

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Charakterisierung Patienten-individueller Tumormodelle für  
endokrine Tumore**

Dissertation

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

vorgelegt von

Franziska-Helene Scheller

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Felix Beuschlein

Mitberichterstatter: PD Dr. Susanna Müller  
Prof. Dr. Michael Ritter  
Prof. Dr. Irene Schmid

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Constanze Hantel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2019

**Meinen Eltern**

**und**

**meinem Mann**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung.....	14
1.1. Hintergrund .....	14
1.2. Neuroendokriner Tumor des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) .....	15
1.2.1. Klassifikation des GEP-NET .....	16
1.2.2. Epidemiologie und Genetik des GEP-NET.....	17
1.2.3. Diagnostik des GEP-NET .....	17
1.2.4. Therapiekonzepte und Prognose des GEP-NET.....	19
1.3. Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Karzinom).....	20
1.3.1. Klassifikation des NNR-Karzinoms .....	20
1.3.2. Epidemiologie und Genetik des NNR-Karzinoms .....	21
1.3.3. Diagnostik des NNR-Karzinoms .....	21
1.3.4. Therapiekonzepte und Prognose des NNR-Karzinoms.....	22
1.4. Phäochromozytom.....	23
1.4.1. Epidemiologie und Genetik des Phäochromozytoms .....	24
1.4.2. Diagnostik des Phäochromozytoms .....	25
1.4.3. Therapiekonzepte und Prognose des Phäochromozytoms.....	26
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	29
2.1. Auflistung der verwendeten Materialien und Substanzen .....	29
2.2. Tumormaterial .....	33
2.3. Versuchstiere .....	37
2.4. Tiermodell und Implantationstechnik.....	37
2.5. Histologische Aufarbeitung.....	37
2.5.1. Anfertigung der Schnitte .....	37

2.5.2.	Haematoxylin-Eosin-Färbung .....	38
2.5.3.	Immunhistochemische Färbungen .....	39
2.6.	Quantifizierung .....	43
2.7.	Statistik .....	44
3.	Ergebnisse .....	45
3.1.	Modell zur Implantation ganzer Tumorstücke .....	45
3.2.	Vergleich des Tumormaterials vor und nach Transplantation.....	46
3.2.1.	Proliferationsverhalten in den verschiedenen Tumorentitäten .....	48
3.2.2.	Expression von ChrA in den neuroendokrinen Tumoren .....	55
3.2.3.	Expression von SF-1 in den NNR-Karzinomen .....	60
4.	Diskussion.....	64
4.1.	Tumormodelle .....	64
4.1.1.	GEP-NET.....	67
4.1.2.	NNR-Karzinom .....	68
4.1.3.	Phäochromozytom .....	70
4.2.	Immunhistochemische Charakterisierung .....	73
4.2.1.	Proliferationsmarker .....	74
4.2.2.	Marker für neuroendokrine Tumore.....	75
4.2.3.	Marker für NNR-Karzinome.....	77
4.3.	Weitere Ansätze individueller Tumorcharakterisierung.....	78
4.3.1.	GEP-NET.....	80
4.3.2.	NNR-Karzinom .....	82
4.3.3.	Phäochromozytom .....	84
4.3.4.	Ausblick.....	85
5.	Zusammenfassung.....	88
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Anhang .....	99
7.1.	Veröffentlichte Teilaspekte .....	99
7.2.	Abbildungsverzeichnis .....	100

7.3.	Tabellenverzeichnis.....	101
7.4.	Danksagung.....	102

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
ad	aqua dest.
ADIUVO	adjuvante Mitotane-Therapie versus alleinige Nachbeobachtung; <a href="http://www.adiuvo-trial.org">www.adiuvo-trial.org</a>
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AK	Antikörper
AK-Kontrolle	Antikörper-Kontrolle
AKT	≙ Protein-Kinase B; (oncogene in the directly transforming retrovirus AKT8, isolated from a spontaneous thymoma of an AKR mouse)
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
ATRX	Alpha-Thalasemia Mental Retardation Syndrome, X-linked
BARD1	BRCA1-Associated RING Domain Protein 1
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CD31	Cluster of Differentiation 31
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGH	Comparative Genome Hybridization
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
ChrA	Chromogranin A
CK19	Cytokeratin 19
CNA	Copy Number Alteration
CpGs	Candidate Plasticity-Related Genes

CT	Computertomographie
CVD	Cyclophosphamid, Vincristin, Dacarbazin
Cy2	Cyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAXX	Death Domain-Associated Protein
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	Tetraazacyclododecan-Tetraessigsäure
DOTATATE	DOTA-Octreotate
ENET	European Neuroendocrine Tumor Society
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
EtOH	Ethanol
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FAA	Fraction of Aberrant Arms
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-PET
FBS	fetales bovines Serum
FIRM-ACT	First International Randomized Trial in Locally Advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment; <a href="http://www.firm-act.org">www.firm-act.org</a>
g	Gramm
GEP-NET	neuroendokriner Tumor des gastro-entero-pankreatischen Systems
GIT	Gastrointestinaltrakt
HCl	Chlorwasserstoff
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor

HMB-45	Homatropin-Methylbromid 45
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPF	High Power Field ≙ Hauptgesichtsfeld
HSP	Hitzeschockprotein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF1R	Insulin-like Groth Factor 1 Receptor
IHC	Immunhistochemie
In	Indium
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Lebermet.	Lebermetasase
Lu	Luthetium
Magenmet.	Magenmetastase
M	molar
MART1	Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1
MAX	Myc-assoziierter Factor X
Melan A	Melanocyte Antigen
MEN Typ 1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1
MEN Typ 2	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2
mg	Milligramm
<sup>131</sup> I-MIBG	<sup>131</sup> Jod-MIBG
MIBG-Szintigraphie	Metaiodbenzylguanidin-Szintigrafie
miRNA	microRNA

Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPC	Mouse Pheochromocytoma Cell
MR-Angiographie	Magnetresonanz-Angiographie
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin = Ziel des Rapamycins im Säugetier
MTT	Mouse Tumor Tissue
MTT-luc-Zellen	MTT-Luciferase-Zellen
MW	Mittelwert
MYC	Myelocytomatosis Viral Oncogene
N	$\hat{=} M$
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NET	neuroendokriner Tumor
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nukleärer Faktor $\kappa$ B (Leichtkettenenhancer aktivierter B-Zellen))
NGF	Nerve Growth Factor
NMRI	Naval Medical Research Institute

NN	Nebenniere
NNR	Nebennierenrinde
NNR-Karzinom	Nebennierenrinden-Karzinom
NOD-SCID	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
N/Q	nicht quantifizierbar
NSE	Neuron-spezifische Enolase
PASS	Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction; ≙ Polymerase-Kettenreaktion
PDX	Patient Derived Xenograft
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Propylhydroxylase-Domänen
pNEC	pankreatisches neuroendokrines Karzinom
pNET	pankreatischer NET
PRRT	Peptidrezeptor vermittelte Radionuklidtherapie
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog; Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RPMM	Recursively Partitioned Mixture
RRID	Research Resource Identifier

SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
s.c.	subkutan
SD	Standard Deviation; $\hat{=}$ Standardabweichung
SDHA	Succinat-Dehydrogenase Complex Subunit A
SDHB	Succinat-Dehydrogenase Complex Subunit B
SDHC	Succinat-Dehydrogenase Complex Subunit C
SDHD	Succinat-Dehydrogenase Complex Subunit D
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SF-1	Steroidogenic factor 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRS	Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
Thr	Threonin
TOP2A	DNA Topoisomerase 2-Alpha
TSC-2	Tuberous Sclerosis Complex 2; $\hat{=}$ Tuberin
TTP	Time to Progression
TZD	Thiazolidindione
TNM	Tumor Nodus ( $\hat{=}$ Lymphknoten) Metastase
TMA	Tissue-Microarray
TMEM127	Transmembranprotein 127
TOC	D-Phenylalanin-cyclo-[Cystein-Tyrosin-D-Tryptophan-Lysin-Threonin-Cystein]-Thr(ol)
TP53	Tumor-Protein p53
TSC-2	Tuberöse Sklerose Complex 2; $\hat{=}$ Tuberin

Tween 20	Polysorbat 20
UICC	Union for International Cancer Control
µm	Mikrometer
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau
VTT	venöser Tumorthrombus
vs.	versus
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization
Y	Yttrium
z.B.	zum Beispiel
#	Bestellnummer

# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergrund

Neuroendokrine Tumore des gastro-entero-pankreatischen Systems (GEP-NET), Nebennierenrinden-Karzinome (NNR-Karzinome) sowie Phäochromozytome stellen eine heterogene Gruppe von Neoplasien endokriner Organe dar. Vor allem klinisch manifestieren sich diese drei Tumorentitäten sehr unterschiedlich [1], [2]. Es können rasch progrediente Verläufe mit hoher Proliferationsrate und aggressivem metastatischem Potential beobachtet werden [3], aber auch sehr langsames Tumorwachstum kommt vor [4]. Gerade bei den Phäochromozytomen ist eine langsame Wachstumsdynamik zu beobachten, die oft geringe Ansprechraten in der antitumoralen Therapie verursacht. Teilweise werden die Tumore klinisch erst sehr spät in fortgeschrittenem Stadium auffällig und diagnostiziert. Besonders nicht-funktionelle, neuroendokrine Tumore (NET) und NNR-Karzinome stellen auf Grund ihrer Symptomarmut oft eine diagnostische Herausforderung dar. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, die bisweilen zufällig im Rahmen einer Bildgebung bei unspezifischen Symptomen erfolgt, liegen häufig Metastasen vor. Daraus resultiert eine stadienabhängig schlechte Prognose. Speziell die NNR-Karzinome weisen oft eine infauste Prognose auf [5]. Prinzipiell macht die hohe Variabilität bezüglich Differenzierungsgrad, endokriner Aktivität und Teilungsrate der Tumorzellen eine Behandlung erforderlich, die an die Gegebenheiten des individuellen Patienten angepasst ist.

Bislang konzentrierte sich die klinisch-experimentelle Forschung darauf, bestimmte Tumor-Zelllinien im Tierversuch einzusetzen. Stellvertretend für die GEP-NET ist die BON-Zelllinie eine vielgenutzte Zelllinie, die ursprünglich einem metastasierten Pankreaskopf-Karzinom eines 28-jährigen Mannes entstammt und 1986 von Townsend jr. und Kollegen etabliert worden ist [6]. Seit 1980 steht die adrenokortikale Karzinom-Zelllinie NCI-H295 zur Verfügung, die Gazdar et al. aus dem Gewebe eines NNR-Karzinoms einer 48-jährigen Frau gewonnen haben [7]. Allerdings stehen nicht für alle GEP-NET, NNR-Karzinome sowie Phäochromozytome repräsentative Zelllinien zur Verfügung. Um Patienten mit derartig inhomogener klinischer Manifestation nicht nur generalisiert zu behandeln, wurde im Rahmen dieses Projektes an der Entwicklung und Charakterisierung eines Patienten-individuellen Tumormodells (PDX-Modell) des endokrinen Systems gearbeitet. Rygaard et al. beschrieben 1969 [8] erstmals das Wachstum eines humanen Tumors in einer Maus. Dieser wurde als intaktes Gewebstück in einer athymischen und somit immundefizienten Nacktmaus implantiert. Analog zu diesem Ansatz wurden für dieses Projekt ganze Gewebstücke von operierten Patiententumoren subkutan in weibliche, athymische Nacktmäuse implantiert, histologisch analysiert und charakterisiert. Mittels einer angelegten Tumorbank und der Möglichkeit von *in vivo*

Therapieexperimenten sollen zukünftig möglichst Patienten-individuelle Therapiekonzepte mit optimierter klinischer Versorgung ermöglicht werden.

Zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Tumorentitäten, welche in diesem Projekt bearbeitet wurden, dienen die folgenden, einführenden Kapitel.

