

1. Antrag Dr. Nirja C. Nolff vom 21.02.2023

Projekttitel: Charakterisierung von Tumor spezifischen Proteinsignaturen zur Ziel-gerichteten Therapie beim soliden und disseminierten Histiocyären Sarkom

Name der Organisation: Universität Zürich, Department für Kleintiere, Klinik für Kleintierchirurgie

Strasse: Winterthurerstrasse 260

PLZ: 8057

Ort: Zürich

Land: CH

Verantwortliche Person(en): PD Dr. Mirja C. Nolff

Telefon (mobil): 0792368357

Datum der Einreichung: 21/02/2023

Thema: Medizin -Onkologie

Beantragte Unterstützung (CHF): 24000

Vorgesehener Projektstart: 01/06/2023

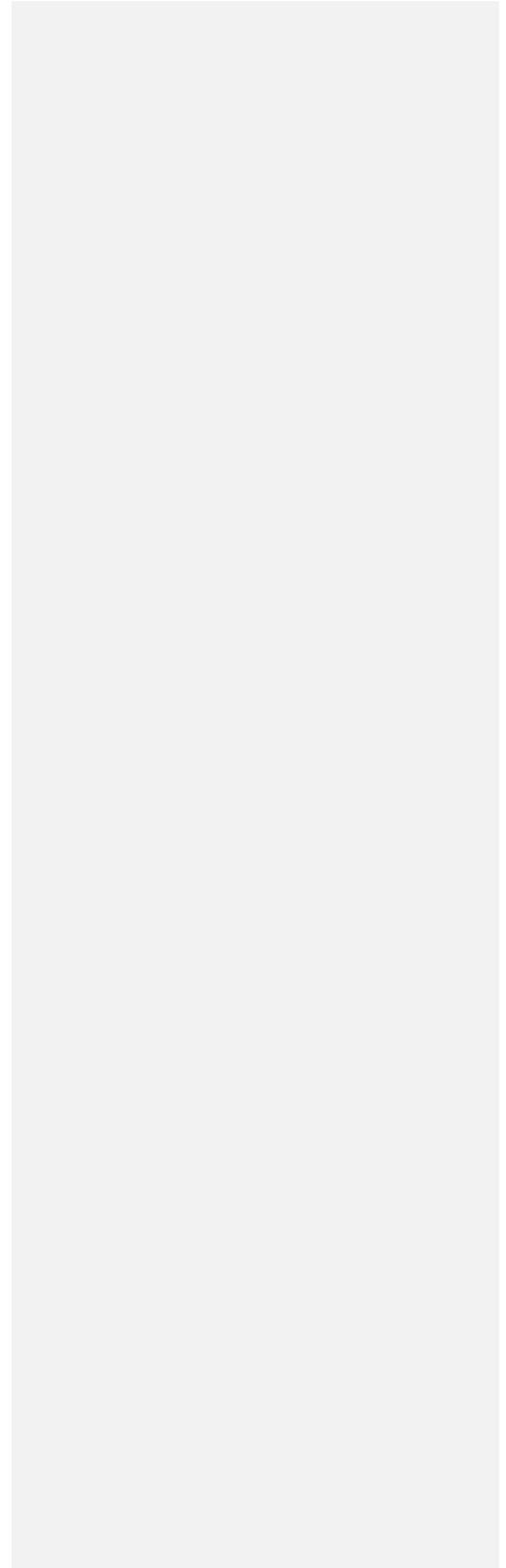
Vorgesehener Projektabschluss: 30/09/2024

Kurzzusammenfassung des Projekts: Das histiozytäre Sarkom (HS) kommt in einer lokalen sowie einer disseminierten Form vor und stellt eine fatale Krebserkrankung dar. Insbesondere Berner Sennenhunde und Flat Coated Retriever sind häufig betroffen, und bislang gibt es keine zufriedenstellende Therapie. Wenn die Veränderungen des Proteoms bekannt sind, die einen Tumor von gesundem Gewebe unterscheiden, können diese zur zielgerichteten Therapie genutzt werden. Dieser Ansatz ist auch für HS-Patienten vielversprechend, bislang fehlt eine Charakterisierung des Proteoms dieser Tumoren jedoch vollständig. Wir werden bei 30 Hunden mit disseminierter, und 30 Hunden mit fokaler HS mittels LC-MS/MS das Proteom von Tumor, und umgebenden nicht betroffenen Gewebe bestimmen, um so Ansatzpunkte für Zielspezifische Therapien für das HS zu definieren.

**Albert-Heim-Stiftung
der Schweizerischen Kynologischen Gesellschaft**

Gesuch um Unterstützung eines kynologischen Forschungsprojektes

**„Charakterisierung von Tumor spezifischen Proteinsignaturen
zur Ziel-gerichteten Therapie beim soliden und disseminierten
Histiozytären Sarkom“**



1. Angaben zur Person.

1.1. Antragssteller

Mirja Christine Nolf

PD Dr. med. vet., Dipl. ECVS
Oberärztin der Abteilung für Weichteil- und
Onkologische Chirurgie
Vetsuisse Fakultät Zürich
Winterthurerstrasse 258c
8057 Zürich
mirjachristine.nolf@uzh.ch
Tel: +41792368357

1.2. Projektbeteiligte Haupt-Kooperationspartner

Enni Markkanen

Ph.D., Dr. med. vet, Professor für Pharmakotherapie und Toxikologie
Institut für Veterinärpharmakologie und Toxikologie
Vetsuisse Fakultät Zürich
Winterthurerstrasse 260
8057 Zürich
enni.markkanen@vetpharm.uzh.ch
Tel: +41 44 63 58770

Franco Guscetti

Professor für Veterinär Pathologie
Institut für Veterinärpathologie
Vetsuisse Fakultät Zürich
Winterthurerstrasse 260
8057 Zürich
gufo@vetpath.uzh.ch

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1. Einleitung

Histiozytäre Sarkome (HS) sind aggressive Tumore der histiozytären Zellen (Dendritische Zellen, Makrophagen), die in einer soliden oder disseminierten Form sowohl beim Hund als auch beim Menschen vorkommen können.¹⁻⁴ Obwohl HS bei verschiedenen Rassen beschrieben ist, sind insbesondere Berner Sennenhunde (Inzidenz 25%) und Flat Coated Retriever (Inzidenz 20%) besonders häufig betroffen.^{1,5,6} Die große Bedeutung der Erkrankung in beiden Rassen wird auch an den Kennzahlen zur Rassesterblichkeit deutlich: so konnte in den Niederlanden nachgewiesen werden, dass 46% der Flat Coated Retriever Population, und 50% der Berner Sennenhunde HS assoziiert sterben.⁷ Die Übersterblichkeit hat in dieser Studie zu einer Reduktion der Lebenserwartung von 2 Jahren beim Flat Coated Retriever, und 3 Jahren beim Berner Sennenhund im Vergleich zu anderen Rassen geführt.⁷

Während beim Berner Sennenhund die disseminierte Form häufiger auftritt (60% der Fälle), zeigen Flat Coated Retriever häufiger (60% aller Fälle) eine solide Form im Bereich der Unterhaut oder der Gelenke, die sich meist zuerst in einer Lahmheit äussert.^{1,4} Aufgrund der hohen Prävalenz der disseminierten Form beim Berner Sennenhund werden diese Tiere in der Regel eher wegen unspezifischen Symptomen (Apathie, Anorexie, Gewichtsverlust, Ikterus, Dyspnoe, Diarrhoe, Neurologische Symptome) vorgestellt. Zudem sind Berner Sennenhunde in der Regel jünger als Flat Coated Retriever (im Schnitt 6 vs. 8 Jahre), wenn die Erkrankung auftritt.¹ Die häufigsten betroffenen Organe beim Berner Sennenhund sind Weichteile des Kopf/Halsbereiches, Milz, Leber und Lunge, während Flat Coated Retriever häufig Läsionen im Bereich der Gelenke, und seltener Lungenläsionen zeigen.^{1,8}

