al., *Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma*. *Am J Pathol*, 1998. 153(5): p. 1435-42.
78. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. 51(5): p. 1417-23.
79. Tzoumas, S., et al., *Unmixing Molecular Agents From Absorbing Tissue in Multispectral Optoacoustic Tomography*. *IEEE Trans Med Imaging*, 2014. 33(1): p. 48-60.
80. Wang, D., et al., *Deep tissue photoacoustic computed tomography with a fast and compact laser system*. *Biomed Opt Express*, 2017. 8(1): p. 112-123.

81. Sourbron, S., et al., *Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI*. Magn Reson Med, 2009. 62(1): p. 205-17.
82. Sarantopoulos, A., G. Themelis, and V. Ntziachristos, *Imaging the Bio-Distribution of Fluorescent Probes Using Multispectral Epi-Illumination Cryoslicing Imaging*. Mol Imaging Biol, 2011. 13(5): p. 874-885.
83. Kazmierczak, P.M., et al., *$\alpha_v\beta_3$ -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.
84. Cui, Y., et al., *Noninvasive monitoring of early antiangiogenic therapy response in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model using MRI with RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Int J Nanomedicine, 2016. 11: p. 5671-5682.
85. Cui, Y., et al., *The feasibility of ^{18}F -AlF-NOTA-PRGD2 PET/CT for monitoring early response of Endostar antiangiogenic therapy in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model compared with ^{18}F -FDG*. Oncotarget, 2016. 7(19): p. 27243-54.
86. Cai, W., S. Sam Gambhir, and X. Chen, *Multimodality tumor imaging targeting integrin $\alpha_v\beta_3$* . Biotechniques, 2005. 39(6 Suppl): p. S14-25.
87. Arrieta, O., et al., *Response Assessment of $(^{68}\text{Ga})\text{-DOTA-E-[c(RGDfK)](2)$ PET/CT in Lung Adenocarcinoma Patients Treated with Nintedanib Plus Docetaxel*. J Nucl Med, 2018. 59(3): p. 403-409.
88. Xie, B., et al., *Optoacoustic Detection of Early Therapy-Induced Tumor Cell Death Using a Targeted Imaging Agent*. Clin Cancer Res, 2017. 23(22): p. 6893-6903.
89. Kimbrough, C.W., et al., *Orthotopic pancreatic tumors detected by optoacoustic tomography using Syndecan-1*. J Surg Res, 2015. 193(1): p. 246-54.

90. Haedicke, K., et al., *Sonophore labeled RGD: a targeted contrast agent for optoacoustic imaging*. *Photoacoustics*, 2017. 6: p. 1-8.
91. Hudson, S.V., et al., *Targeted noninvasive imaging of EGFR-expressing orthotopic pancreatic cancer using multispectral optoacoustic tomography*. *Cancer Res*, 2014. 74(21): p. 6271-9.
92. Capozza, M., et al., *Photoacoustic imaging of integrin-overexpressing tumors using a novel ICG-based contrast agent in mice*. *Photoacoustics*, 2018. 11: p. 36-45.
93. Diot, G., et al., *Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) of Human Breast Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2017. 23(22): p. 6912-6922.
94. Knieling, F., et al., *Multispectral Optoacoustic Tomography for Assessment of Crohn's Disease Activity*. *N Engl J Med*, 2017. 376(13): p. 1292-1294.
95. Roll, W., et al., *Multispectral optoacoustic tomography of benign and malignant thyroid disorders - a pilot study*. *J Nucl Med*, 2019.
96. Masthoff, M., et al., *Use of Multispectral Optoacoustic Tomography to Diagnose Vascular Malformations*. *JAMA Dermatol*, 2018. 154(12): p. 1457-1462.
97. Ivankovic, I., et al., *Real-time Volumetric Assessment of the Human Carotid Artery: Handheld Multispectral Optoacoustic Tomography*. *Radiology*, 2019. 291(1): p. 45-50.
98. Stoffels, I., et al., *Metastatic status of sentinel lymph nodes in melanoma determined noninvasively with multispectral optoacoustic imaging*. *Sci Transl Med*, 2015. 7(317): p. 317ra199.
99. McNally, L.R., et al., *Current and Emerging Clinical Applications of Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) in Oncology*. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(14): p. 3432-9.