## **1.2. Neuroendokriner Tumor des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET)**

Einhergehend mit der Historie der Histologie und Histochemie hat die Entdeckung der endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes (GIT) ihre Ursprünge im 19. Jahrhundert. Kulchitzky und Ciacco brachten Ende des 19. Jahrhunderts den Begriff der enterochromaffinen Zellen auf [9], [10]. Oberndorfer beschrieb die Eigenschaften der neu entdeckten Dünndarm-Tumore und stufte sie anfangs als „benigne Karzinome“ ein. Da die Tumore zwar in ihrer histologischen Beschaffenheit, nicht jedoch in der klinischen Erscheinung mit langsamer Wachstumskurve und scharf begrenzten Rändern mit malignen Prozessen vereinbar waren, führte Oberndorfer später den Begriff „Karzinoid“ ein [9]. Masson wies daraufhin 1920 erstmals auf die neuroendokrinen Zellen als Ursprung der Karzinoide hin [11]. Kurz darauf ergänzte Oberndorfer die Karzinoide um die Möglichkeit des malignen Wachstums und der Entwicklung von Metastasen [9]. Der österreichische Pathologe Feyrter begründete das Konzept des „diffus endokrinen Systems“ und trug damit maßgeblich zum heutigen Verständnis der Neuroendokrinologie bei [12]. Im Jahr 1938 beschrieb er erstmals „Helle Zellen“ oder klare Zellen des Pankreas und GIT, welche neuroendokrine Merkmale zeigten [13]. Diese „Hellen Zellen“ werden mit dem aktuellen Verständnis als neuroendokrine Zellen bezeichnet. Daraus hervorgehende Tumore werden in der heutigen Terminologie „neuroendokrine Tumore“, kurz NET genannt und sind seltene epitheliale Tumore.

Im adulten Organismus sind neuroendokrine Zellen nicht als kompakte Organsysteme angeordnet. Das diffuse neuroendokrine System beinhaltet neuroendokrine Zellen mit Ursprung in der embryonalen Neuralleiste, dem Endoderm sowie dem Neuroektoderm [14]. Daraus entstehende Tumore weisen Zellen auf, welche Hormone in gesteigertem Ausmaß produzieren können und Neuronen ähnlich sind. Je nach Tumorentität und deren Funktionalität ergibt sich damit die klinische Präsentation: durch die Freisetzung bestimmter Hormone und/oder Monoamine im Rahmen der Tumorerkrankung kommt es zu Symptomen. Diese können sich teilweise zu ganzen klinischen Syndromen wie beispielsweise dem Zollinger-Ellison-Syndrom (gesteigerte Gastrin-Sekretion) oder dem Karzinoid-Syndrom (gesteigerte Serotonin-Sekretion) zusammensetzen [15]. Die häufiger auftretenden, funktionell inaktiven Tumore werden meist zufällig bei unspezifischen Symptomen wie Bauchschmerzen oder unklarem Gewichtsverlust entdeckt. Prinzipiell stellt die Heterogenität

endokriner Zellen im GIT die Basis für die funktionelle Komplexität der daraus resultierenden, differenzierten neuroendokrinen Tumore dar.

### 1.2.1. Klassifikation des GEP-NET

Obwohl NET in unterschiedlichsten anatomischen Strukturen wie den Merkelzellen der Haut, der Schilddrüse oder der Bronchialschleimhaut auftreten können, manifestieren sich die meisten NET im gastroenterologischen System [14], [16]. Eine erste Klassifikation erfolgte 1963 durch Williams und Sandler, die eine Einteilung nach der embryologischen Entwicklung vornahmen. Die Tumore wurden in Vorderdarm, Mitteldarm und Hinterdarm eingestuft [17]. Die früher gebräuchliche Bezeichnung des Karzinoids wurde im Jahr 2000 in der WHO-Klassifikation ersetzt. In Anlehnung an den Differenzierungsgrad werden die neuroendokrinen Neoplasien heute in neuroendokrine Tumore und neuroendokrine Karzinome unterteilt.

WHO 1980	WHO 2000	WHO 2010
Karzinoid	hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	Neuroendokriner Tumor G1 (Karzinoid)
	hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	Neuroendokriner Tumor G2
	gering differenziertes (kleinzelliges) neuroendokrines Karzinom	(klein- oder großzelliges) neuroendokrines Karzinom G3
Mukokarzinoid Gemischtes Karzinoid- Adenokarzinom	gemischtes endokrino-exokrines Karzinom	gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom
Pseudotumoröse Läsion	Tumor-ähnliche Läsion	hyperplastische und präneoplastische Läsion

**Tabelle 1: WHO-Klassifikationen der neuroendokrinen gastro-entero-pankreatischen Neoplasien im Vergleich (adaptiert nach Schott et al. [18])**

Neben der WHO-Klassifikation wird die TNM-Klassifikation der „European Neuroendocrine Tumor Society“ (ENETS) genutzt, welche die Infiltration einzelner Gewebsschichten, die Tumorgroße, beteiligte Lymphknoten und Metastasen, ergänzt durch das Grading, beinhalten [19].

### 1.2.2. Epidemiologie und Genetik des GEP-NET

Anhand epidemiologischer Daten wurde gezeigt, dass die Prävalenz und Inzidenz der GEP-NET in den letzten Jahren weltweit zugenommen haben, was vermutlich technisch verbesserten Detektionsmethoden geschuldet ist [20]. Die Inzidenzrate variiert je nach Literaturangabe und betrachtetem geografischem Gebiet. Godwin beschrieb 1975 eine Inzidenz von 1-2/100 000 [21], während diese 2003 mit 2,5-5/100 000 beziffert wurde [22]. Die gut differenzierten NET kommen in ähnlicher Geschlechterverteilung bei Frauen und Männern vor allem im mittleren Lebensalter vor [23]. Im Kindesalter stellt der NET der Appendix mit 18% aller neuroendokriner Tumore den häufigsten Tumor unter den Neoplasien des GIT dar. Insgesamt sind neuroendokrine Tumore bei Kindern und Jugendlichen selten zu finden [24].

Eine große Heterogenität zeigt sich im Metastasierungs-Verhalten: je nach Literaturangabe weisen bis zu 77% der Patienten mit NET des Pankreas (pNET) und bis zu 91% der Patienten mit NET im Ileum zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Fernmetastasen auf. NET, die den Magen betreffen, sind in nur 30% [25], NET, welche in der Appendix lokalisiert sind, in weniger als 5% [26] bis zu 15% metastasiert [25]. Generell korreliert die Metastasierungsrate negativ mit dem Differenzierungsgrad [27].

Durch Keimbahnmutationen verursacht und bei autosomal-dominantem Erbgang werden familiär gehäuft auftretende GEP-NET beschrieben. Häufig kommt diese Gruppe von Tumoren jedoch bei genetischen Syndromen vor. Bei der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN Typ 1) werden Tumore im Hypophysenvorderlappen, der Nebenschilddrüse sowie dem enteropankreatischen, endokrinen Gewebe detektiert. Nach dem primären Hyperparathyreoidismus ist der GEP-NET die zweithäufigste Manifestation des MEN Typ 1 [28]. Rund ein Zehntel der Patienten mit Von-Hippel-Lindau-Syndrom entwickeln einen pNET [29]. Im Rahmen einer Tuberösen Sklerose oder Neurofibromatose Typ 1 können duodenale und pankreatische Somatostatinome oder nicht funktionell aktive GEP-NET auftreten.

### 1.2.3. Diagnostik des GEP-NET

Nach Auftreten erster Symptome dauert es gewöhnlich fünf bis sieben Jahre bis zur Diagnosestellung, wobei die Tumorerkrankung häufig in fortgeschrittenem Stadium ist. Funktionell inaktive GEP-NET werden oft besonders spät, mit lokaler Infiltration sowie beginnender Metastasierung entdeckt [2]: Bei Diagnosestellung haben bereits mehr als 30% der Tumore Metastasen entwickelt [27].

Die Diagnostik sollte pathologische Analysen mittels konventioneller Histologie sowie Immunhistochemie beinhalten. Sekretionsprodukte funktioneller GEP-NET, neuroendokrine Marker sowie weitere Tumormarker sollten untersucht werden, so beispielsweise Synaptophysin, Neuron-spezifische Enolase (NSE), Chromogranin A (ChrA) [2] und Carcinoembryonales Antigen (CEA). Nicht alle dieser biologischen Marker sind für NET spezifisch und auch die Sensitivität ist teilweise gering. ChrA und NSE sind besonders von Bedeutung, da beide Tumormarker sowohl bei nicht-funktionellen als auch bei funktionellen NET erhöht sein können [30]. Als Breitspektrummarker stellt die Bestimmung von ChrA im Serum für NET ein relativ sensitives, aber mäßig spezifisches Verfahren dar. Im Rahmen der Hypersekretion wird ChrA als Bestandteil der Membran von Sekretgranula neuroendokriner Zellen mit Peptidhormonen ko-sezerniert. Die ChrA-Spiegel im Blut sind fast bei allen metastasierten NET erhöht [31]. Ein weiterer, bei Patienten mit Karzinoidsyndrom zu untersuchender Marker ist ein Stoffwechselprodukt von Serotonin, die 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES). Die enzymatische Umwandlung von Tryptophan in Serotonin ist beim Karzinoidsyndrom gesteigert, es kommt zu einer vermehrten Ausscheidung von Serotoninmetaboliten, welche im 24-h-Urin messbar sind. Auch Dopamin und Tachykinine können beim Karzinoidsyndrom erhöht sein [2]. Neben den neuroendokrinen Markern sollte histopathologisch der Ki67-Index, der für die proliferative Aktivität steht, bestimmt werden. Ki67 ist ein Protein, das im Zellzyklus nur während der Ruhephase ( $G_0$ ) inaktiv ist und somit als geeigneter Marker für die Wachstumsfraktion bestimmter Zellpopulationen herangezogen werden kann. Der Index wird in Prozent angegeben und berechnet sich, indem die positiv gefärbten Zellkerne in Relation zu allen Zellkernen gesetzt werden [32]. Dieser Wert dient neben der Anzahl der Mitosefiguren dem Grading als Basis: bei G1-Tumoren ist der Ki-67-Index  $\leq 2\%$ , bei G2-Tumoren zwischen 3 und 20% und bei G3-Tumoren beträgt er  $> 20\%$  [15]. Des Weiteren kann eine bildgebende Diagnostik herangezogen werden, die durch eine funktionelle Bildgebung ergänzt wird. Bei Rezeptor-positiven Tumoren kann die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) mittels  $^{111}\text{In}$ -markierten Somatostatins Aufschluss über die Lokalisation und Ausbreitung des Tumors geben [33]. Spiral- und Mehrzeilen-CT sowie perfusionsgestützte Aufnahmetechniken wie die Magnetresonanz-Angiographie (MR-Angiographie) können einen auffälligen Gefäßreichtum in den Tumoren detektieren [34]. Standard-PET mittels F-Deoxyglukose ist für die Detektion gut differenzierter endokriner Tumore nicht geeignet. Es könnten in der Zukunft aber spezifische Tracer wie  $^{11}\text{C}$ -Hydroxytryptophan oder  $^{18}\text{F}$ -Dihydroxyphenylalanin (DOPA), speziell für die Darstellung klassischer Karzinoide des Mitteldarms an Bedeutung gewinnen. Vor allem für die Detektion von kleinen Primärtumoren und Metastasen in Lymphknoten ist dieses Verfahren aussagekräftiger als ein CT oder MRT [35].

#### 1.2.4. Therapiekonzepte und Prognose des GEP-NET

Für Patienten mit GEP-NET dienen aktuell die primäre Tumorresektion, das Verabreichen systemischer Therapeutika und der Einsatz von Radionukliden als Therapiemöglichkeiten. Sofern eine komplette Resektion gelingt, stellt die chirurgische Tumorentfernung nach einer frühen Detektion die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar [36]. Im Vergleich zu unbehandelten Patienten können die Lebensqualität und die Überlebensrate durch die totale Tumorresektion oder das aggressive Debulking erhöht werden [2].