Obwohl in den letzten Jahren viele Studien insbesondere die Genetische Grundlage der Erkrankung untersucht haben, bleibt HS bis dato eine fatale Erkrankung, die unbehandelt schnell zum Tod führt.^{1-4,9} Resistenz gegenüber üblichen Chemotherapien ist häufig, und bislang sind weder bei Hund noch beim Menschen überzeugende Therapieansätze bekannt, die eine zuverlässige und nachhaltige Kontrolle der Erkrankung ermöglichen.^{1-4,9} Mono-Chemotherapie Protokolle mit Doxorubicin, Lomustin, Dacarbazine oder Epirubicin sowie Kombinationstherapien verschiedenster anderer Chemotherapeutika (Vincristine, Etoposide, Cyclophosphamid, Mitoxantrone, Dacarbacin, Lomustine, Procarbazine, Acinomycin, Epirubicin) wurden beschrieben.^{1,2,9-12} Selbst die erfolgreichsten Chemotherapie Protokolle erzielen bislang jedoch nur bei 26-58% aller Hunde einen kurzweiligen Effekt (partial response), komplette Remissionen (complete response) sind äußerst selten.^{1-4,9} Die meisten betroffenen Hunde versterben an der Erkrankung, die mittlere Überlebenszeit mit Chemotherapie liegt bei Hunden mit disseminierter HS bei 120-185 Tagen.^{1-3,13}

Bisherige systemische Therapieansätze bei disseminierter HS sind ungenügend, eine Krankheitskontrolle gelingt nur selten, und die meisten Hunde versterben in kurzer Zeit an der Erkrankung. Neue Ansätze zur Therapie werden dringend benötigt, um diese fatale Erkrankung in Zukunft besser zu behandeln.

Die fokale Form lässt sich etwas besser behandeln, mit Kombinationen aus chirurgischer Resektion und Chemotherapie können mittlere Überlebenszeiten von 432-568 Tagen erreicht werden.^{1,8} Bei lokaler periartikulärer HS wurde zudem 2020 eine Studie veröffentlicht, in der ein vergleichbarer Effekt von Amputation und Chemotherapie (MST 398 Tage) sowie Strahlentherapie in Kombination mit Chemotherapie (MST 240 Tage) als Alternative bei 49 Hunden beschrieben wurde.¹⁴ In der Regel versterben auch Hunde mit fokaler Form jedoch im Verlauf der Erkrankung an den Folgen systemischer Metastasen.^{3,15}

HS bleibt eine fatale Krankheit. Die bislang beschriebenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass dringend weitere Studien benötigt werden, um die Prognose für betroffene Hunde in Zukunft verbessern. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien an Tiermodellen, und Zelllinien,¹⁵⁻²⁰ sowie Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen der Erkrankung durchgeführt.^{5,6,21-28} So wurden unter anderem Mutationen im MAPK (KRAS, NF1, MAP2K1, BRAF, PTPN11) und PI3K Signalweg und ein Polymorphismus im FANCG Allel beschrieben.^{5,6,18,20,25,26,29,30}

Basierend auf dem Nachweis möglicher prädisponierender Mutationen wurde durch die Firma Angene ein Gentest entwickelt, der aktuell in der Schweiz vom Berner Sennenhunde Klub genutzt wird, um bei Verpaarungen Risiko Kombinationen zu vermeiden. Zuletzt konnte eine niederländische Gruppe Unterschiede in den Mutationen bei dissimulierter (vsizeraler) und lokalisierter Form bei Flat Coated Retrievern nachweisen.²⁴ Basierend auf diesen Daten erscheint es sinnvoll, diese Formen auch bezüglich des Therapieansatzes isoliert zu betrachten.

Obwohl die Ergebnisse der genetischen Analysen diese wichtigen Grundlagen etabliert haben, konnten bislang daraus noch keine neuen effektiven Therapien für betroffene Hunde abgeleitet werden. Beim Menschen wurden basierend auf den Ergebnissen molekularer Analysen bereits zielgerichtete Therapieansätze (targeted small molecules) zur Therapie der HS eingesetzt.^{31,32} Erste Analysen von MAPK/MEK-Inhibitoren (Trametinib/Desatinib/Palbociclip) in HS Zell-linien und Mausmodellen der caninen Variante sind vielversprechend,^{15,19,20,33,34} klinische Studien zur Effizienz beim Hund fehlen aktuell jedoch noch vollkommen.

Wir sind noch weit davon entfernt, die molekularen Grundlagen für mögliche Therapieansätze zu verstehen.¹⁵ Insbesondere fällt auf, dass bislang Analysen des Proteoms sowohl beim Hund als auch beim Menschen vollständig fehlen.

Die fehlende Charakterisierung Tumor spezifischer Proteinsignaturen steht aktuell der Entwicklung zielgerichteter Therapieoptionen für Patienten mit HS im Weg.

Überexprimierte Proteine stellen jedoch wichtige Zielstrukturen für Präzisionstherapien dar, und können genutzt werden, um mittels spezifischer Liganden Radionuklide, Fluoreszenzfarbstoffe, Zytostatika oder CAR-T Zellen selektiv im Tumor anzureichern um Diagnostik oder Therapie zu optimieren.³⁵⁻³⁸

Eine erste Arbeit, die sich eine Zielspezifische Therapie bei HS angesehen hat, wurde 2015

veröffentlicht.³⁹ Hierbei wurde Survivin, ein Apoptose-Hemmer der in neoplastischen Zellen überexprimiert ist genutzt um gezielt Lomustin in HS Läsionen anzureichern.³⁹ Die Autoren konnten im Mausmodell zeigen, dass die zielgenaue Gabe selbst bei Zellen, die zuvor eine Chemoresistenz gegen Lomustin gezeigt hatten, im Mausmodell effizient war.³⁹ Diese Studie zeigt den potentiellen Wert zielgerichteter Therapieansätze. Kernprinzip dieses neuen Ansatzes ist es aber, die möglichen Ziele zu definieren und zu verstehen, welche Proteine HS gegenüber dem normalen Gewebe ausmachen. Um diese Information zu erlangen, ist eine genaue Charakterisierung des Proteoms der HS-Zellen und des umliegenden gesunden peritumoralen Gewebes notwendig, die bislang bei Hund und Mensch vollkommen fehlt. Aufgrund der molekularen und klinischen Homologie der Erkrankung bei Hund und Mensch,^{25,26} sind entsprechende Untersuchungen sowohl für die Weiterentwicklung der Therapie beim Hund als auch für die Behandlung vom Menschen relevant.

hat formatiert: Deutsch

Referenzen.

1. Erich SA, Dobson JM, Teske E: Comparison of the Clinical Characteristics of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs and Flat-Coated Retrievers. *Vet Sci* 9, 2022.
2. Doka RM, Suter SE, Mastromauro ML, et al: Doxorubicin for treatment of histiocytic sarcoma in dogs: 31 cases (2003-2017). *J Am Vet Med Assoc* 260:1827-1833, 2022.
3. Mullin C, Clifford CA: Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 49:855-879, 2019.
4. Kennedy K, Thomas R, Breen M: Canine Histiocytic Malignancies-Challenges and Opportunities. *Vet Sci* 3, 2016.
5. Meek K, Yang YT, Takada M, et al: Identification of a Hypomorphic FANCG Variant in Bernese Mountain Dogs. *Genes (Basel)* 13, 2022.
6. Evans JM, Parker HG, Rutteman GR, et al: Multi-omics approach identifies germline regulatory variants associated with hematopoietic malignancies in retriever dog breeds. *PLoS Genet* 17:e1009543, 2021.
7. Erich SA, Rutteman GR, Teske E: Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese mountain dogs and Flat-coated retrievers. *Vet J* 198:678-683, 2013.
8. Murray CA, Willcox JL, De Mello Souza CH, et al: Outcome in dogs with curative-intent treatment of localized primary pulmonary histiocytic sarcoma. *Vet Comp Oncol* 20:458-464, 2022.
9. Cannon C, Borgatti A, Henson M, et al: Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *J Small Anim Pract* 56:425-429, 2015.
10. Kezer KA, Barber LG, Jennings SH: Efficacy of dacarbazine as a rescue agent for histiocytic sarcoma in dogs. *Vet Comp Oncol* 16:77-80, 2018.
11. Mason SL, Finotello R, Blackwood L: Epirubicin in the treatment of canine histiocytic sarcoma: sequential, alternating and rescue chemotherapy. *Vet Comp Oncol* 16:E30-E37, 2018.
12. Elliott J: Lomustine chemotherapy for the treatment of presumptive haemophagocytic histiocytic sarcoma in Flat-coated Retrievers. *Aust Vet J* 96:502-507, 2018.
13. Tani H, Kurita S, Miyamoto R, et al: Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 56:146, 2020.
14. Marconato L, Sabattini S, Buchholz J, et al: Outcome comparison between radiation therapy and surgery as primary treatment for dogs with periarticular histiocytic sarcoma: An Italian Society of Veterinary Oncology study. *Vet Comp Oncol* 18:778-786, 2020.
15. Hirabayashi M, Chambers JK, Kishimoto TE, et al: Establishment and characterisation of cell lines and xenograft mouse models of canine systemic histiocytosis and disseminated histiocytic sarcoma. *Vet Comp Oncol* 20:465-475, 2022.
16. Asada H, Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, et al: Evaluation of the drug sensitivity and expression of 16 drug resistance-related genes in canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci* 77:677-684, 2015.
17. Heinrich F, Contioso VB, Stein VM, et al: Passage-dependent morphological and phenotypical changes of a canine histiocytic sarcoma cell line (DH82 cells). *Vet Immunol Immunopathol* 163:86-92, 2015.
18. Hirabayashi M, Chambers JK, Tani A, et al: mRNA sequencing analysis and growth inhibitory effects of palbociclib on cell lines from canine histiocytic proliferative disorders. *Vet Comp Oncol* 20:587-601, 2022.
19. Takada M, Parys M, Gregory-Bryson E, et al: A novel canine histiocytic sarcoma cell line: initial characterization and utilization for drug screening studies. *BMC Cancer* 18:237, 2018.
20. Tani H, Kurita S, Miyamoto R, et al: Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Vet Comp Oncol* 18:161-168, 2020.
21. Asada H, Ichii O, Tomiyasu H, et al: The intratumor heterogeneity of TP53 gene mutations in canine histiocytic sarcoma. *J Vet Med Sci* 81:353-356, 2019.
22. Asada H, Tomiyasu H, Okada K, et al: Clinical significance of the two-base insertion mutation in the TP53 gene in canine histiocytic sarcoma. *Res Vet Sci* 124:57-60, 2019.
23. Boerkamp KM, van der Kooij M, van Steenbeek FG, et al: Gene expression profiling of histiocytic sarcomas in a canine model: the predisposed flatcoated retriever dog. *PLoS One* 8:e71094, 2013.