100. van Manen, L., et al., *A practical guide for the use of indocyanine green and methylene blue in fluorescence-guided abdominal surgery*. J Surg Oncol, 2018. 118(2): p. 283-300.
101. Gibbs, S.L., *Near infrared fluorescence for image-guided surgery*. Quant Imaging Med Surg, 2012. 2(3): p. 177-187.
102. Martelli, C., et al., *Optical imaging probes in oncology*. Oncotarget, 2016. 7(30): p. 48753-48787.
103. Brown, E., J. Brunker, and S.E. Bohndiek, *Photoacoustic imaging as a tool to probe the tumour microenvironment*. Dis Model Mech, 2019. 12(7).
104. Harlaar, N.J., et al., *Molecular fluorescence-guided surgery of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a single-centre feasibility study*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2016. 1(4): p. 283-290.
105. García-Figueiras, R., et al., *Imaging of Tumor Angiogenesis for Radiologists--Part 1: Biological and Technical Basis*. Curr Probl Diagn Radiol, 2015. 44(5): p. 407-24.
106. Joseph, J., et al., *Evaluation of Precision in Optoacoustic Tomography for Preclinical Imaging in Living Subjects*. J Nucl Med, 2017. 58(5): p. 807-814.
107. Chen, H., et al., *Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_3$* . Theranostics, 2016. 6(1): p. 78-92.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen an allen malignen Neuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2016 (exklusive nicht-melanotischen Hautkrebs).....	6
Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen an allen krebsbedingten Sterbefällen in Deutschland für das Jahr 2016.....	7
Abb. 3: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des malignen Melanoms in Deutschland je 100.000 Einwohner für die Jahre 1999 – 2016/17 inklusive Prognose bis 2020	9
Abb. 4: Stadienadaptiertes Nachsorgeschema beim malignen Melanom.....	15
Abb. 5: Versuchsprotokoll.....	31
Abb. 6: System zur multispektralen optoakustischen Tomographie von Kleintieren: MSOT inVision 128 (iThera Medical GmbH, München, Deutschland)	35
Abb. 7: Das Versuchstier wird vor der Untersuchung unter Anästhesie in der Halterung platziert und mit Polyethylenfolie umwickelt	36
Abb. 8: Optoakustische Signalintensitäten zur Baseline- und Follow-up Untersuchung ..	44
Abb. 9: Axialer Schnitt der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Bildgebung einer BALB/c Nacktmaus.....	46
Abb. 10: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifisches optoakustisches Signal vor und nach Behandlung einer BALB/c Nacktmaus aus der Therapie- und der Kontrollgruppe	46
Abb. 11: In-vivo-Blocking-Versuche	47
Abb. 12: Axialer Schnitt der Ganztier-Kryofluoreszenz-Bildgebung einer BALB/c Nacktmaus.....	48

Abb. 13: Repräsentative morphologische axiale T2-gewichtete MRT Aufnahmen der Abdominalregion eines Tieres aus der Kontrollgruppe der Baseline- und Follow-up-Untersuchung.....	49
Abb. 14: Tumorumfängen zur Baseline- und Follow-up-Untersuchung.....	50
Abb. 15: Immunhistochemische Schnitte von repräsentativen Tumorabschnitten von Tieren aus Therapie- und Kontrollgruppe im Vergleich.....	52
Abb. 16: Darstellung der β_3 -Integrin-Expression mit Boxplot Diagrammen.....	53

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Optoakustisches Tumorsignal und Tumorumfänge aller Tiere aus der Therapie- und Kontrollgruppe zur Baseline- (Tag 0) und Follow-up-Untersuchung (Tag 7) sowie die Änderung der Tumorumfänge im Verlauf der Behandlung.....	45
Tab. 2 Immunhistochemische Parameter der untersuchten Tiere aus Therapie- und Kontrollgruppe.....	51

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
a.u.	= arbitrary units
AJCC	= American Joint Committee on Cancer
BRAF	= B-rapidly accelerated fibrosarcoma
BSA	= Bovines Serumalbumin
CDKN2A	= cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDK4	= Cyclin-dependent Kinase
CT	= Computertomographie
CTLA-4	= cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	= Dimethylsulfoxid
EDTA	= Ethylendiamintetraacetat
EGF	= epidermal growth factor
EMA	= European Medicines Agency
ERK	= extracellular signal-regulated kinase
FCS	= fetal calf serum
FDA	= Food and Drug Administration
¹⁸ F-FDG	= ¹⁸ F-Fluordesoxyglukose
ICG	= Indocyaningrün
LDH	= Lactatdehydrogenase
PBS	= phosphate-buffered saline
PET	= Positronen-Emissions-Tomographie
PERCIST	= Positron Emission Tomography Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

MAPK = mitogen-activated protein kinase

MB = Methylenblau

MEK = mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase

mRECIST = modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

MRT = Magnetresonanztomographie

MSOT = Multispektrale Optoakustische Tomographie

NRAS = neuroblastoma rat sarcoma

PD1 = programmed cell death protein 1

RAS = rat sarcoma

RECIST = Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

TBS = Tris-buffered saline

TNM = Tumor-Node-Metastasis

UICC = Union Internationale Contre le Cancer

VEGF = vascular endothelial growth factor

WLKB = Wächterlymphknotenbiopsie

WHO = World Health Organisation

10. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Clemens Cyran, der mir die Teilnahme an diesem spannendem Projekt ermöglicht hat und auf dessen uneingeschränktes Engagement man dabei stets zählen konnte.

Herrn Prof. Dr. med. Jens Ricke und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser möchte ich vielmals für die Bereitstellung des ausgezeichneten Umfelds für die Promotion an der Klinik und Poliklinik für Radiologie des Klinikums der Universität München danken.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer Herrn PD. Dr. med. Philipp Kazmierczak besonders danken, dass er mich während dem Projekt mit Rat und Hilfe begleitet und gefördert hat. Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Heidrun Hirner-Eppeneder, Herrn Dr. Ralf Eschbach, Frau Dr. Olga Solyanik und Herrn Dr. Maurice Heimer für ihre beispiellose Hilfe während dem gesamten Projekt.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Neal Burton und seinem Team vielmals für ihr Mitwirken und ihre wertvolle Hilfe danken.

Nur schwer in Worte zu fassen ist der Dank an meine geliebte Familie, die mich hierbei sowie in sämtlichen Lebenslagen selbstlos unterstützt hat.

11. Eidesstattliche Versicherung

Keinrath, Georg

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

$\alpha\beta 3$ -Integrin-spezifische optoakustische Bildgebung mit MRT-Korrelation zum
Monitoring einer BRAF-MEK-Inhibitor-Kombinationstherapie im humanen
Melanommodell der Maus

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.

München, 07.10.2021

Ort, Datum

Georg Keinrath

Unterschrift Doktorrand