Die medikamentöse Therapie ist aktuell nur bei Irresektabilität, inkompletter Tumorresektion oder hoch malignen neuroendokrinen Karzinomen von Nutzen. Die verschiedenen Entitäten reagieren unterschiedlich auf Chemotherapie: pNET zeigen Ansprechraten von 30-50% [37], gut differenzierte NET des Mittel- oder Hinterdarms sind dagegen meist resistent gegen kombinierte zytotoxische Chemotherapeutika [38]. Klassische Chemotherapeutika wie Cisplatin, Dacarbazin, Doxorubicin, Etoposid, Fluoruracil oder Streptozotocin wurden vor allem in der Vergangenheit verwendet [39], [40]. Auf Grund einer nur geringen Ansprechrate auf eine Monotherapie wird heute häufiger eine Kombinationstherapie eingesetzt. Dabei hängt das Ansprechen vom Tumorursprung und dem proliferativen Potential ab. Teilweise verhindern massive Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität eine Rolle als first-line Therapie [41]. Bei deutlich geringeren Nebenwirkungen können zur Symptomkontrolle bei Hypersekretion und als weitere Behandlungsmethode Somatostatin-Analoga und/oder Interferon- $\alpha$  eingesetzt werden [42]. Ein neuer Therapieansatz stellt die Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie (PRRT) mit  $^{90}\text{Y}$  und/oder  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC- oder DOTATATE dar. Pharmaka, die auf den vascular endothelial growth factor (VEGF) abzielen sowie der mTOR-Inhibitor Everolimus sind weitere potenzielle Therapeutika [43], [15]. Insgesamt ist trotz einer nicht geringen Auswahl an Therapie-Optionen die Effektivität der bestehenden Therapiekonzepte noch unbefriedigend. Individuelle Behandlungsstrategien mit gesteigerter Effektivität und daraus resultierender optimierter Prognose sollten demnach zunehmend weiterentwickelt werden.

Im Gegensatz zu der steigenden Inzidenzrate hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den vergangenen Jahrzehnten nicht signifikant geändert. Je nach genauer Lokalisation des Primärtumors und Tumorstadium schwankt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen ca. 82% bei lokal begrenzten Dünndarm-NET und ca. 18% bei schlecht differenzierten G3-Tumoren [51]. Zusammenfassend hängt die Prognose von der primären Tumorlokalisierung, Tumorausbreitung, histologischen Differenzierung, Proliferationsaktivität sowie von Alter, Geschlecht, Rasse und dem Jahr der Diagnose ab [15], [27]. Retrospektive Daten deuten darauf hin, dass auch das zirkulierende ChrA von prognostischem Wert ist; stark erhöhte ChrA-Werte gehen mit einem eingeschränkten Überleben

einher. Es gibt eine Reihe weiterer Gewebemarker, welche für prognostische Zwecke zukünftig eine bedeutende Rolle einnehmen könnten. Dazu zählen beispielsweise Cytokeratin 19 (CK19), die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) oder die Expression von Tuberin (TSC-2) [15].

### 1.3. Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Karzinom)

Die Nebennieren, lokalisiert auf den oberen Nierenpolen, sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben und werden in Rinde und Mark unterteilt. In beiden Kompartimenten werden Hormone produziert. Je nach Wachstumsverhalten werden Tumore der Nebennierenrinde in Adenome und adrenokortikale Karzinome eingestuft. Funktionell betrachtet kann es bei beiden Tumorentitäten zu einer endokrinen Aktivität oder Inaktivität kommen. Alle in der Nebennierenrinde produzierten Hormone und deren Vorstufen können von endokrin aktiven Tumoren sezerniert werden. Das NNR-Karzinom ist ein seltener, oftmals hochmaligner Tumor.

#### 1.3.1. Klassifikation des NNR-Karzinoms

Eine weltweit einheitliche, generell akzeptierte Stadieneinteilung existiert für das NNR-Karzinom bislang nicht. Das Staging und somit die Klassifizierung basiert auf der von MacFarlane [45] sowie der modifizierten Einteilung von Sullivan et al. Dafür werden die jeweilige Tumorgöße und gegebenenfalls die Metastasenbildung herangezogen. Auf den TNM-Kriterien für NNR-Karzinome aufbauend wurde 2004 erstmals eine WHO/UICC (International Union for Cancer Control) Klassifikation erarbeitet, die hinsichtlich der prognostischen Einschätzung allerdings nicht ausreichend aussagekräftig ist. Deshalb wurde kurze Zeit später eine überarbeitete, die sogenannte ENSAT-Klassifikation eingeführt [46].

Tumorstadium	WHO/UICC-Einteilung von 2004	ENSAT-Klassifikation von 2008
I	T1 N0 M0	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0	T2 N0 M0
III	T1-2 N1 M0 T3 N0 M0	T1-2 N1 M0 T3-4 N0-1 M0
IV	T1-4 N0-1 M1 T3 N1 M0 T4 N0-1 M0	T1-4 N0-1 M1

**Tabelle 2: Klassifikations-Modelle für das NNR-Karzinom**

**T1: Tumor ≤ 5cm; T2: Tumor > 5cm; T3: Infiltration in Nachbargewebe; T4: Invasion in Nachbarorgane; Ergänzung für T4 bei der ENSAT-Klassifikation: Tumorthrombus in V. cava oder V. renalis; N0: kein Lymphknoten-Befall; N1: positiver Lymphknoten-Befall; M0: keine Fernmetastasierung; M1: Fernmetastasierung**

### **1.3.2. Epidemiologie und Genetik des NNR-Karzinoms**

Das NNR-Karzinom tritt sehr selten mit einer Inzidenz von 0,07-0,2/100 000 auf. Frauen erkranken etwas häufiger (in 55-60% aller Fälle) als Männer. Es ist eine bimodale Altersverteilung mit dem ersten Gipfel im Kindesalter und einem zweiten innerhalb der fünften Lebensdekade zu beobachten [47]. Im Kindesalter ist das NNR-Karzinom neben weiteren adrenalen Ursachen wie einem Adenom oder beidseitiger Hyperplasie eine der häufigsten Ursachen für das Cushing-Syndrom [48]. Die Pathogenese ist noch nicht hinreichend geklärt. NNR-Karzinome treten auch im Rahmen von hereditären Tumorsyndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom (Keimbahnmutation des p53-Tumorsuppressorgens), dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (deutliche IGF-II-Überexpression) oder dem MEN Typ 1 (Funktionsverlust des MENIN-Gens) auf [49]. Ein aggressives Tumorwachstum kann in Zusammenhang mit dem Expressionsverlust des ACTH-Rezeptors beobachtet werden. Die ACTH-Rezeptorexpression kann auch sekundär verloren gehen. In diesem Fall könnte sie als Differenzierungsmarker eingesetzt werden [50].

### **1.3.3. Diagnostik des NNR-Karzinoms**

Patienten mit einem NNR-Karzinom klagen oft über unspezifische abdominelle Symptome und zeigen nur selten eine B-Symptomatik. Durch die Optimierung der technischen Standards werden NNR-Karzinome heute oftmals als Inzidentalome im Rahmen einer bildgebenden Aufnahme des Abdomens und somit in weniger fortgeschrittenen Stadien als früher entdeckt [51]. Zur Diagnosesicherung werden einerseits bildgebende Verfahren wie (Endo)-Sonographie, CT, MRT oder optional ein FDG-PET, andererseits die Hormonanalyse herangezogen. Tumore der Nebennierenrinde mit einem Durchmesser > 5cm sind hochgradig karzinomverdächtig [52]. Im Falle einer Hypersekretion bestimmter Hormone dient die genaue hormonelle Analyse neben der spezifischen Diagnosesicherung der Etablierung von Tumormarkern. Falls eine Operation nötig ist, kann die hormonelle Analyse die Operationsstrategie beeinflussen. Biochemisch muss vor jedem invasiven Eingriff ein Phäochromozytom ausgeschlossen werden, da dieses ein spezielles perioperatives Vorgehen erfordert. Die Indikation für eine Feinnadelbiopsie ist nur selten gegeben, da die Gefahr der Verschleppung von Tumorzellen den Erkenntnisgewinn durch diese Untersuchung meist überwiegt [53]. Im Falle einer histologischen Aufarbeitung kann der Weiss Score zum Grading dienen. Dabei wird auf Kernatypien, atypische und zahlreiche Mitosen, Gefäß- und Kapselinvasionen sowie

breite, fibröse Bandstrukturen geachtet. Prognostisch relevant werden verschiedene Faktoren erst in Zusammenschau [54]. Um beispielsweise von einem hoch malignen NNR-Karzinom auszugehen, müssen mindestens drei der folgenden neun mikroskopischen Kriterien erfüllt sein: „nuclear grade“ III oder IV, Mitoserate  $> 5/50$  high power fields (HPF), typische Mitosefiguren, „clear cells“  $\leq 25\%$  der Tumorfläche betragend, diffuse Architektur, Nekrose, Einbruch in das venöse, das sinusoidale System oder in die Tumorkapsel, wobei die Mitoserate den signifikantesten Marker darstellt [55]. Immunhistochemische Analysen, beispielsweise die Bestimmung von Proliferationsmarkern, können ergänzende Informationen liefern [56].

#### 1.3.4. Therapiekonzepte und Prognose des NNR-Karzinoms

Aktuell stellt die offene radikale chirurgische Resektion die einzige kurative Behandlungsoption für das NNR-Karzinom dar. In den meisten Fällen kann eine langfristige Heilung allerdings auch nach radikaler Operation nicht erreicht werden, da bei Diagnosestellung oft zunächst unentdeckte Metastasen oder zumindest eine lokale Infiltration in Nachbargewebe existieren [57]. Bei bis zu 85% der Patienten kommt es trotz radikaler Tumorentfernung zum Rezidiv [5]. In der Behandlung von NNR-Karzinomen mangelt es aktuell an evidenzbasierten Erfahrungswerten mit klassischen Chemotherapeutika. Medikamentös kommt seit vielen Jahren das Zytostatikum Mitotane zum Einsatz, was adrenolytisch wirkt und Hormonexzesse gut kontrollieren kann. Ein vielversprechendes Therapieregime stellt das sogenannte Berruti-Schema (Kombination aus Mitotane, Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid) oder die Kombination aus Mitotane plus Streptozotocin dar. Ein weiterer, zunehmend untersuchter Therapieansatz ist die Anwendung antiangiogen wirksamer Substanzen, da Endothelwachstumsfaktoren wie VEGF und deren Rezeptoren im NNR-Karzinom eine starke Vaskularisierung vermitteln [47]. Je nach vorliegenden Gegebenheiten wie Tumorausbreitung und Patientenprofil werden derzeit Stoffe wie Gemcitabine, Capecitabine, Suramin, Gossypol oder die Kombination des monoklonalen Antikörpers Cixutumumab und des mTOR-Inhibitors Temsilotimus erprobt. Auch der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, die Inhibition des Hitze-Schock-Proteins HSP90 als zukünftig einsetzbare Therapeutika oder der steroidogenic factor 1 (SF-1) als Angriffspunkt dieser werden untersucht und in Betracht gezogen [47], [57]. Da unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Modelle mit relevanten klinischen Eigenschaften bislang fehlen, können zielgerichtete Therapiestrategien nur unzureichend experimentell evaluiert werden.

Auch hinsichtlich der Prognose mangelt es aktuell an großen, multivariaten Studien mit ausreichenden Fallzahlen. Maßgeblich für das Outcome sind eine möglichst frühe Diagnosestellung sowie eine komplette chirurgische Resektion [58]. Laut ENSAT sind die relevantesten Prognose-Parameter der Resektionsstatus und der Ki67-Index [57]. Dieser ist anderen histologischen Scores wie

dem von Weiss, von Hough (Beurteilung der vaskulären Infiltration und fibröser Fasern) oder von Van Slooten (Mitoserate  $> 2/10$  HPF, nukleäre Hyperchromasie und abnorm geformte Nucleoli) überlegen, welche derzeit klinisch zur Differenzierung benigne versus maligne eingesetzt werden. Der Ki67-Index wird in drei Stufen unterteilt:  $< 10\%$  bei Grad 1,  $10\text{--}19\%$  bei Grad 2 und  $\geq 20\%$  bei Grad 3 Tumoren. Viele der eingesetzten molekularen Techniken erfordern frisch gefrorenes Tumormaterial und wurden bislang nur in kleinen Patientenkohorten evaluiert [59].

Verschiedene klinische Parameter wie eine kurze Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs, das Vorhandensein von Metastasen, eine große Tumormasse oder die inkomplette Tumoresektion bedingen eine frustrierte Prognose. Im Kindesalter auftretende NNR-Karzinome haben eine günstigere Prognose [52]. Die mittlere Überlebenszeit beträgt nach Diagnosestellung drei bis vier Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate differiert zwischen ca.  $50\%$  nach R0-Resektion,  $19\%$  nach R1-Resektion (mikroskopischer Tumorrand) und etwa  $9\%$  nach R2-Resektion (makroskopischer Tumorrand) [60]. Bei metastasierten NNR-Karzinomen liegt sie bei nahezu  $0\%$  [47].