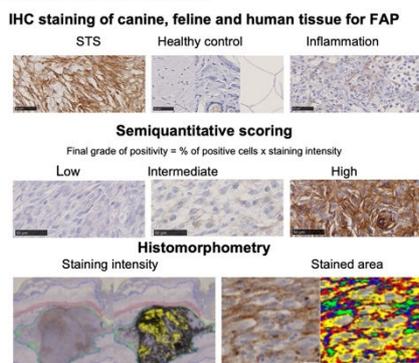
24. Boerkamp KM, van Steenbeek FG, Penning LC, et al: The two main forms of histiocytic sarcoma in the predisposed Flatcoated retriever dog display variation in gene expression. *PLoS One* 9:e98258, 2014.
25. Hedan B, Cadieu E, Rimbault M, et al: Identification of common predisposing loci to hematopoietic cancers in four dog breeds. *PLoS Genet* 17:e1009395, 2021.
26. Hedan B, Rault M, Abadie J, et al: PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma. *Int J Cancer* 147:1657-1665, 2020.
27. Kennedy K, Thomas R, Durrant J, et al: Genome-wide DNA copy number analysis and targeted transcriptional analysis of canine histiocytic malignancies identifies diagnostic signatures and highlights disruption of spindle assembly complex. *Chromosome Res* 27:179-202, 2019.
28. Takada M, Smyth LA, Thaiwong T, et al: Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine Histiocytic Sarcomas. *Genes (Basel)* 10, 2019.
29. Tani H, Miyamoto R, Nagashima T, et al: Molecular characterization of canine SHP2 mutants and anti-tumour effect of SHP2 inhibitor, SHP099, in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma. *Vet Comp Oncol* 20:109-117, 2022.
30. Thaiwong T, Sirivisoot S, Takada M, et al: Gain-of-function mutation in PTPN11 in histiocytic sarcomas of Bernese Mountain Dogs. *Vet Comp Oncol* 16:220-228, 2018.
31. Diamond EL, Durham BH, Ulaner GA, et al: Efficacy of MEK inhibition in patients with histiocytic neoplasms. *Nature* 567:521-524, 2019.
32. Hu B, Patel JL, Tao R, et al: Near Complete Response to Trametinib Treatment in Histiocytic Sarcoma Harboring a Somatic KRAS Mutation. *J Natl Compr Canc Netw* 20:618-621, 2022.
33. Takada M, Hix JML, Corner S, et al: Targeting MEK in a Translational Model of Histiocytic Sarcoma. *Mol Cancer Ther* 17:2439-2450, 2018.
34. Takada M, Smyth LA, Hix JM, et al: Development of an Orthotopic Intrasplenic Xenograft Mouse Model of Canine Histiocytic Sarcoma and Its Use in Evaluating the Efficacy of Treatment with Dasatinib. *Comp Med* 69:22-28, 2019.
35. Takahashi S: [Molecular Target Therapy for Soft Tissue Sarcoma]. *Gan To Kagaku Ryoho* 44:457-462, 2017.
36. Thanindratarn P, Dean DC, Nelson SD, et al: Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications. *Cancer Treat Rev* 82:101934, 2020.
37. Hernot S, van Manen L, Debie P, et al: Latest developments in molecular tracers for fluorescence image-guided cancer surgery. *Lancet Oncology* 20:E354-E367, 2019.
38. de Gooyer JM, Versleijen-Jonkers YMH, Hillebrandt-Roeffen MHS, et al: Immunohistochemical selection of biomarkers for tumor-targeted image-guided surgery of myxofibrosarcoma. *Sci Rep* 10:2915, 2020.
39. Yamazaki H, Takagi S, Hosoya K, et al: Survivin suppressor (YM155) enhances chemotherapeutic efficacy against canine histiocytic sarcoma in murine transplantation models. *Res Vet Sci* 99:137-144, 2015.

1.1. Stand der eigenen Forschung

Unsere Gruppe beschäftigt sich seit drei Jahren mit der präzisen Analyse verschiedener Sarkom Typen bei Hund und Katze. Unsere etablierte Methodik erlaubt es uns, hochpräzise Tumor von anderen Gewebstypen zu trennen, und zu sequenzieren. Die Analyse des Proteoms nimmt hierbei einen besonderen Stellenwert ein, da nicht alle Mutationen (DNA-Level) oder Transkripte (RNA-Level) auch als Proteinen exprimiert werden. Daher ist es besonders wichtig zu überprüfen welche Proteinsignaturen einen besonderen Tumor kennzeichnen. In den letzten 3 Jahren konnten wir erfolgreich verschiedene Zielstrukturen sowie das Proteom von Fibrosarkomen bei Hunden analysieren und beschreiben. Zudem unterhält die Gruppe eine Kollaboration mit der Charite Berlin, um Vergleichende Analysen verschiedener Tumorformen bei Hund und Mensch durchzuführen.

2.2.1. Quantifizierung einzelner Zielstrukturen mittels Immunhistologie

Um ein einzelnes Protein als mögliche Zielstruktur zu validieren haben wir die IHC-Expression von Fibroblasten-assoziiertem Protein (FAP) in verschiedenen Weichteilsarkom Typen bei Hund, Katze und Mensch untersucht (Abb. 1). Wir konnten bei allen Spezies eine Überexpression von FAP bei den untersuchten Weichteilsarkomen im Vergleich zu normalem Gewebe nachweisen. Das entsprechende Manuskript befindet sich aktuell im Review. Die Analyse der Hundedaten im Rahmen



Target selection criteria (TASC) scoring was completed based on criteria set by Van Oosten et al. ⁴⁶

Table 1. Showing final TASC scores per entity and species

Species	Canine				Feline	Human				
	Total n=53	PWT n=30	STS NOS n=16	cFS n=7	fFS n=24	Total n=39	MNST n=10	UPS n=10	DFSP n=9	MFS n=10
STS-Entity										
TASC (0-22)	21	21	21	15	21	18	18	19	18	18

STS: soft tissue sarcoma, PWT: perivascular wall tumor, NOS: not otherwise specified, cFS: canine fibrosarcoma, fFS: feline fibrosarcoma, MNST: malignant peripheral nerve sheath tumor, UPS: undifferentiated pleomorphic sarcoma, DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans, MFS: malignant fibrous histiocytoma