#### **1.4. Phäochromozytom**

Die erste Beschreibung eines Phäochromozytoms geht auf Fränkel zurück, der Ende des 19. Jahrhunderts seine klinische Beobachtung einer jungen Frau veröffentlichte, die wahrscheinlich an einer hypertensiven Krise verstarb. Die Autopsie der Patientin ließ den Befund eines beidseitigen Phäochromozytoms sowie eine diffuse Vergrößerung der Schilddrüse erkennen. Ein Jahrhundert später zeigten Neumann et al., dass diese Frau an einer hereditären Form litt und deren Nachkommen eine Mutation im Rezeptor-Tyrosinkinase-Protoonkogen aufwiesen [61].

Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene neuroendokrine, Katecholamin-produzierende Tumore (Adrenalin, Noradrenalin und Metanephrin; bei malignen Tumoren zusätzlich Dopamin), die sich von chromaffinem Gewebe ableiten [62]. Im Falle maligner Phäochromozytome kann chromaffines Gewebe dort detektiert werden, wo beim Gesunden keine chromaffinen Zellen vorzufinden sind, vor allem in Knochen, Leber, Lymphknoten und Lunge. Phäochromozytome und Paragangliome können in sympathische und parasympathische Tumore unterteilt werden, wobei Phäochromozytome in die erste Gruppe fallen. Diese Tumore sind oft benigne, auf Grund von Massenwirkung und zirkulierender Katecholamine jedoch oft mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert [63].  $85\%$  der Fälle sind als Phäochromozytome in der Nebenniere lokalisiert. Extra-adrenale Paragangliome können auch von den Nervenzellen des thorakalen und abdominalen Grenzstrangs ausgehen und produzieren in der Regel nur Noradrenalin. Die Katecholamin-Sekretion kann episodisch auftreten und Kopfschmerzen, vermehrtes Schwitzen, Palpitationen [64] und Hypertonie verursachen. Bei insuffizienter Detektion und Behandlung kann das Phäochromozytom

Arrhythmien, Herzinfarkte, Schlaganfälle sowie Angst [63] auslösen und zum Tode führen. Die Diagnose, genaue Lokalisation des Tumors und dessen Resektion sind insofern wichtig, als dass ein begleitender Hypertonus durch die chirurgische Intervention heilbar ist und mindestens 10% der Tumore maligne sind. Mindestens 30% der Fälle sind familiär bedingt, somit sollte bei allen Index-Patienten eine genetische Diagnostik angeboten werden [65]. Neueren Erkenntnissen nach sind Phäochromozytome und Paragangliome in Kombination bis zu 70% der Fälle auf Keimbahn- oder somatische Mutationen in Suszeptibilitätsgenen zurückzuführen [62]. Es liegt eine ausgeprägte genetische Heterogenität vor.

#### **1.4.1. Epidemiologie und Genetik des Phäochromozytoms**

Das Phäochromozytom hat eine Inzidenz von 0,2-0,8/100 000. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose ist etwa 24 Jahre im Falle einer hereditären Form und 43 Jahre bei sporadisch auftretender Erkrankung. Hereditäre Tumore sind meist bilateral oder multifokal lokalisiert. Oft tragen die jüngsten Patienten eine Von-Hippel-Lindau-Mutation (VHL-Mutation). Autopsie-Studien lassen erkennen, dass eine Reihe von Phäochromozytomen zu Lebzeiten unerkannt bleibt. Die Mehrzahl dieser Tumore ist gutartig mit einer 10-Jahres-Gesamt-Überlebensrate von ungefähr 96%. Allerdings entwickeln etwa 10% der Phäochromozytome (und bis zu 40% der Paragangliome) Rezidive oder Metastasen und führen dadurch zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 50% [62]. Das progressionsfreie Überleben wird, je nach Literaturangabe, zwischen 6-56 Monaten angegeben und weist auf eine hochgradige Heterogenität hinsichtlich der Prognose hin [66].

Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Phäochromozytoms haben Personen mit Keimbahnmutationen in einem von mindestens zehn Suszeptibilitätsgenen. Man geht heute davon aus, dass zusammengenommen etwa ein Drittel der betroffenen Patienten an einer hereditär bedingten, autosomal-dominant vererbten Form leidet [67], [62]. Ausnahme stellt der Erbgang bei Vorliegen einer SDHD- oder SDHAF2-Mutation dar, welche durch maternales Imprinting weitergegeben wird [62]. Zu den vererbten Syndromen zählen die MEN Typ 2, die Neurofibromatose Typ 1, das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) und hereditäre Paragangliom- und familiäre Phäochromozytom-Syndrome [61]. Zugrunde liegende Suszeptibilitätsgene für das Phäochromozytom sind RET, die Gruppe der SDHx-Gene (SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD), TMEM127 und MAX [68]. In den letzten Jahren sind weitere Mutationen der Keimbahn (neben NF1, RET, VHL, TMEM127, SDHx und MAX FH, FH41, MDH2 und MDH238) und somatische Mutationen (neben NF1, RET und VHL auch ATRX, HIF2A, HRAS und MET) entdeckt worden [68], [62]. Gene der Kinesin-Familie (1B (KIF1B), EGLN1 und EGLN2), welche die Propylhydroxylase-Domänen-Proteine kodieren (PHDs), wurden ebenfalls mit hereditären Formen des Phäochromozytoms in Verbindung

gebracht [62]. Im Falle der SDHB-Mutation treten eine ektope Lage, das Vorliegen von Malignität oder die Entwicklung eines Rezidivs besonders häufig auf [65]. Rezidive werden aber auch bei der TMEM127-Mutation beobachtet [61]. Suszeptibilitätsgene spielen demnach eine wichtige Rolle und werden zunehmend durch die Technik des sogenannten „Next Generation Sequencing“ bereichert.

#### **1.4.2. Diagnostik des Phäochromozytoms**

Die Diagnostik des Phäochromozytoms stellt eine Herausforderung dar, da nur wenige reliable klinische Parameter zur Verfügung stehen. Erschwerend kommt hinzu, dass Phäochromozytome sehr langsam wachsen und die Evidenz der Malignität oft erst Jahre nach einer erfolgreichen chirurgischen Intervention eines vermeintlich benignen Tumors deutlich wird [64]. Die Basisdiagnostik besteht aus der Quantifizierung der Katecholamin-Sekretion und bildgebenden Verfahren. Während in der Vergangenheit verschiedenste biochemische Tests zum Einsatz kamen, gilt heute die Messung der Katecholamin-Methylierungsprodukte Metanephrin und Normetanephrin als *first line* Test. Die eindeutige Erhöhung eines dieser Metaboliten ist mit einer nahezu hundertprozentigen Wahrscheinlichkeit mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom vergesellschaftet. Fraktionierte Metanephrine oder Katecholamine können im Plasma und/oder 24-Stunden-Urin gemessen werden. Der prädiktive Wert negativer Testergebnisse ist extrem hoch. Normale Plasmaspiegel schließen ein Phäochromozytom, außer im Falle von sehr frühen, präklinischen Krankheitsstadien oder von Patienten, die an ausschließlich Dopamin-sezernierenden Tumoren erkranken, nahezu aus. Bei grenzwertig erhöhten Plasma-Normetanephrinen kann der Clonidin-Suppressionstest zur Verifizierung von falsch-positiven Ergebnissen helfen [65].

Neben der Standard-Testung der Plasma-Metanephrine werden Phäochromozytome als neuroendokrine Tumore über die endokrine Tumormorphologie definiert. Zudem korreliert eine positive Immunhistochemie für Synaptophysin und ChrA gut mit Tumorgröße und Malignität [63]. Zur Differenzierung werden Keratin-Färbungen herangezogen, die beim Phäochromozytom negativ, bei Metastasen eines GEP-NET positiv ausfallen [66].

Patienten mit einem Tumor > 5cm oder einer SDHB-Mutation sollten schnittbildgebend untersucht werden, um Metastasen im Bereich des Thorax, Abdomens, Beckens oder im Knochen zu detektieren. Die häufigsten Lokalisationen der Metastasen sind: 80% in Lymphknoten, 71% in Knochen sowie 50% in Leber und Lunge [66]. Um die genaue Lokalisierung des Tumors zu ermitteln, wird ein CT oder MRT durchgeführt. Auch werden das FDG-PET, 18F-Fluorodopamin- oder 18F-Fluorodopa-PET sowie <sup>123</sup>I-MIBG-Szintigraphie als funktionelle Bildgebung eingesetzt.

Laut einiger Studien geben ein Tumordurchmesser von 4-5cm, eine erhöhte Gefäßdichte und die Expression von Vaskularisationsmarkern wie CD32 oder VEGF Hinweise auf Malignität. Der aktuell einzige reliable Prädiktor für Malignität ist allerdings das Vorliegen einer Keimbahnmutation im SDHB-Gen [63]. Ein sehr wichtiges Element der Diagnostik ist somit die Mutationsuche, da bis zu 30-50% der Patienten mit malignen Phäochromozytomen oder Paragangliomen eine SDHB-Mutation aufweisen. Besonders bei Diagnosestellung in jungem Alter sollte eine molekulargenetische Testung durchgeführt werden. Die Suche nach Keimbahnmutationen, aber auch die somatische genetische Testung können, je nach Mutation, als Vorlage einer molekularen zielgerichteten Therapie dienen [67].

Neuesten Erkenntnissen nach korrelieren auch hohe Plasmaspiegel von freiem Methoxytyramin (Metabolit von Dopamin) mit dem Auftreten von Metastasen, selbst wenn keine SDHB-Mutation vorliegt [63], [65]. Plasmaspiegel-Bestimmungen könnten für das Krankheitsmonitoring eine sinnvolle Ergänzung sein [63].

Die pathologische Differenzierung und der Proliferationsindex haben, im Gegensatz zu anderen Entitäten (z.B. thorakalen oder gastrointestinalen Tumoren), keinen prognostischen Wert und sollten somit keinen Einfluss auf Therapieentscheidungen nehmen. Multivariate Studien mit Blick auf die Tumorlast, den Genotyp und biochemischen Phänotyp sind dringend erforderlich, um die prognostischen und therapeutischen Möglichkeiten im Umgang mit Phäochromozytomen zu verbessern [66].

### **1.4.3. Therapiekonzepte und Prognose des Phäochromozytoms**

Fortschritte in genetischen und radiologischen Studien deuten darauf hin, dass im Vergleich zu anderen Tumoren nach wie vor nur unzureichende prognostische Indikatoren und Therapiemöglichkeiten für das Phäochromozytom existieren. Die Seltenheit, die komplexe Charakterisierung sowie die Heterogenität im Verhalten und der Prognose des Phäochromozytoms stellen eine große Herausforderung dar. Ausschlaggebend für die Therapieentscheidung sind der hormonelle Status, die Tumorlast und die radiographisch sichtbare Dynamik des Tumors [66].

Die chirurgische Intervention gilt für alle Patienten mit operablem Phäochromozytom als erste Therapieoption. Bei langsamer Progression und positiver Reaktion in der <sup>123</sup>I-MIBG-Szintigraphie wird in der Regel die Radiotherapie mit <sup>131</sup>I-MIBG empfohlen. Im Falle eines schnellen Wachstums kommt eher die Chemotherapie mit dem CVD-Schema (Cyclophosphamid, Vincristin, Dacarbazin) zum Einsatz. Allerdings führen bei den meisten Patienten weder die Radio-, noch die Chemotherapie zu einer Heilung. Nur etwa ein Drittel der behandelten Patienten spricht überhaupt auf die jeweilige

Therapie an. Neuere Ergebnisse lassen auf einen 70-80%-igen Erfolg des CVD-Schemas bei vorliegender SDHB-Mutation mit Metastasierung hoffen. Eine Alternative zum CVD-Schema könnte in Zukunft der Einsatz des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid sein, was insbesondere bei Trägern der SDHB-Mutation in ersten Studien Erfolge gezeigt hat. Auch eine antiangiogen wirkende Therapie mittels der Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib oder Axitinib wird derzeit in Studien diskutiert. Diese könnte zukünftig, speziell bei stark vaskularisierten Tumoren mit einer SDHx- oder VHL-Mutation als neue, vielversprechende Strategie eingesetzt werden [62], [66]. Epidrugs wie der DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabine und Inhibitoren der Histon-Methyltransferase könnten bei vorliegender SDHx- oder FH-Mutation zum Einsatz kommen [62]. Auch Therapieversuche mit Inhibitoren von mTOR 1, mTOR 2, Hypoxie-induzierendem Faktor (HIF), HSP90, Proteinkinase B (AKT) oder deren Kombination stellen neue Ansätze dar, müssen aber ebenfalls zunächst im Rahmen weiterer Studien überprüft werden. Es gibt also verschiedene palliative oder experimentelle Therapieoptionen. Bislang hat jedoch kein Wirkstoff ausreichende Effektivität bewiesen und die Behandlung des metastasierten Phäochromozytoms bleibt vorerst palliativ. Die Kombination verschiedener Präparate und die personalisierte Therapie unter Berücksichtigung des genetischen Subtypen stellen die aussichtsreichsten Therapieregime dar [65], [66].

Trotz einer nur 50%-igen 5-Jahres-Überlebensrate für das maligne Phäochromozytom lassen sich sehr unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Prognose insgesamt machen. Etwa 50% der Patienten weisen eine indolente Form der Tumorerkrankung mit einer Lebenserwartung von mehr als 20 Jahren auf. Die andere Hälfte leidet an einer schnell fortschreitenden Progression und stirbt innerhalb der ersten ein bis drei Jahre nach Diagnosestellung [65].

### **1.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

Die in dieser Arbeit behandelten Tumorentitäten weisen vor allem auf Grund ihrer meist späten Diagnosestellung sowie funktionellen Heterogenität zum Teil frustrane Therapieergebnisse auf. Es bedarf dringend der Etablierung eines Patienten-individuellen Tumormodells (PDX-Modells), um eine bessere Charakterisierung zu erreichen und neu entwickelte therapeutische Ansätze präklinisch zu testen.

Speziell unter Berücksichtigung der Heterogenität wählten wir für diese Arbeit folgenden Ansatz zur Etablierung und Charakterisierung eines PDX-Modells:

- 1.) Humane Tumorproben von GEP-NET, NNR-Karzinomen sowie Phäochromozytomen sollten als intakte Tumorstücke in immundefizienten Nacktmäusen subkutan implantiert werden und nach einer mehrwöchigen Anwachszeit im Tier reseziert und histologisch aufbereitet werden.

2.) Mittels histologischer und immunhistochemischer Analysen sollten a) die Vitalität mittels HE und die Zellproliferation mittels Ki67, b) Tumor-spezifische Marker (ChrA für GEP-NET und Phäochromozytome, SF-1 für NNR-Karzinome) sowie durch die Beurteilung der Bilder in Zusammenschau c) die endokrine Aktivität untersucht werden. Dabei sollten Originaltumor und Xenotransplantat nach 12 Wochen vergleichend beurteilt werden.

Mittels Kryokonservieren der Paare von Patiententumor und Maustumor und Zuführung in die Tumorbank des Instituts können weitergehende Analysen in Zukunft durchgeführt werden. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollten langfristig dazu beitragen, dass schon kurz nach der Operation des Patienten die für ihn jeweils effizienteste Therapie mit möglichst geringem Nebenwirkungsprofil bestimmt werden könnte.

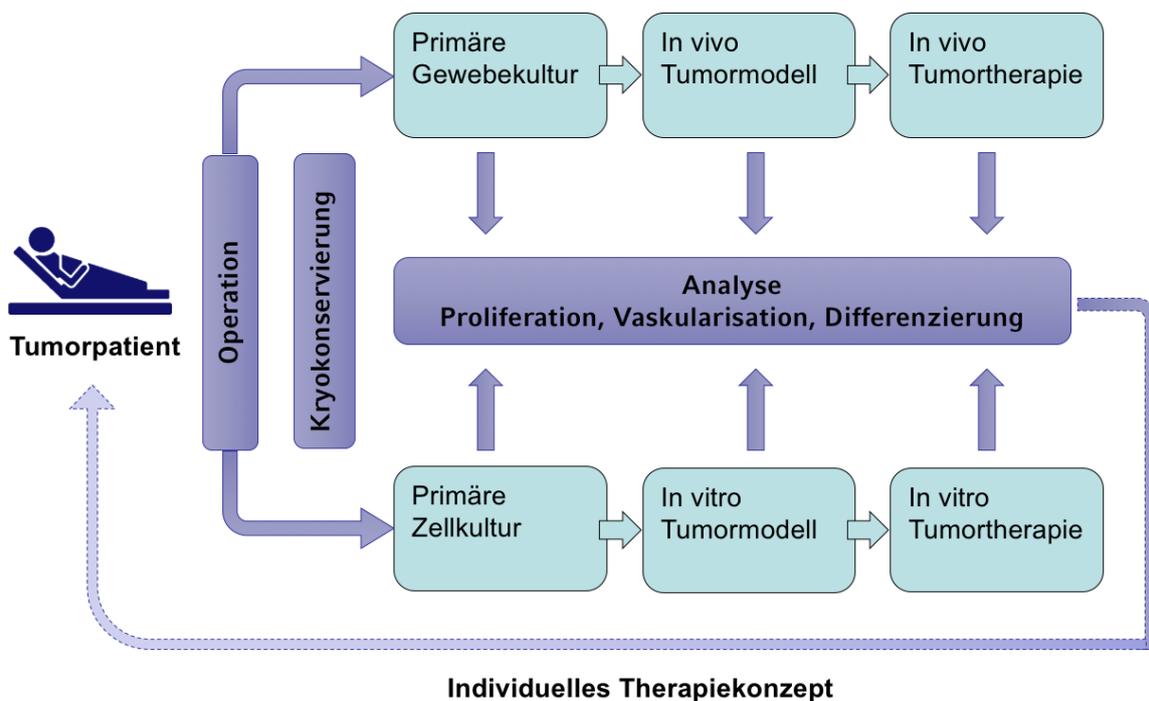


Abbildung 1: Schematischer Workflow eines PDX-Modells (Abb. nach C. Hantel)

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Auflistung der verwendeten Materialien und Substanzen

Geräte/Material	Produktbezeichnung	Firma
Deckgläser	Menzel-Glas	Menzel GmbH, Braunschweig
Fettstift	Liquid Blocker Super PAP-Pen	G. Kisker, Steinfurt
Gewebeeinbettautomat	STP 120 Spin	Microm, Walldorf
Gewebekulturflaschen	Falcons	Becton-Dickinson, NJ, USA
Histologie-Kassetten	Simport	Bernard-Pilon, Belœil QC, Canada
Kamera	Living Image Software 2.5	Xenogen, Alameda, CA, USA
Mikroskop	Leica DMRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle		LG, Ratingen
Objektträger	SuperFrost-Plus	R. Langenbrinck, Teningen
Ofen	Function Line	Heraeus, Hanau
Paraffinstreckbad	EC 350	Microm, Walldorf
Pipetten	Pipetten Eppendorf Reference® Physio Care	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Pipetman®	Gilson, Middleton, WI, USA
	Accu Jet	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
Rotationsmikrotom	HM 355 E	Microm, Walldorf
Schüttelplatte	Mini-Rocker L024	G. Kisker, Steinfurt
Skalpell	Feather® Mikrotomklinge C35	PFM, Köln
Vortexer	Vortex-Genie® 1	Scientific Industries,

		Springfield, USA
Wasserbad	SB 80	Microm, Walldorf

**Tabelle 3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte**

Reagenzien	Produktbezeichnung	Firma
Bovines Serum Albumin	Fraction V	Roche, Mannheim
DAB (3,3' Diaminobenzidin)		Sigma-Aldrich, Steinheim
Destilliertes Wasser		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Domitor (=Medetomidin)		Pfizer, Berlin
Eosin-Y-Lösung	#HT110-2-32	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol		Med. Klinik Innenstadt, München
Hämatoxylin	Sigma Harris Hematoxylin #HHS-32	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran-Forene®		Abbott GmbH, Wiesbaden
Ketanest (=Ketamin)		Pfizer, Berlin
Methanol		Merck, Darmstadt
Methylgrün	Methyl green H3402	Vector Laboratories, CA, USA
Mounting Medium		Microm, Walldorf
Novalgine		Hoechst, Frankfurt am Main
Natriumcitrat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin		Merck, Darmstadt
PBS Tabletten	Gibco® PBS Tablet	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tween 20		Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectastain® Elite ABC-Kit		Vector Laboratories, CA, USA
Wasserstoffperoxid		Merck, Darmstadt
Xylol		Merck, Darmstadt
Ziegen-Serum		Jackson Immuno Research Lab, CA, USA
Zitronensäure		Roth, Karlsruhe

**Tabelle 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien**

Reagenzien/Lösungen	Bestandteile	Mengenangabe
Blocking Puffer	Blocking Solution	95µl
	Ziegen-Serum	50µl
Blocking Solution	Bovines Serum Albumin	3g
	Tween 20	500µl
	PBS/ad	100ml
10mM Citratpuffer pH 6,0	Stammlösung A	9ml 0,1M Zitronensäure (=21g/1000ml ad)
	Stammlösung B	41ml 0,1M Natriumcitrat (=29g/1000ml ad)
	Aqua dest.	450ml
DAB	Aqua dest.	1000µl
	Pufferlösung: 3,3'-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid;	Set bestehend aus 2 Tabletten

	Urea-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Methanol	Wasserstoffperoxid 30%	500µl
	Methanol	50ml
PBS	NaCl	8g
	KCl	0,2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,44g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
	Aqua dest.	1000ml
4% PFA	Paraformaldehyd	4g
	Aqua dest.	20ml
	NaOH	tropfenweise
	PBS	bis auf 100ml aufgefüllt
	HCl	1N

**Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien**

Antikörper	Firma
Biotinylated polyclonal anti-mouse IgG	Santa Cruz, CA, USA; Bestellnummer sc-2039, RRID: AB_631734
ChrA: monoclonal mouse anti-human (Klon LK2H10 + PHE5)	Lab Vision Corporation, CA, USA; Bestellnummer MS-382-P, RRID: AB_61202
Cy2 Streptavidin: polyclonal anti-rabbit	Jackson Immuno Research Lab, CA, USA / Dianova, Hamburg; Bestellnummer 016-220-084, RRID: AB_2337246
Ki67: monoclonal rabbit anti-human & anti- mouse (Klon SP6)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg; Bestellnummer KI681C01, RRID: AB_2722785

SF-1: polyclonal rabbit anti-human	Novus Biologicals, Littleton, USA / Acris, Herford; Bestellnummer NLS5377, RRID: AB_2267370
------------------------------------	--

**Tabelle 6: Alphabetische Auflistung der verwendeten Antikörper**

## 2.2. Tumormaterial

Für diese Arbeit wurde mit drei Tumorentitäten gearbeitet. Es wurde das Gewebe von sieben neuroendokrinen Tumoren, bestehend aus vier GEP-NET inklusive zwei Insulinomen sowie drei Metastasen, einer Magenmetastase und zwei Lebermetastasen von GEP-NET aufgearbeitet. Die Untersuchungen erfolgten nach schriftlicher Aufklärung und Einwilligung der Patienten im Rahmen des ENSAT- und NeoExNET-Registers. Beide Protokolle wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU genehmigt. Die Ergebnisse eines Ileumkarzinoids wurden in dieser Arbeit nicht aufgeführt, da kein ursprüngliches Patientenmaterial für die histologische Aufarbeitung und den nachfolgenden Vergleich zwischen Ausgangsgewebe und Vergleichsgewebe nach Implantation in der Maus zur Verfügung stand. Ein malignes Karzinoid konnte ebenfalls nicht in diese Arbeit integriert werden, da die in zwei Mäuse implantierten Tumorstücke jeweils nicht anwuchsen. Aus der zweiten Entitätengruppe wurden zwei NNR-Karzinome, ein NNR-Karzinom im Rahmen eines MEN Typ 1 sowie eine Lebermetastase eines NNR-Karzinoms ausgewertet. Im Falle der Lebermetastase wuchs von drei implantierten Tumorstücken in zwei Mäusen nur eines an. Die dritte untersuchte Tumorart beinhaltete zwei Phäochromozytome, ein Phäochromozytom im Rahmen eines MEN Typ 2 und eine Metastase eines malignen Phäochromozytoms. Bei zwei der vier Tumoren wurden Tumorstücke in zwei Mäuse implantiert, das Gewebe ist jeweils aber nur in einer Maus angewachsen. Von der Metastase wurden zwei Stücke implantiert. Eines dieser beiden Stücke konnte nach 12 Wochen Implantation in der immundefizienten Maus nicht sicher als Tumor identifiziert werden, weshalb es nicht in die Auswertung einging. Ein weiteres Phäochromozytom mit Implantation in einer Maus wurde auf Grund der geringen Größe und brüchigen Struktur des Ausgangstumors ebenfalls nicht ausgewertet.