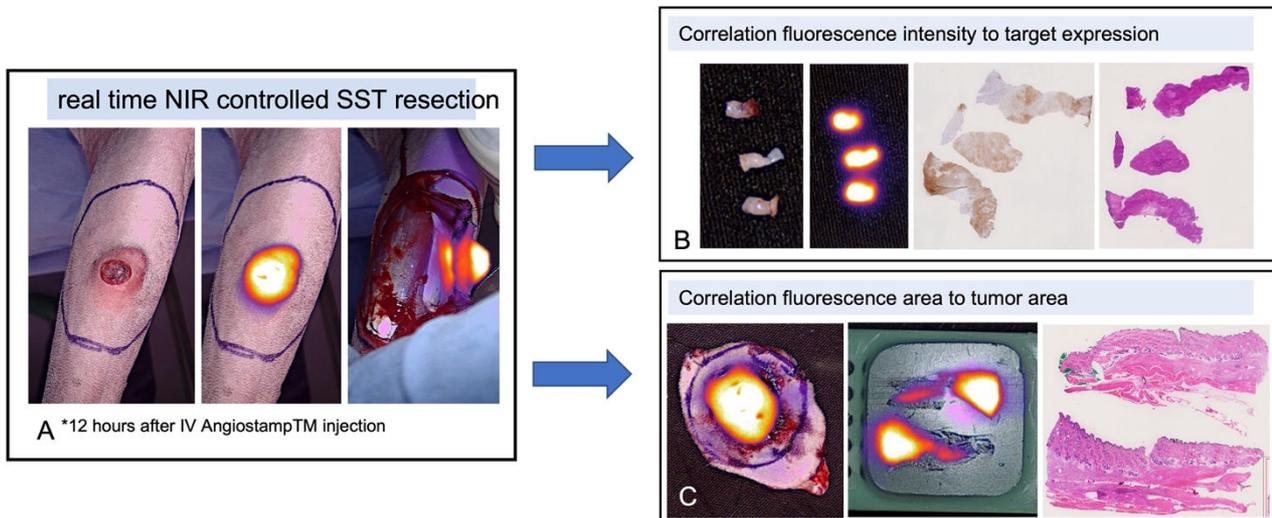
Abbildung 1. IHC FAP Färbung wurde für verschiedene Sarkome, nicht betroffenes peritumorales Gewebe und entzündetes Gewebe von Menschen, Hunden und Katzen ausgewertet. Mit Hilfe der semiquantitativen und quantitativen Analyse (A) wurde dann der TASC-Score bestimmt. Bei allen eingeschlossenen STS wurde ein TASC-Score von 18 oder mehr festgestellt, mit Ausnahme des Fibrosarkoms bei Hunden. Damit ist FAP für die untersuchten Weichteilsarkome eine mögliche Zielstruktur.

dieser Studie wurde bereits durch die AHS gefördert (Projekt Nr 146). Eine vergleichbare Analyse wird für FAP aktuell auch bei Hunden mit HS durchgeführt.

Parallel wurde durch unseren Kooperationspartner, **Prof. J. Holland**, eine FAP spezifische Struktur entwickelt, die in weiteren Studien zur intraoperativen Darstellung der Weichteilsarkome genutzt wird.

2.2.2 Zielspezifische Fluoreszenzfarbstoffe zur intraoperativen Darstellung von Sarkomen

Um den Nutzen zielspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe für die intraoperative Darstellung von Sarkomen klinisch zu evaluieren, führen wir derzeit eine erste randomisierte klinisch kontrollierte Phase-II-Studie zur Bewertung des Nutzens eines kommerziell erhältlichen Anti- $\alpha 5\beta 3$ -Integrin-Farbstoffs (AngiostampTM) bei Hunden mit spontan auftretenden Weichteilsarkomen durch. Bislang wurden 18/20 Hunde eingeschlossen, und die Fluoreszenz-basierten Resektionen waren in allen Fällen mit sichtbarem Signal vollständig (n=10). Die Fluoreszenz entsprach bei allen Hunden der



histologischen Tumorausdehnung (Abb. 2).

Abbildung 2. Der Anti- $\alpha 5\beta 3$ -Integrin-Farbstoff wird intravenös injiziert und reichert sich innerhalb von 15 bis 180 Minuten im Tumor an. Nach der Anreicherung kann das Fluoreszenzsignal abgebildet werden, um die Tumorausdehnung abzugrenzen. Die Resektion wird dann unter NIR-Bildgebungskontrolle durchgeführt (A). Frische gefrorene Gewebebiopsien werden dann verwendet, um die Fluoreszenz mit der Targetexpression zu korrelieren (B). Schließlich wird die Fluoreszenzfläche mit der histologisch bestätigten Tumorausdehnung verglichen (C).

Bei $\frac{1}{4}$ der Hunde wurden die Resektionsränder anhand des NIR-Signals angepasst, und ein metastatischer Lymphknoten, der vor der Operation nicht entdeckt worden war, konnte aufgrund des NIR-Signals während der Operation identifiziert und reseziert werden. Diese Resultate belegen, dass es möglich ist eine Substanz (in diesem Fall ein Farbstoff) mittels einer Zielstruktur präzise im Tumor anreichern zu lassen. Des Weiteren zeigen sie eindrücklich auf, dass durch zielgerichtete intraoperative Darstellung von Tumoren eine viel präzisere und komplette Tumorentfernung erreicht werden kann. Da die komplette Tumorentfernung eines der wichtigsten Kriterien darstellt, welche Rezidiv und Metastasierung beeinflusst, birgt diese Herangehensweise grosses Potenzial für die zukünftige Behandlung von Krebspatienten.

Die Visualisierung der genauen Ausdehnung des Tumors kann auch bei Hunden mit einer fokalen Form von HS relevant sein, die mittels Chirurgie und Chemotherapie behandelt werden soll. Zudem könnte die Visualisierung bei HS-Patienten helfen, eine genauere Einschätzung des Krankheitsverlaufes durch genauere Diagnostik (PET/SPECT CT) zu ermöglichen, indem ein Ligand an ein Radionuklid anstelle eines Fluorophors gekoppelt wird.

2.2.3 Molekulare Analyse des Proteoms beim Fibrosarkom von Hund und Mensch

Unter Mithilfe der Unterstützung der AHS konnten wir kürzlich die Charakterisierung der Proteinsignatur von Fibrosarkomen (FSA) im Vergleich zu nicht befallenem peritumoralem Gewebe (PTT = Muskel, Fett, Bindegewebe) bei Hunden publizieren.¹ Wir konnten eine deutliche Überexpression verschiedener extrazellulärer Proteine im Vergleich zum gesunden PTT nachweisen.

Eines der interessantesten potenzielle Zielproteine war Tenascin-C ($\log_2(\text{FC})$ Tumor vs. Muskel 3.44, Tumor vs. Fett 3.86, Tumor vs. Bindegewebe 2.62; [10.1016/j.neo.2022.100858](https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100858))

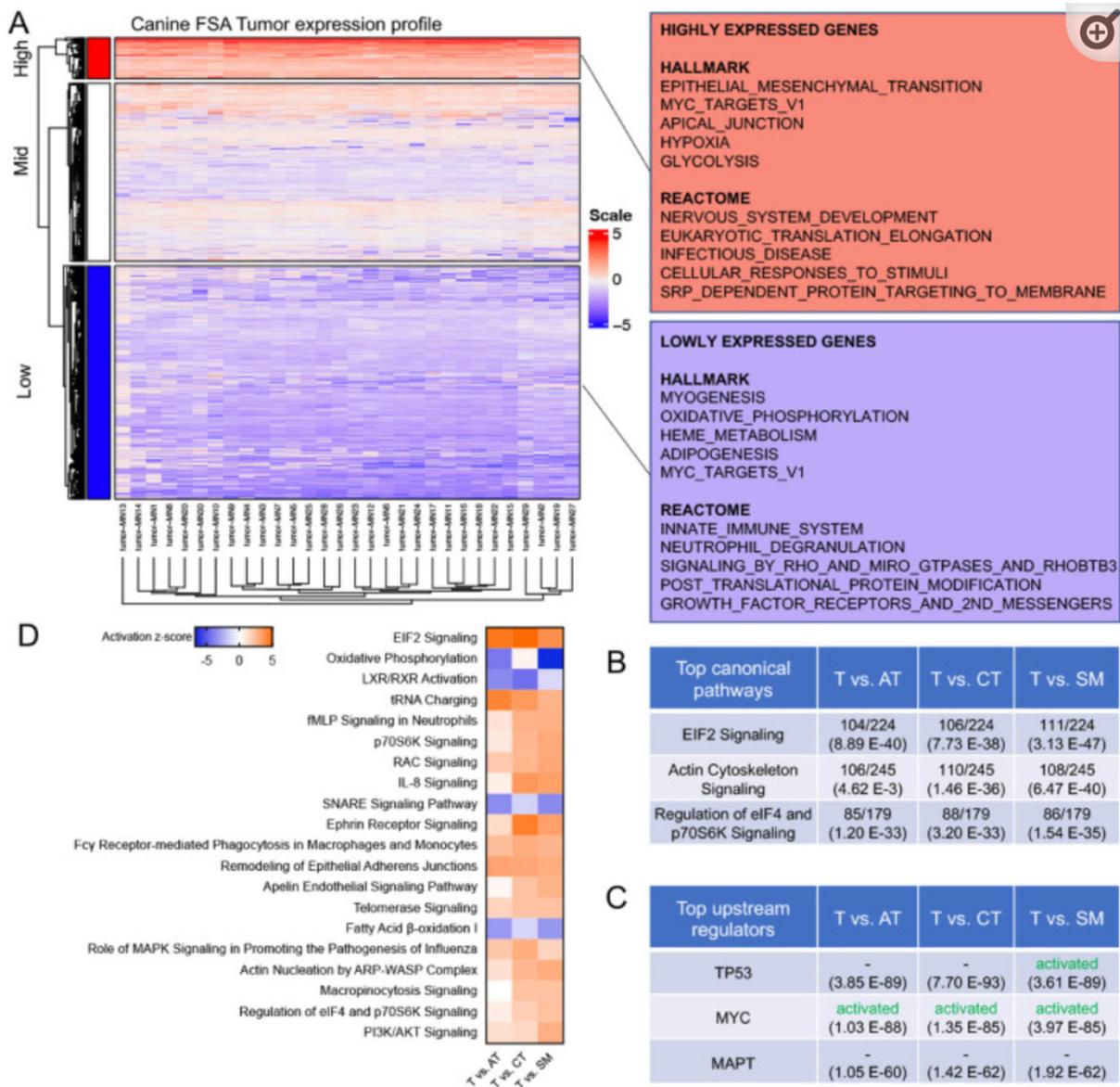


Abbildung 3 A) Heatmap aller detektierten Proteine B) Die wichtigsten kanonischen Pfade, die in T im Vergleich zu AT, CT und SM mithilfe der Ingenuity-Pfadanalyse (IPA) entdeckt wurden. C) Die wichtigsten Upstream-Regulatoren, die in Tumor im Vergleich zu nicht betroffenem Tumorgewebe mithilfe der Ingenuity Pathway Analysis (IPA) entdeckt wurden. Die obere Hälfte einer Zelle zeigt den vorhergesagten Aktivierungsstatus an, und die Werte in Klammern stellen p-Werte dar. D) Aktivierungsstatus der 20 wichtigsten kanonischen Stoffwechselwege.

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Antrags haben wir bereits die RNA-Sequenzierdaten der selben Patientenproben erhalten und sind dabei, die Laser Capture Microdissection (LCM) und LC-MS/MS für vergleichbare Weichteilsarkome beim Menschen in Kooperation mit der Charite Berlin abzuschliessen. Zusammenfassend ist also die Methodik der Proteom Analyse, wie sie in dem vorliegenden Projekt zum Einsatz kommen wird, erfolgreich etabliert.

Referenzen.

1. Beebe E, Poschel A, Kunz L, et al: Proteomic profiling of canine fibrosarcoma and adjacent peritumoral tissue. *Neoplasia* 35:100858, 2023.

1. Detaillierter Forschungsplan

1.1. Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, das Proteom von lokalen und disseminierten HS zu bestimmen und mit dem Proteom des umliegenden normalen Gewebes zu vergleichen, um mögliche Zielstrukturen für neue, Zielspezifische Therapieansätze zu identifizieren.

1.2. Hypothesen

Unsere **Hypothese** ist, dass sowohl lokale als auch disseminierte HS Tumorspezifische Proteinsignaturen aufweist, die in Zukunft für eine Zielgerichtete Therapie eingesetzt werden können.

1.3. Material und Methoden

Basierend auf Daten von der vorangegangenen Analyse von Fibrosarkomen beim Hund wurde eine Sample Size Analyse durchgeführt. Um eine ausreichende Power von 80% bei einem Konfidenzintervall von 95% zu erzielen, werden jeweils 30 HS von Hunden mit solider Form (15 Berner Sennenhunde und 15 andere Rassen), sowie 30 disseminierte HS Läsionen (15 Berner Sennenhund, 15 anderer Rassen) analysiert.

3.3.1 Laser-Capture-Microdissection (LCM)

Bei Proben von Hunden mit der soliden Form wird mittels LCM an 5-6 Schnitten à 10µm von Formalin fixierten Paraffinblöcken (FFPE) auf speziellen PEN-Membran beschichteten Glasträgern Tumor, sowie umgebendes normales Gewebe (Fett, Muskel und Bindegewebe oder Synovialis bei Gelenkstumoren) mit dem Arcturus Collect™ LCM-System isoliert. Bei Hunden mit disseminierter Form erfolgt die Analyse von Tumorbefallenen Arealen der Lunge, Milz oder der Leber, sowie von nicht betroffenen peritumoralen Arealen der jeweiligen Organe zum Vergleich. Während der LCM ermöglicht die mikroskopische Kontrolle eine präzise Unterscheidung zwischen Tumor und dem peritumoralen Kontrollgewebe. Die zu isolierenden Bereiche werden durch **F. Guscetti (Veterinärpathologie)** festgelegt und überprüft.

3.3.1 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Für die LC-MS/MS werden die Proteine aus dem isolierten Gewebe extrahiert und auf einem Q-Exactive HF-X Massenspektrometer gemäß der von uns etablierten Protokolle analysiert (etablierte Kollaboration mit **Dr. Laura Kunz** am Functional Genomics Center Zurich (FGCZ)).¹

Die bioinformatische Verarbeitung der Proteom Daten wird in Zusammenarbeit mit unserem Bioinformatik-Experten am FGCZ (**Dr. Witold Wolski**) durchgeführt. Die relative Häufigkeit der Proteinexpression (log₂fold-change) zwischen lokaler und disseminierter Form sowie zwischen HS

und umgebendem nicht betroffenem Gewebe wird für jedes detektierte Protein erfasst. Die Top Hoch- und runterregulierten Proteine werden identifiziert und weiter analysiert. Um einen Einblick in die Veränderungen zu erhalten, die die Tumorzellen von den umgebenden normalen Geweben unterscheiden und die potenzielle therapeutische Angriffstellen darstellen könnten, wird eine Signalweganalyse mit MetaCore (Clarivate Analytics) (<https://portal.genego.com>) und eine KEGG-Signalweganalyse mit WebGestalt (www.webgestalt.org) durchgeführt. Die Identifizierung potenzieller therapeutischer Angriff Stellen erfolgt mithilfe von Expression2Kinases, einem computergestützten Algorithmus, der Aufschluss über die vorgelagerten Regulatoren gibt, die für die beobachteten Muster der Proteinexpression verantwortlich sind. Die anschließende Validierung der Zielmoleküle wird mit Hilfe von Immunhistochemischer Analyse erfolgen.

2. Verfügbare Ressourcen

Das LCM-Mikroskop steht im Labor von E. Markkanen der Forschungsgruppe zur Verfügung. Alle molekularen Analysen finden im Functional Genomics Center der Universität Zürich statt, mit dem die Gruppe bereits in mehreren anderen Projekten kollaboriert.

3. Zeitplan

Das Projekt erstreckt sich über 18 Monate, gegliedert in die folgenden einzelnen Arbeitsschritte.

	06/23	09/23	12/23	03/24	06/24	09/24
LCM Dissektion und Bearbeitung der Proben zur weiteren Analyse						
LS-MS/MS						
Biostatistische Datenanalyse						
Erstellen und Einreichen des Manuskript						
Abschlussbericht						

4. Budget.

7.1 Saläre

Alle beteiligten Stellen sind über ihre Anstellung bei der Universität Zürich finanziert.