Tumorentität	Anzahl der OP-Präparate	Transplantationsorte
GEP-NET:		
Primarius	4	2x Flanke, 3x Nacken
Metastase	3	3x Flanke, 5x Nacken
NNR-Karzinome:		
Primarius	3	7x Nacken
Metastase	1	1x Flanke
Phäochromozytom:		
Primarius	3	1x Flanke, 3x Nacken
Metastase	1	1x Nacken

**Tabelle 7: Auflistung der bearbeiteten Tumorentitäten mit jeweiliger Anzahl der OP-Präparate und Implantationsort**

Patient Geschlecht	Tumorentität	Pathologische Charakterisierung (nach Originalbefund)	Alter des Pat. in Jahren	Weitere Angaben zu den Präparaten (Größe, Resektat)
Patient 1, ♀	GEP-NET Nachresektat des Primarius: Ileum	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom (Ki67-Index < 2%)	66	nicht näher beschrieben (nicht orientierbares Dünndarmsegment; 10,5cm lang, 2,4cm Ø)
Patient 1, ♀	GEP-NET Lebermetastase (Primarius: Ileum)	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom	66	2.7x2.2x1.8cm Multiple, bis zu 0,7cm messende Tumorherde mit ballenartig gelagerten Tumorzellen
Patient 2, ♀	GEP-NET Primarius: Magen (DD Appendix)	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom	40	nicht näher beschrieben (voreröffnetes

				Magenteilresektat: 14x7cm) (Appendix: 6x0,6cm) Infiltration am Schnitttrand: 1,3cm
Patient 2, ♀	GEP-NET Magenmetastase (Primarius: Magen DD Appendix)	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom	40	nicht näher beschrieben DD Primarius: partielles Gastrektomiepräparat: ca. 1,3cm große mukosale Infiltration des vorherbeschriebenen neuroendokrinen Carcinoms
Patient 2, ♀	GEP-NET Lebermetastase (Primarius: Magen DD Appendix)	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom	40	Leberteileresektat: 13x10x6cm; Absetzungsfläche: 14x9cm; Weißliche, unscharf begrenzte Knoten im Leberparenchym: 1: 3cm 2:3,8cm Knötchen3: 2mm
Patient 3, ♀	GEP-NET (Insulinom)	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom; (Ki67-Index < 2%)	59	max.1,2x1x0,8cm
Patient 4, ♀	GEP-NET (Insulinom)	Keine eindeutige Charakterisierung; (Mitoserate 0/10HPF; Ki67-Index < 5%)	68	2x1,5x1cm

Patient 5, ♂	Metastasierendes NNR-Karzinom bei MEN Typ 1 Primarius	Heterogene proliferative Aktivität < 30%, > 30%	56	7cm Ø
Patient 6, ♂	NNR-Karzinom Lebermetastase	ChrA negativ	82	Knoten1: 5x3x2,5cm Knoten2: 3,5x3x3cm
Patient 7, ♀	Endokrin aktives NNR-Karzinom Primarius	Ki67-Index (1-2%), in pleomorphzelligen Abschnitten > 10% ChrA negativ pT2, pn1 (8/9), pM0, L1, V1, pn0, R0 UICC-Stadium III	55	7,1x5x4,8cm (laborchemisch Cortisol, Androgene; Testosteron- Produktion)
Patient 8, ♀	NNR-Karzinom Primarius	ChrA negativ	78	7,5x4,5x4cm (laborchemisch Testosteron- Produktion)
Patient 9, ♂	Phäochromozytom Primarius	keine Angaben	64	5,3cm Ø
Patient 10, ♂	Phäochromozytom Primarius	ChrA positiv	39	1,8cm Ø
Patient 11, ♂	Phäochromozytom bei MEN Typ 2	vereinzelt Ki67- positive Färbung	64	2,4x1,7x1,2cm
Patient 12, ♂	Phäochromozytom Knochenmetastase	keine Angaben	46	nicht näher bezeichnete Weichgewebstücke: 3,6x1,6cm

**Tabelle 8: Angaben zu den Patienten und zugehörige Tumorgrößen nach Entität und in chronologischer Aufarbeitung; Größenangaben, immunhistochemische Charakterisierung (Ki67, ChrA) aus den jeweiligen Pathologie-Befunden**

### **2.3. Versuchstiere**

Für das vorliegende Projekt wurde mit weiblichen, athymischen, immundefizienten Nacktmäusen vom Mausstamm NMRI nu/nu (Harlan Winkelmann Germany, Borcheln) gearbeitet. Die ausschließlich für Forschungszwecke gezüchteten Tiere wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung der Kliniken Innenstadt durch Frau C. Hantel betreut. Pro Käfig wurden maximal fünf immundefiziente Nacktmäuse (IVC-Maus-Käfige Typ II long) gehalten, welche *ad libitum* mit Wasser und Standard-Maus-Futter versorgt wurden. Im Tierstall wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten. Die Genehmigung für den Tierversuch im Rahmen dieses Projektes wurde von der Regierungsbehörde Oberbayern erteilt.

### **2.4. Tiermodell und Implantationstechnik**

In Anlehnung an die im Vorfeld von Frau C. Hantel etablierten Tumormodelle wurden für die Implantationen ganzer Tumorstücke anfangs der Nackenbereich sowie die Flanke, später ausschließlich der Nacken als Implantationsort gewählt. Da es sich um ein heterologes Xenograft-Tumormodell handelte, wurde zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion mit immundefizienten Nacktmäusen gearbeitet. Die Implantation, das regelmäßige Beobachten der Tumore in den Mäusen sowie die Explantation erfolgten durch Frau C. Hantel. Für die im Rahmen dieser Arbeit aufbereiteten Tumore wurden ausschließlich ganze Tumorstücke mit einer Größe zwischen 2x2x2mm und 5x5x5mm implantiert. Diese wuchsen an und verblieben für durchschnittlich 12 Wochen in der Maus. Die Mäuse wurden engmaschig kontrolliert, zweimal pro Tag auf Auffälligkeiten im Verhalten untersucht und deren Tumorgöße regelmäßig mittels eines Calipers gemessen. Wenn nötig, wurden die Tiere vor Versuchsende euthanasiert. Als Abbruchkriterien des Versuchs galten Exulzeration und/oder Überschreiten einer Größe von 1,5cm des Tumors, Gewichtsverlust von über 30%, Fellveränderungen sowie andere optisch erfassbare Körperbeeinträchtigungen. Nach längstens 12 Wochen Nidation wurde das Tumorgewebe explantiert, histologisch und immunhistochemisch aufbereitet und analysiert.

### **2.5. Histologische Aufarbeitung**

Alle Schnitte und Färbungen wurden an Hand von etablierten Standard-Protokollen, die für Paraffin-Einbettung geeignet sind, in unserem Labor durchgeführt.

#### **2.5.1. Anfertigung der Schnitte**

Nach Gewinnung des Tumorgewebes wurde dieses je drei Stunden in Paraformaldehyd (PFA), Ethanol (EtOH) in 30%-iger, 50%-iger und über Nacht in 70%-iger Konzentration gewaschen. Nachdem das Tumormaterial im Anschluss 21 Stunden im Gewebereinbettungsautomat (STP 120 Spin;

Microm, Walldorf) erneut in einer Alkoholreihe gereinigt, entwässert und im Anschluss in Paraffin eingebettet wurde, wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm, Walldorf) 5µm dünne Schnitte angefertigt. Um potenziell beim Schneiden entstandene Falten zu entfernen, wurden die Schnitte mit einem feinen Pinsel in ein Wasserbad (Köttermann, Hänigsen) mit einer Temperatur von 41°C überführt. Von dort wurden sie auf Objektträger (Super Frost Plus, Teningen) aufgezogen. Über Nacht trockneten die Schnitte im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, so dass sie am nächsten Tag für die histologischen Färbungen bereitstanden.

### **2.5.2. Haematoxylin-Eosin-Färbung**

Die Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE) dient einem generellen Überblick der Gewebsbeschaffenheit und ist die am häufigsten eingesetzte Routinefärbemethode in histopathologischen Untersuchungen [69]. Mit dieser Standard-Färbung wird die Vitalität des untersuchten Materials gezeigt und zwischen benignen und malignen Zellen unterschieden. Haematoxylin kommt als natürlicher Bestandteil in Blauhölzern und verwandten Arten vor und wird durch Extraktion aus den Kernhölzern gewonnen oder heutzutage synthetisch hergestellt. In Reinform ist Haematoxylin farblos bis leicht beige. Unter Anwendung eines Oxidationsmittels wird in alkoholischer oder wässriger Lösung aus Haematoxylin das ockerbraune Haematein. Haematein bildet unter Zugabe mehrwertiger Kationen Komplexe, die für die typische blau-violette Färbung verantwortlich zeichnen. Durch das Haematoxylin blau-violett hervorgehoben werden basophile Strukturen wie Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin wird synthetisch hergestellt und färbt im Falle von Eosin Y azidophile Zellbestandteile wie das Zytoplasma, Proteine wie auch Mitochondrien rötlich.

Die genauen Zeiten und Reihenfolge der Färbeschritte werden in Tabelle 9 aufgeführt. Zusammengefasst, wurden die Schnitte zur Vorbereitung in Xylol, in absteigende Alkoholkonzentrationen (EtOH 100%, 95%) und in destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) getaucht. Nach der Anfärbung mit Haematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und einem erneuten Schritt in destilliertem Wasser wurden die Schnitte unter fließendes Leitungswasser gehalten, wodurch der pH-Wert erhöht und dadurch ein Farbumschlag von rötlich-braun zu blau-violett erzielt wurde. Als Gegenfärbung des Zytoplasmas wurden die Schnitte in Eosin Y (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) eingebracht. Zuletzt wurde dem Gewebe mittels Alkohollösungen mit aufsteigender Konzentration (EtOH 95%, 100%) das eingesetzte Wasser entzogen. Die entwässerten Schnittpräparate wurden in Xylol feucht gehalten, bis sie mit dem Eindeckmittel Permount (Microm, Walldorf) zur verlängerten Haltbarkeit sowie einem Deckglas (Menzel-Glas 24x50mm, Braunschweig) beschichtet wurden.

Schritt	Zeiteinheit	Reagenzien/Substrate
1	2x3min	Xylene
2	2x3min	Ethanol 100%
3	2x3min	Ethanol 95%
4	2-3min	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
5	3-5sec	Haematoxylin
6	1-2sec	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
7	1min	sanft fließendes Leitungswasser
8	10sec	Eosin
9	2x30sec	Ethanol 95%
10	2x30sec	Ethanol 100%
11	2x30sec	Xylene
12		Permount

**Tabelle 9: Färbe-Protokoll für HE**

### 2.5.3. Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistologie bzw. Immunhistochemie (IHC) wird herangezogen, um spezielle Zellbestandteile wie Proteine zu detektieren. Mittels dieser Färbetechnik können spezifische Antigene, beispielsweise Tumor-Antigene, im Gewebe dargestellt werden. Es werden markierte Antikörper verwendet, die speziell an das darzustellende Antigen binden. In Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte bedürfen einer speziellen Vorbehandlung, da die Immunreaktivität im Gewebe durch eine Quervernetzung verloren gehen kann. Im vorliegenden Fall kam als Antigen-Demaskierung Citratpuffer zum Einsatz, der interferierende Calcium-Ionen bindet. Um unspezifische Anfärbung der Schnitte durch endogene, im Gewebe vorkommende Peroxidase zu vermeiden, wurden die Schnitte mit 0,3%-igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Methanol behandelt. Zudem wurden die Gewebeproben mit einer „Blocking Solution“ (aus 3% (m/v) bovinem Serum-Albumin (BSA) und 0,5% (v/v) Tween bestehend), versetzt mit 5%-igem Ziegen Serum (Jackson ImmunoResearch Lab Inc.) zur Blockierung unspezifischer Protein-Bindungsstellen behandelt.