7.2 Sachmittel

Die Kosten für die Studie ergeben sich aus den Kosten für das Verbrauchsmaterial für die LCM und die LS-MS/MS Analyse beim Functional Genomics Center, und belaufen sich auf 400 CHF je Patient. Daraus ergeben sich Gesamtkosten von 24.000 CHF für die angestrebte Analyse. Die Kosten für die

Probenvorbereitung und das Salär für die beteiligten Personen deckt die Gruppe aus eigenen Mitteln.

Schlüsselwörter:

Histiozytäres Sarkom, Proteom, Zielgerichtete Therapie

Bedeutung der zu erwartenden Resultate

Die HS ist eine fatale Erkrankung, die insbesondere bei Flat Coated Retrievern und Berner Sennenhunden häufig vorkommt, und bei diesen Rassen bis zu 50% der Todesfälle bedingt.¹⁻⁵ In den letzten Jahren haben genetische Analysen dazu beigetragen, dass genetische Risikofaktoren identifiziert werden konnten, ein wichtiger Schritt um die Prävalenz der Erkrankung zu senken.⁶⁻⁸ Trotz dieses Fortschrittes bleibt die Therapie betroffener Hunde eine Herausforderung - Chemotherapie erzielt häufig nur eine kurz andauernde teilweise Remission, und Chemoresistenzen sind häufig.⁹⁻¹⁵ Durch Charakterisierung des Proteoms der Tumorzellen und des umliegenden gesunden Gewebes können wir die genauen molekularen Veränderungen dieser Erkrankung erfassen, und nach möglichen Zielstrukturen suchen, die in der Zukunft genutzt werden können, um Therapeutika ganz gezielt im Tumor anreichern zu lassen. Wir erhoffen uns von der Charakterisierung des Proteoms entscheidende Informationen, die in der Zukunft die Diagnostik und Behandlung betroffener Hunde verbessern können.

Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass HS auch beim Menschen eine fatale Erkrankung darstellt,^{3,16} die aber zu den hochseltenen Tumorerkrankungen zählt, und deshalb praktisch nicht untersucht ist.^{3,16} Der Grossteil der Patienten verstirbt innerhalb von 2 Jahren nach der Diagnose, und zielspezifische neue Therapien werden dringend benötigt.³ Der Hund stellt das einzige natürliche Modell dieser Krankheit dar.³ Obwohl unser Fokus auf der verbesserten Therapie für betroffene Hunde liegt, könnten unsere Daten auch helfen das Verständnis der Erkrankung für menschliche Patienten zu verbessern.

Ziele.

Ziel der Studie ist es, das Proteom von fokaler und dissimulierter HS zu analysieren und mit nicht betroffenem Kontrollgewebe zu vergleichen, um Zielstrukturen für eine Therapie zu bestimmen.

Referenzen.

1. Erich SA, Dobson JM, Teske E: Comparison of the Clinical Characteristics of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs and Flat-Coated Retrievers. *Vet Sci* 9, 2022.
2. Erich SA, Rutteman GR, Teske E: Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese mountain dogs and Flat-coated retrievers. *Vet J* 198:678-683, 2013.
3. Kennedy K, Thomas R, Breen M: Canine Histiocytic Malignancies-Challenges and Opportunities. *Vet Sci* 3, 2016.
4. Mullin C, Clifford CA: Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 49:855-879, 2019.
5. Ruple A, Morley PS: Risk Factors Associated with Development of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs. *J Vet Intern Med* 30:1197-1203, 2016.
6. Boerkamp KM, van der Kooij M, van Steenbeek FG, et al: Gene expression profiling of histiocytic sarcomas in a canine model: the predisposed flatcoated retriever dog. *PLoS One* 8:e71094, 2013.
7. Evans JM, Parker HG, Rutteman GR, et al: Multi-omics approach identifies germline regulatory variants associated with hematopoietic malignancies in retriever dog breeds. *PLoS Genet* 17:e1009543, 2021.
8. Kennedy K, Thomas R, Durrant J, et al: Genome-wide DNA copy number analysis and targeted transcriptional analysis of canine histiocytic malignancies identifies diagnostic signatures and highlights disruption of spindle assembly complex. *Chromosome Res* 27:179-202, 2019.
9. Cannon C, Borgatti A, Henson M, et al: Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *J Small Anim Pract* 56:425-429, 2015.
10. Doka RM, Suter SE, Mastromauro ML, et al: Doxorubicin for treatment of histiocytic sarcoma in dogs: 31 cases (2003-2017). *J Am Vet Med Assoc* 260:1827-1833, 2022.
11. Elliott J: Lomustine chemotherapy for the treatment of presumptive haemophagocytic histiocytic sarcoma in Flat-coated Retrievers. *Aust Vet J* 96:502-507, 2018.
12. Kezer KA, Barber LG, Jennings SH: Efficacy of dacarbazine as a rescue agent for histiocytic sarcoma in dogs. *Vet Comp Oncol* 16:77-80, 2018.
13. Mason SL, Finotello R, Blackwood L: Epirubicin in the treatment of canine histiocytic sarcoma: sequential, alternating and rescue chemotherapy. *Vet Comp Oncol* 16:E30-E37, 2018.
14. Moore AS, Taylor DP, Reppas G, et al: Chemotherapy for dogs with lymph node metastasis from histiocytic sarcomas. *Aust Vet J* 95:37-40, 2017.
15. Tani H, Kurita S, Miyamoto R, et al: Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 56:146, 2020.
16. Takada M, Hix JML, Corner S, et al: Targeting MEK in a Translational Model of Histiocytic Sarcoma. *Mol Cancer Ther* 17:2439-2450, 2018.

1. Tierversuchsantrag

Die beschriebene Studie ist gemäß Schweizer Tierschutzgesetz (Art. 3 c, Abs. 4) nicht bewilligungspflichtig, da alle Analysen an Archivmaterial des Instituts für Veterinärpathologie durchgeführt werden. Die Erlaubnis zur Nutzung dieses Materials liegt vor.

Curriculum vitae

PERSONAL INFORMATION

Family name, First name: Nolff, Mirja Christine
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9317-7769>
Date of birth: 01/11/1980 Citizenship: German
E-mail: mnolff@vetclinics.uzh.ch

• EDUCATION

- 2015-2019 Habilitation, Venia Legendi Small Animal Surgery (Topic: Negative Pressure Wound Treatment in dogs/ Multidrug Resistant Soft Tissue infections)
- 2014-2017 National Spezialisierung Small Animal Surgery (Fachtierarzt Kleintierchirurgie)
- 2014-2017 Residency European College of Small Animal Surgeons (Diplomate ECVS since 2018)
- 2008-2012 National Specialization Small Animal Medicine (Fachtierarzt Kleintiermedizin)
- 2006-2008 Promotion Dr. med. vet. (<urn:nbn:de:gbv:95-96945>)
Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany
and Clinic for Oro-maxillofacial Surgery, Hannover Medical School, Germany
Supervisor: PD Dr. Gregor Hauschild
- 2000-2006 Veterinary Medicine, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany

• CURRENT POSITION

- 2019 –present Senior Surgeon (Oberarzt) Soft Tissue and Oncologic Surgery,
Clinic for Small Animal Surgery, Vetsuisse Zürich, University of Zürich, Switzerland

• PREVIOUS POSITIONS

- 2012 – 2019 Senior Surgeon (Oberarzt)
Clinic for Small Animal Surgery, Department for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University (LMU) Munich, Germany Country
- 2008 – 2012 Surgical Assistant
Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany
- 2007-2008 Internship
Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany
- 2006-2007 Research Position, Clinic for Oro-maxillofacial Surgery, Hannover Medical School, Germany

• FELLOWSHIPS AND AWARDS

- 2017 – 2018 Bavarian Gender Equality Grant (BGF), LMU Munich, Germany (18.000 Euro)
- 2018 Förderpreis der Akademie für Tiergesundheit e.V. (Aft) for outstanding research contributions in soft tissue and reconstructive surgery
- 2016 Poster Award (Best Soft Tissue) ECVS Annual Meeting Lissabon
- 2016 AMYSA Award Best Clinical Study
- 2015 Best Resident Paper Journal of Feline Medicine and Surgery
- 2008 Best Oral Presentation 14th Swiss Conference on Biomaterials

- **SUPERVISION OF GRADUATE STUDENTS**

Co-Supervisor (Main Supervisor Prof. A. Meyer-Lindenberg, LMU Munich)

2016 – 2021 Anne Lohr [10.5282/edoc.21935](https://doi.org/10.5282/edoc.21935)
Selina Winter [10.5282/edoc.25764](https://doi.org/10.5282/edoc.25764)
Rebecca Albert ([10.1055/s-0039-1693007](https://doi.org/10.1055/s-0039-1693007))

Main Supervisor

PhD and Doctoral Students

2020-present Patricia Beer (PhD Graduate College Bern 2020-2023)
Fabian Eigner (Dr. med. vet 2019-2023 University Zürich)

Master students

2020-2022 Madeleine Degen completed
Rosa-Lee Sievke completed
2021-2023 Zoe Stutz ongoing

- **TEACHING ACTIVITIES**

2012-2018 Lecturer in Small Animal Surgery (Lectures, Practical Courses, Supervision of Clinical Rotations) and Examiner State Exam Small Animal Surgery– Clinic for Small Animal Surgery, LMU, Germany
2019 – present Lecturer Small Animal Soft Tissue and Oncologic Surgery (Lectures, Courses, Supervision of Clinical Rotations)
Examiner State Exam Small Animal Surgery, Clinic for Small Animal Surgery, Vetsuisse Zürich, University Zürich, Switzerland
2021 - present Supervisor of ‘Schwerpunkt Rotation’
2018 - present Supervision of Surgical Residents (ECVS)

- **INSTITUTIONAL RESPONSIBILITIES**

2019 – present Hospital Hygiene Committee (Representative Small Animal Surgery), Tierspital, Vetsuisse Zürich, University of Zürich, Switzerland
2020- 2022 Efficiency Committee Small Animal Surgery, Tierspital Vetsuisse Zürich, University of Zürich, Switzerland
2022 – present Teaching coordinator Clinic for Small Animal Surgery, Vetsuisse Zürich

- **REVIEWING ACTIVITIES**

2015 -present Nature Scientific Reports
BMC Surgery
PLOS One
Journal of Small Animal Practice
Animals

- **MEMBERSHIPS OF SCIENTIFIC SOCIETIES**

2022-present European Society of Veterinary Oncology research Committee
2021- present ENOVAT Member (Working Group 4: Veterinary Antimicrobial treatment guidelines)
2019- present Veterinary Society for Surgical Oncology
2018-present European College of Veterinary Surgeons
2015-present Council Member Veterinary Wound Healing Association

2012-present Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2016-2018 Future Board)

• **MAJOR COLLABORATIONS**

Chemistry	Prof. Dr. Jason Holland, Department of Chemistry, University of Zürich, Switzerland
Human Pathology	Prof. Dr. Chantal Pauli, Institute of Pathology and molecular Pathology, University Hospital Zürich, University Zürich, Switzerland
Human Oncology	Dr. Armin Jarosch, Institute of Pathology, Charite Berlin PD Dr. Anne Flörcken, Medical Clinic (Hematology, Oncology and Tumor Immunology), Charite Berlin, Germany
Veterinary Pathology	Prof. Dr. Franco Guscelli, Institute for Veterinary Pathology, Vetsuisse Zürich, University Zürich, Switzerland PD Dr. Frauke Seehusen, Institute for Veterinary Pathology, Vetsuisse Zürich, University Zürich, Switzerland
Veterinary Pharmacology	Prof. Dr. Enni Markkanen, Institute of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Vetsuisse Zürich, University of Zürich, Switzerland
Veterinary Radiology	Prof. Dr. Stefanie Ohlerth, DIRU, Vetsuisse Zürich, University of Zürich, Switzerland
Veterinary Surgery	Dr. Damiano Stefanello, University of Milan, Italy

• **GRANTS AND FUNDING**

Total 453.772 CHF

Principal Investigator (329 179 CHF)

2015-2016	20.000 Euro (20.600 CHF) - NPWT zur offenen Wundtherapie beim Hund. Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung.
2020-2021	39.760 CHF - Comparison of alcohol and Octenidin for pre-surgical skin decontamination in dogs. Bachofner Stiftung Tierärztliche Fakultät Zürich.
2020-2022	11.500 CHF - Evaluation of $\alpha_3\beta_v$ and FAP as potential targets for NIR imaging in dog sarcomas. Albert-Heim Stiftung.
2021-2023	40.000 CHF - NIR-imaging of naturally occurring STS in dogs using an anti $\alpha_3\beta_v$ probe- a phase III controlled clinical trial. Bachofner Stiftung Tierärztliche Fakultät Zürich.
2021-2023	22.000 CHF - NIR-imaging of naturally occurring STS in dogs using an anti $\alpha_3\beta_v$ probe- a phase III controlled clinical trial. Stiftung für Kleintiere, Tierspital, Universität Zürich.
2021-2023	19.800 Euro (20.300 CHF) NIR-imaging of naturally occurring STS in dogs using an anti $\alpha_3\beta_v$ probe- a phase III controlled clinical trial. Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung.
2022-2024	146.094 \$ (139.489 CHF) Evaluation of a targeted anti $\alpha_v\beta_3$ integrin Near InfraRed (NIR-) dye for controlled resection of naturally occurring soft tissue sarcomas in dogs. American Kennel Club.
2022-2024	16.500 CHF Validierung von Indocyanin Grün zur intraoperativen Lymphografie zur Lymphadenektomie bei Hunden mit Mastzelltumoren. Albert Heim Stiftung.
2022-2024	19.530 CHF Validierung von Indocyanin Grün zur intraoperativen Lymphografie zur Lymphadenektomie bei Hunden mit Mastzelltumoren. Stiftung für Kleintiere, Tierspital, Universität Zürich.

Co-Principal Investigator (72.393 CHF)

2022-2023	29.653 CHF - REVEAL-FS: Characterization of novel targets for near infrared fluorescence-guided surgery of fibrosarcomas. CABMM
2022-2023	44.506 \$ (42.740 CHF) Molecular characterization of canine soft tissue sarcomas using spatially defined proteomics and transcriptomics. American Kennel Club

Funding of research group members (52.200 CHF)

2022 52.200 CHF- New receptor-targeted in vivo near infrared fluorescent markers for accurate resection of soft tissue sarcomas of the dog: a surrogate for human disease? Awarded to P. Beer, Forschungskredit CandDoc Universität Zürich.

• **CURRENT ACTIVE RESEARCH PROJECTS**

- 2022-2024 Validation of ICG Lymphography against Lymphoscintigraphy for detection of sentinel lymph nodes in dogs with mast cell tumors.
- 2021-2023 NIR-imaging of naturally occurring STS in dogs using an anti $\alpha_3\beta_v$ probe- a phase III controlled clinical trial.
- 2021-2023 *REVEAL-S*: Proteomic comparison of potential targets for NIR imaging of soft tissue sarcomas in dogs, cats and humans.
- 2020-2022 Evaluation of ex vivo expression of $\alpha_3\beta_v$ and FAP as potential targets for NIR imaging in different soft tissue sarcoma subtypes of human, canine and feline origin.

• **PUBLICATION LIST**

Total number of publications 37

First authored 18

Senior authored 10

H-Index 9

Research Studies

1. **Nolff MC**, Gellrich NC, Hauschild G, Fehr M, Bormann KH, Rohn K, et al. Comparison of two beta-tricalcium phosphate composite grafts used for reconstruction of mandibular critical size bone defects. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2009;22(2):96-102.
<https://doi.org/10.3415/VCOT-08-04-0038>
2. **Nolff MC**, Kokemueller H, Hauschild G, Fehr M, Bormann KH, Spalthoff S, et al. Comparison of computed tomography and microradiography for graft evaluation after reconstruction of critical size bone defects using beta-tricalcium phosphate. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38(1):38-46.
<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2009.07.010>.
3. Kokemueller H, Spalthoff S, **Nolff M**, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(4):379-87.
<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.01.010>.
4. **Nolff MC**, Fehr M, Bolling A, Denning R, Kramer S, Reese S, et al. Negative pressure wound therapy, silver coated foam dressing and conventional bandages in open wound treatment in dogs. A retrospective comparison of 50 paired cases. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2015;28(1):30-8.
<https://doi.org/10.3415/VCOT-14-05-0076>.
5. **Nolff MC**, Meyer-Lindenberg A. Negative pressure wound therapy augmented full-thickness free skin grafting in the cat: outcome in 10 grafts transferred to six cats. *J Feline Med Surg.* 2015;17(12):1041-8.
<https://doi.org/10.1177/1098612X15569893>
6. **Nolff MC**, Reese S, Fehr M, Denning R, Meyer-Lindenberg A. Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management. *J Small Anim Pract.* 2016;57(5):255-9.
<https://doi.org/10.1111/jsap.12476>
7. **Nolff MC**, Fehr M, Reese S, Meyer-Lindenberg AE. Retrospective comparison of negative pressure wound therapy and silver-coated foam dressings in open-wound treatment in cats. *J Feline Med Surg.* 2017;19(6):624-30.
<https://doi.org/10.1177/1098612X16645141>