Bei der angewandten indirekten Methode mittels ABC-Technik (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex; Vectastain® Elite ABC-Kit von Vector Laboratories, CA, USA) wurde nach Zugabe eines spezifischen Primärantikörpers ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen, welcher sich gegen den ersten

Antikörper richtete. Im Anschluss daran wurden die Objektträger in einem Avidin-Biotin-Enzymkonjugat inkubiert. Zuletzt wurde ein zunächst farbloses Substrat, das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) des jeweiligen Enzyms aufgetragen, das durch die Kopplung an das Enzym für einen Farbumschlag sorgte. Es wurden Protonen frei und oxidierten das vorher farblose Chromogen unter Bildung von Wasser zu einem farbigen Endprodukt. Mit einem Fettstift (PAP-Pen, Kisker, Steinfurt) gezogene Kreise um das untersuchte Gewebe und zwischenzeitlich aufgebrachte Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) dienten dazu, potenziellem Austrocknen des Tumorgewebes vorzubeugen. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung wurden die Schnitte zuletzt mit einem Kunstharz (Microm, Walldorf) bedeckt, um die Haltbarkeit der Schnitte zu verlängern.

Für das jeweilige Untersuchungsmerkmal wurden die Gewebsschnitte, analog zur HE-Färbung zur Entparaffinierung in Xylol eingebracht (für die genauen Zeitangaben siehe nachfolgende Tabellen; Tabelle 10 für Ki67, Tabelle 11 für ChrA und Tabelle 12 für SF-1). Danach wurde in absteigender Alkoholkonzentration (EtOH 100%, 95%) Schritt für Schritt Wasser zugefügt. Währenddessen wurde Citratpuffer in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach kurzem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte in den zuvor aufgekochten Citratpuffer (pH-Wert von 6,0) getaucht und in diesem in die Mikrowelle (75Watt) gegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Objektträger in ein Gemisch aus 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol gehalten. Zweimalig in PBS gewaschen und mit einer Proteinblocklösung (Blocking Puffer) vorbehandelt, um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde der erste Antikörper (DCS Innovative Diagnostik Systeme, RRID: AB\_2722785 für Ki67; Lab Vision Corporation, RRID: AB\_61202 für ChrA und Novus Biologicals/Acris, RRID: AB\_2267370 für SF-1), im Verhältnis 1:200 in Blocking Puffer verdünnt, auf das Gewebe aufgetragen und über Nacht in einer dunklen feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Negativkontrollen verblieben währenddessen in Blocking Puffer.

Am zweiten Tag erfolgte zunächst dreimaliges Waschen in PBS und im Anschluss die Inkubation des zweiten Antikörpers (Cy2 Streptavidin, Jackson Immuno Research Lab/Dianova, RRID: AB\_2337246 für Ki67 und SF-1; Santa Cruz, RRID: AB\_631734 für ChrA), ebenfalls im Verhältnis 1:200 in Blocking Puffer verdünnt. Die Negativkontrollen blieben währenddessen mit Blocking Puffer bedeckt. Zeitgleich wurde der ABC-Komplex vorbereitet. Danach wurden die Schnitte wieder in PBS gewaschen, um sie dann mit ABC-Komplex zu behandeln. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit DAB behandelt, welches ein braunes Endprodukt bildet. Nach einem letzten Waschen in PBS wurde für die Berechnung des Ki67-Index das Gewebe mit Methylgrün bedeckt und die Schnitte in einen Ofen mit 60°C gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in ddH<sub>2</sub>O gehalten, bis keine Farbe mehr abgewaschen wurde. Für die Färbungen mit ChrA und SF-1

entfielen die Anwendung von Methylgrün, die Inkubation im Ofen und das anschließende Waschen in ddH<sub>2</sub>O, da für die jeweilige Quantifizierung ausreichende Kontraste vorlagen.

Zuletzt erfolgte zur Dehydrierung ein Eintauchen in aufsteigender Alkoholkonzentration (EtOH 95%, 100%) und schließlich in Xylol, bis alle Objektträger mit Mounting Medium (Microm, Walldorf) und 24x50mm großen Deckgläsern (Menzel GmbH, Braunschweig) eingedeckt wurden.

Schritt	Zeiteinheit	Reagenzien/Substrate
1	2x5min	Xylene
2	2x10min	Ethanol 100%
3	2x10min	Ethanol 95%
4	1min	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
5	15min	zuvor aufgekochter Citratpuffer
6	1h	auf Raumtemperatur abkühlen
7	10min	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol
8	2x5min	PBS
9	15min	Blocking Puffer
10	über Nacht	1.AK; Negativkontrolle in Blocking Puffer
11	3x5min	PBS
12	30min	2.AK
13	3x5min	PBS
14	30min	zuvor hergerichtetes ABC-Kit
15	3x5min	PBS
16	5min	DAB
17	2x5min	PBS
18	8min	Methylgrün bei 60°C im Ofen
19	2-3sec	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
20	2x1min	Ethanol 95%
21	2x1min	Ethanol 100%
22	2x5min	Xylene
23		Permunt

Tabelle 10: Färbe-Protokoll für Ki67

Schritt	Zeiteinheit	Reagenzien/Substrate
1	2x5min	Xylene
2	2x10min	Ethanol 100%
3	2x10min	Ethanol 95%
4	1min	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
5	15min	zuvor aufgekochter Citratpuffer
6	1h	auf Raumtemperatur abkühlen
7	10min	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol
8	2x5min	PBS
9	15min	Blocking Puffer
10	über Nacht	1.AK; Negativkontrolle in Blocking Puffer
11	3x5min	PBS
12	30min	2.AK
13	3x5min	PBS
14	30min	zuvor hergerichtetes ABC-Kit
15	3x5min	PBS
16	3min	DAB
17	2x5min	PBS
18	2x1min	Ethanol 95%
19	2x1min	Ethanol 100%
20	2x5min	Xylene
21		Permount

Tabelle 11: Färbe-Protokoll für ChrA

Schritt	Zeiteinheit	Reagenzien/Substrate
1	2x5min	Xylene

2	2x10min	Ethanol 100%
3	2x10min	Ethanol 95%
4	1min	MilliQ ddH <sub>2</sub> O
5	15min	zuvor aufgekochter Citratpuffer
6	1h	auf Raumtemperatur abkühlen
7	10min	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol
8	2x5min	PBS
9	15min	Blocking Puffer
10	über Nacht	1.AK; Negativkontrolle in Blocking Puffer
11	3x5min	PBS
12	30min	2.AK
13	3x5min	PBS
14	30min	zuvor hergerichtetes ABC-Kit
15	3x5min	PBS
16	5min	DAB
17	2x5min	PBS
18	2x1min	Ethanol 95%
19	2x1min	Ethanol 100%
20	2x5min	Xylene
21		Permunt

**Tabelle 12: Färbe-Protokoll für SF-1**

## 2.6. Quantifizierung

Für die Quantifizierung wurde mit ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) gearbeitet. Pro Schnitt wurden in 6 verschiedenen Arealen je 6 HPF, demnach insgesamt 36 Felder untersucht und ausgewertet. Dies wurde jeweils im Primärtumor und im gleichen Tumor nach 12 Wochen Nidation in der immundefizienten Nacktmaus untersucht. Für Ki67 und SF-1 wurden Kerne gezählt, wofür eine Vergrößerung mit 40x Objektiv genutzt wurde. Da in der CHrA-IHC größere Bereiche wie nestförmige Areale beurteilt wurden, kam hierfür ein 20x Objektiv zum Einsatz.

Um den Proliferationsindex zu bestimmen, wurde die Anzahl der Ki67-positiven Kerne ausgezählt und in Relation zur jeweiligen Gesamtzellzahl gesetzt. Nur die deutlich angefärbten Kerne wurden als Ki67-positiv betrachtet.

$$\text{Ki67-Index} = \text{Ki67-positive Kerne} / \text{Gesamtzahl der Kerne}$$

Um die ChrA-Expression zu quantifizieren wurde die Fläche von angefärbten Arealen beurteilt. Die untersuchten Areale wiesen unterschiedliche, semiquantitative Farbintensitäten auf, welche in Werte von 0 bis 3 eingestuft wurden. In der ChrA-IHC zeigten die Negativkontrollen ein Hintergrundsignal. Deshalb wurde das Gewebe in ChrA-positive und ChrA-negative Bereiche eingeteilt. Die ermittelten Daten wurden zur Bildung eines Färbungsindex in folgende Formel eingefügt und in *arbitrary units* (AU) angegeben:

$$\text{ChrA Index} = \% \text{ des ChrA-positiven Areals} \times \text{Färbeintensität des ChrA-positiven Areals [0-3]} + \% \text{ des ChrA-negativen Areals} \times \text{Färbeintensität des ChrA-negativen Areals [0-3]}$$

Für die Beurteilung von SF-1 wurde die Anzahl der gefärbten Kerne als theoretische Werte angegeben. Deutlich braun gefärbte Zellen wurden als SF-1-positive Zellen gezählt.

## **2.7. Statistik**

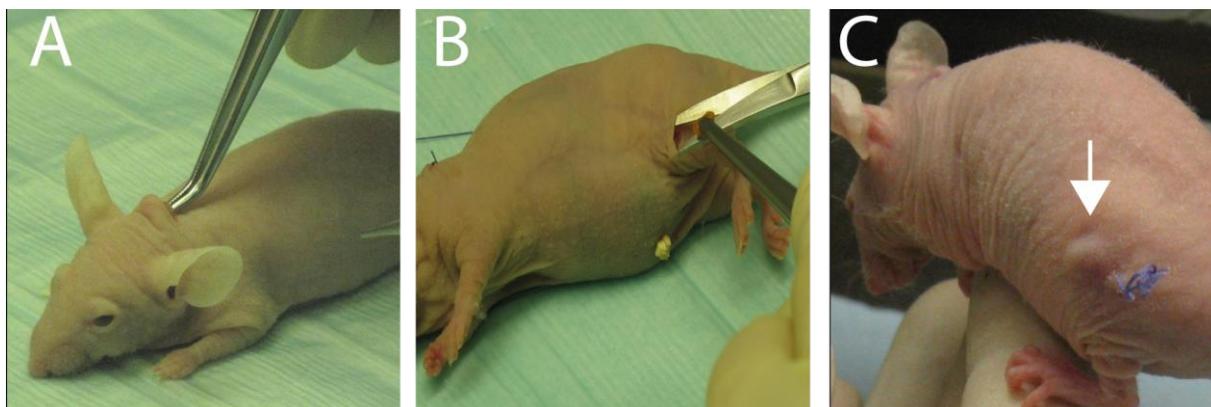
Die quantifizierten Daten wurden in Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) gespeichert sowie mittels SPSS (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) statistisch ausgewertet. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Als statistischer Test wurde der ungepaarte t-Test eingesetzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem Signifikanzwert von  $p < 0.05$  angesehen.