8. Winter S, **Nolff MC**, Reese S, Meyer-Lindenberg A. [Comparison of the antibacterial efficacy of polyhexanide, cold atmospheric argon plasma and saline in the treatment of canine bite wounds]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2018;46(2):73-82.
9. **Nolff MC**, Albert R, Reese S, Meyer-Lindenberg A. Comparison of Negative Pressure Wound Therapy and Silver-Coated Foam Dressings in Open Wound Treatment in Dogs: A Prospective Controlled Clinical Trial. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2018;31(4):229-38.
<https://doi.org/0.1055/s-0038-1639579>
10. **Nolff M**, Albert R, Wohlsein P, Baumgartner W, Reese S, Meyer-Lindenberg A. Histomorphometric evaluation of MMP-9 and CD31 expression during healing under Negative Pressure Wound Therapy in dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2018;160(9):525-32.
<https://doi.org/10.17236/sat00173>
11. **Nolff MC**, Winter S, Reese S, Meyer-Lindenberg A. Comparison of polyhexanide, cold atmospheric plasma and saline in the treatment of canine bite wounds. *J Small Anim Pract*. 2019;60(6):348-55.
<https://doi.org/10.1111/jsap.12971>
12. Albert R, Meyer-Lindenberg A, Reese S, **Nolff MC**. Evaluation of systemic effects of negative pressure wound therapy in open wound treatment in dogs. *VCOT open* 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105728>
13. Winter S, Meyer-Lindenberg A, Wolf G, Reese S, **Nolff MC**. In vitro evaluation of the decontamination effect of cold atmospheric argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries. *J Microbiol Methods*. 2020;169:105728.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105728>
14. Howes CL, Sumner JP, Ahlstrand K, Hardie RJ, Anderson D, Woods S, **Nolff MC**, et al. Long-term clinical outcomes following surgery for spontaneous pneumothorax caused by pulmonary blebs and bullae in dogs - a multicentre (AVSTS Research Cooperative) retrospective study. *J Small Anim Pract*. 2020;61(7):436-41.
<https://doi.org/10.1111/jsap.13146>
15. Allerton F, Prior C, Bagcigil AF, Broens E, Callens B, Damborg P, **Nolff MC**, et al. Overview and Evaluation of Existing Guidelines for Rational Antimicrobial Use in Small-Animal Veterinary Practice in Europe. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(4).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040409>
16. Villedieu E, **Nolff MC**, Del Magno S, Emmerson T, Field E, Hattersley R, De La Puerta B, Ragni RA, Baines SJ. Outcome of superficial brachial axial pattern flaps used to close skin defects in dogs: 16 cases (1996-2019). *J Small Anim Pract* 2021.
<https://doi.org/10.1111/jsap.13435>
17. Beer P, Rohrer Bley C, **Nolff MC**. NIR assisted lymph node resection in dogs with mast cell tumors- a retrospective comparative study. Accepted for publication *JSAP* 2022.
<https://doi.org/10.1111/jsap.13529>
18. Gariboldi EM, Stefanello D, **Nolff MC**, De Zani D, Zani D, Grieco V, Giudice C, Recordati C, Ferrari F, Ferrari R, Chiti LE. Sentinel Lymph Node Biopsy Is Feasible in Dogs with Scars from Prior Local Excision of Solid Malignancies. *Animals*. 2022.
<https://doi.org/10.3390/ani12172195>
19. Mohr K, **Nolff MC**, Zablotski Y, Dittus T Korbel R, Meyer-Lindenberg A, Wolf G, Hiss K, Peters H, Schulz B. Einfluss der Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken auf den Antibiotikaeinsatz bei Hund und Katze in Bayern. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*. 2022
[10.1055/a-1949-0407](https://doi.org/10.1055/a-1949-0407)
20. Arz R, Chiti LE, Krudewig C, Grieco V, Meier V, Fejös C, Stefanello D, **Nolff MC**. Lymph node metastasis in feline cutaneous low-grade mast cell tumors. *J Feline Med Surg*. 2023. 25(1).
<https://doi.org/10.1177/1098612X221138468>
21. Beebe E, Pöschel A, Kunz L, Wolski Witold, Motamed Z, Meier D, Guscetti F, **Nolff MC***, Markkanen E*. Proteomic profiling of canine fibrosarcoma and adjacent peritumoral tissue. *Neoplasia*. 2022
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100858>

23. Chiti LE, Gariboldi EM, Stefanello D, De Zani D, Grieco V, **MC Nolff**. Feasibility and outcome of sentinel node mapping and biopsy in cats with solid malignancies. *Animals*. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12223116>

*shared senior authorship

Review articles

1. **Nolff MC**, Meyer-Lindenberg A. [Necrotizing fasciitis: a review]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2014;42(2):117-24.
2. **Nolff MC**, Meyer-Lindenberg A. [Negative Pressure Wound Therapy (NPWT) in small animal medicine. Mechanisms of action, applications and indications]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2016;44(1):26-37.
3. **Nolff MC**. Filling the vacuum: Role of negative pressure wound therapy in open wound management in cats. *J Feline Med Surg*. 2021;23(9):823-33. <https://doi.org/10.1177/1098612X211037873>
4. Beer P, Chiti LE, **Nolff MC**. The role of lymphadenectomies and sentinel node mapping in veterinary surgical oncology. 2023. *Lymphatics* 1(1)2-18. <https://doi.org/10.3390/lymphatics1010002>

Case Reports

1. **Nolff MC**, Puff C, Langer B, Fehr M. Feline osteochondromatosis in a FELV-negative European shorthair cat. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2014;42(1):55-9.
2. **Nolff MC**, Meyer-Lindenberg A. Necrotising fasciitis in a domestic shorthair cat--negative pressure wound therapy assisted debridement and reconstruction. *J Small Anim Pract*. 2015;56(4):281-4. <https://doi.org/10.1111/jsap.12275>.
3. **Nolff MC**, Layer A, Meyer-Lindenberg A. Negative pressure wound therapy with instillation for body wall reconstruction using an artificial mesh in a Dachshund. *Aust Vet J*. 2015;93(10):367-72. <https://doi.org/10.1111/avj.12368>
4. **Nolff MC**, Flatz KM, Meyer-Lindenberg A. Preventive incisional negative pressure wound therapy (Prevena) for an at-risk-surgical closure in a female Rottweiler. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2015;157(2):105-9. <https://doi.org/10.17236/sat00009>
5. **Nolff MC**, Pieper K, Meyer-Lindenberg A. Treatment of a perforating thoracic bite wound in a dog with negative pressure wound therapy. *J Am Vet Med Assoc*. 2016;249(7):794-800. <https://doi.org/10.2460/javma.249.7.794>
6. Arz R, Maier V, Seehusen F, **Nolff MC**. Indocyanine based Near Infrared Lymphography for real time detection of lymphatics in a cat with multiple mast cell tumors. *J Fel Med Surg Open Reports* 2022. <https://doi.org/10.1177/20551169221074961>
7. Michalik D, **Nolff MC**. Indocyanine green-based angiography for real-time assessment of superficial brachialis axial pattern flaps vascularization in two dogs. *Front. Vet. Sci*. 2022. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859875>
8. Pfitzer J, Natsios P, Beer P, **Nolff MC**. Long-term outcome after total scapulectomy for the treatment of osteosarcoma in a cat. *J Feline Medicine and Surgery Open Reports*. 2022. [10.1177/20551169221121901](https://doi.org/10.1177/20551169221121901)

Editorials

1. Chiti L, Nolff MC, Stefanello D. Cervical lymph node staging in head and neck tumors: bridging the gap between humans and companion animals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05829-2>

Textbooks.

1. **Nolff MC.** Modernes Wundmanagement bei Hund und Katze, Thieme Verlag. 2020. ISBN 978-3-13-242717-4.