### 3. Ergebnisse

Wie in der Zielsetzung beschrieben (siehe Abschnitt 1.5.) wurde im Rahmen dieser Arbeit humanes Tumorgewebe vergleichend zu entsprechendem Tumorgewebe nach 12-wöchiger Nidation im Subkutangewebe von Mäusen histologisch aufbereitet und mittels verschiedener Antikörper auf Proliferationsverhalten und endokrine Aktivität untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Teilschritte und verschiedenen Tumorentitäten (GEP-NET, NNR-Karzinom, Phäochromozytom) dargestellt:

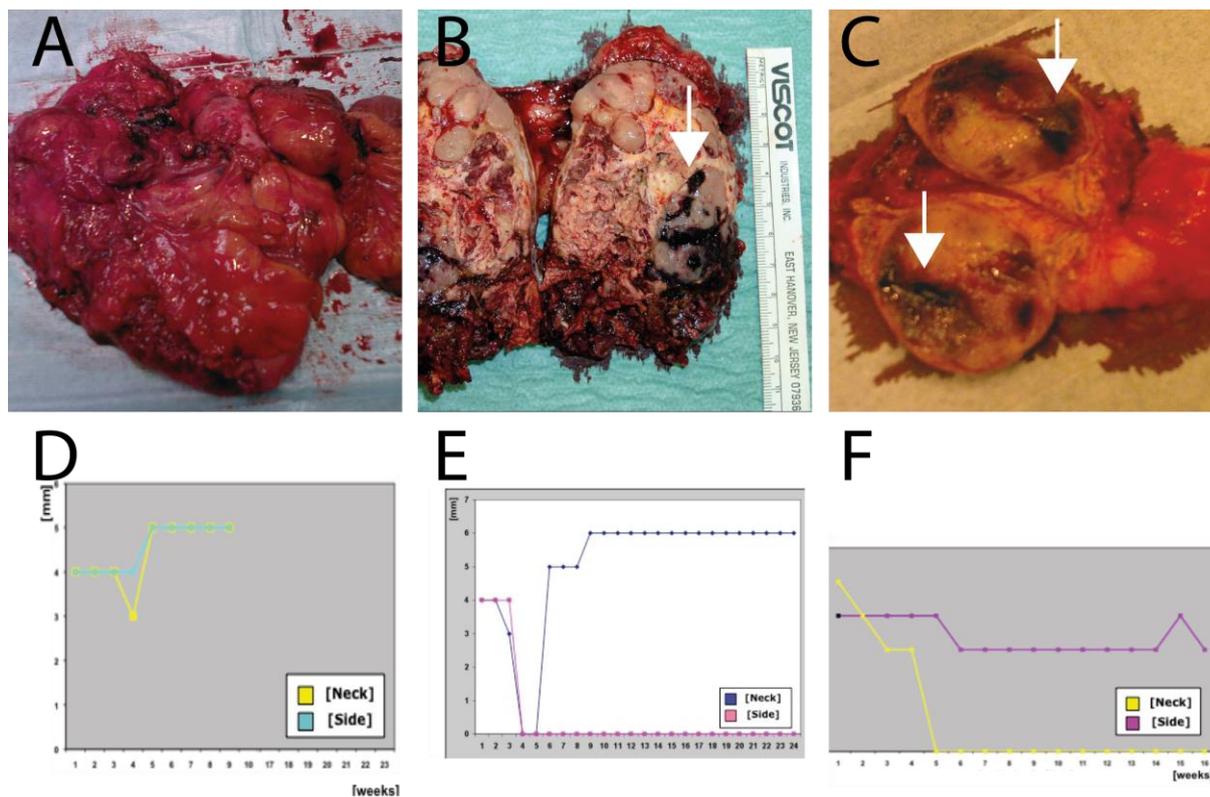
#### 3.1. Modell zur Implantation ganzer Tumorstücke

Implantation und Verlaufskontrollen wurden von Frau C. Hantel durchgeführt (Details siehe 2.4.). Im Gegensatz zur gut etablierten Implantation von Tumorzellen musste für die Implantation ganzer Tumorstücke eine geeignete Technik und Lokalisation gefunden werden. Anfänglich wurden die Tumorstücke in den Nacken- und Flankenbereich eingesetzt. Bei deutlich einfacherem chirurgischem Zugangsweg sowie besserer makroskopischer Messbarkeit der Tumorgöße wurde im Verlauf als Implantationsort ausschließlich eine im Nackenbereich präparierte Tasche gewählt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: 8-10 Wochen alte immundefiziente Nacktmäuse; A: Präparation des s.c. Implantationsortes nuchal; B: s.c. Gewebsimplantation des humanen Tumors an der Flanke; C: exemplarisches Bild eines angewachsenen Tumors (Pfeil); Quellen: A. Ozimek, C. Hantel**

Die subkutane Tumorgöße wurde jeden zweiten Tag mittels Caliper vermessen. Sowohl GEP-NET sowie NNR-Karzinome zeigten nach einer initialen Größenreduktion eine Rückkehr auf die Ausgangsgröße ohne weiteres Wachstumspotenzial (siehe Abbildung 3). Nach durchschnittlich 12 Wochen wurde das Tumorgewebe aus der Maus entnommen. Die Mehrzahl der Tumore zeigte sich in der immundefizienten Nacktmaus angewachsen (siehe Tabelle 13).



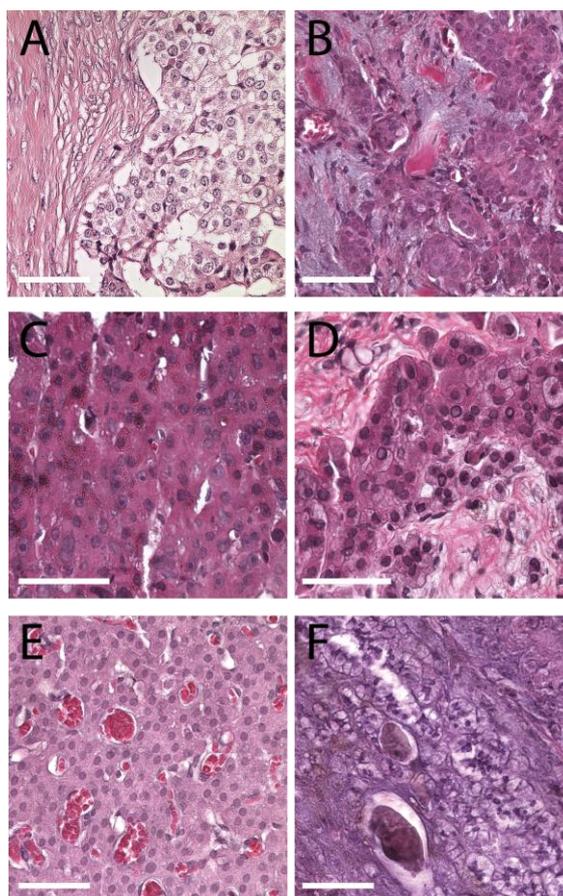
**Abbildung 3: A: humanes GEP-NET (Oberfläche); B: humanes NNR-Karzinom (Pfeil) (Schnittfläche); C: humanes malignes Phäochromozytom (Pfeile) (Schnittfläche); D: Wachstumsverhalten eines humanen GEP-NET in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 9 Wochen; E: Wachstumsverhalten eines humanen NNR-Karzinoms in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 24 Wochen; F: Wachstumsverhalten eines humanen malignen Phäochromozytoms in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 16 Wochen; Bilder-Quelle: A. Ozimek**

### 3.2. Vergleich des Tumormaterials vor und nach Transplantation

Sowohl das ursprüngliche Patientengewebe als auch das explantierte Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus wurden histologisch untersucht und miteinander verglichen. Mittels HE-Färbung wurde orientierend die Vitalität analysiert und somit der Erfolg des Anwachsens beurteilt (siehe Abbildung 4). Insgesamt zeigte sich bei den GEP-NET und den Primären der NNR-Karzinome eine vollständige Anwachsrate mit Zeichen der Vitalität in der HE-Färbung, während bei den Phäochromozytomen nur ein Drittel der Tumore anwuchs. In vier Tumoren (Metastase eines NNR-Karzinoms, zwei Primären sowie eine Metastase des Phäochromozytoms) konnte an Hand des explantierten Gewebes auf Grund von geringer Größe oder äußerst fragiler Beschaffenheit nicht sicher geklärt werden, ob die Tumore in der Maus angewachsen waren (siehe Kennzeichnung „N/Q“ in Tabelle 13).

Tumorentität	Rate des Anwachsens in Prozent
GEP-NET:	
Primarius (n=4)	100
Metastase (n=3)	100
NNR-Karzinom:	
Primarius (n=3)	100
Metastase (n=1)	N/Q
Phäochromozytom:	
Primarius (n=3)	33*
Metastase (n=1)	N/Q

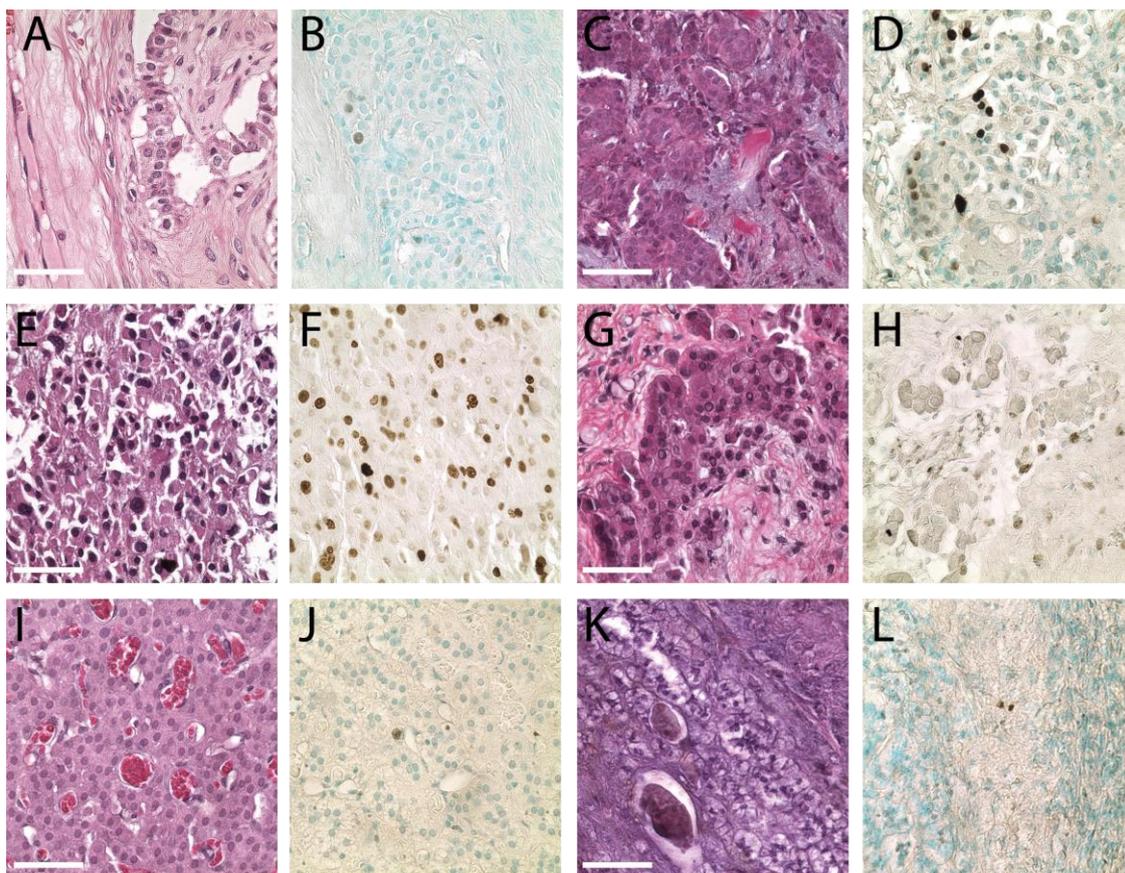
**Tabelle 13: Rate der angewachsenen Tumore je ausgewerteter Entität in Prozent. N/Q = nicht quantifizierbar, \*bei zwei Tumoren N/Q**



**Abbildung 4: HE-Färbung der einzelnen Tumorentitäten: A, C, E: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; B, D, F: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A, B: Primärtumor eines GEP-NET (Patient 2); C, D: Primärtumor eines NNR-Karzinoms (Patient 8); E, F: Primärtumor eines Phäochromozytoms (Patient 10); 40x Objektiv; Skalierungsbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m**

### **3.2.1. Proliferationsverhalten in den verschiedenen Tumorentitäten**

Zur Evaluierung der Zellproliferation im jeweiligen Tumor wurde die Ki67-IHC angewendet. Anhand der mikroskopischen Bilder wurde, wie unter 2.6. beschrieben, der Ki67-Index ermittelt. Anfänglich wurden die Ki67-Färbungen mit Hämatoxylin gegengefärbt. Da der Hintergrund die positiv gefärbten Kerne schwer erkennen ließ, wurden schließlich für alle Gewebsschnitte Ki67-Färbungen mit Methylgrün als Gegenfärbung durchgeführt (siehe Abbildung 5). Das Verhalten der Zellproliferation zeigte sich in dieser Arbeit in Zusammenschau aller untersuchten Tumore heterogen. Unter den unterschiedlichen Entitäten war kein vergleichbares Proliferationsverhalten zu beobachten. Der Ki67-Index während der 12 Wochen Nidation stieg teilweise deutlich an (siehe Abbildung 5, B und D). Es wurde jedoch auch Tumormaterial untersucht, dessen Ki67-Index im originären Patiententumor deutlich höher lag als nach Implantation in der immundefizienten Nacktmaus (siehe Abbildung 5, F und H). Ebenso wurden Tumore identifiziert, deren Ki67-Index sich nicht gravierend während der Implantationszeit veränderte (siehe Abbildung 5, J und L).

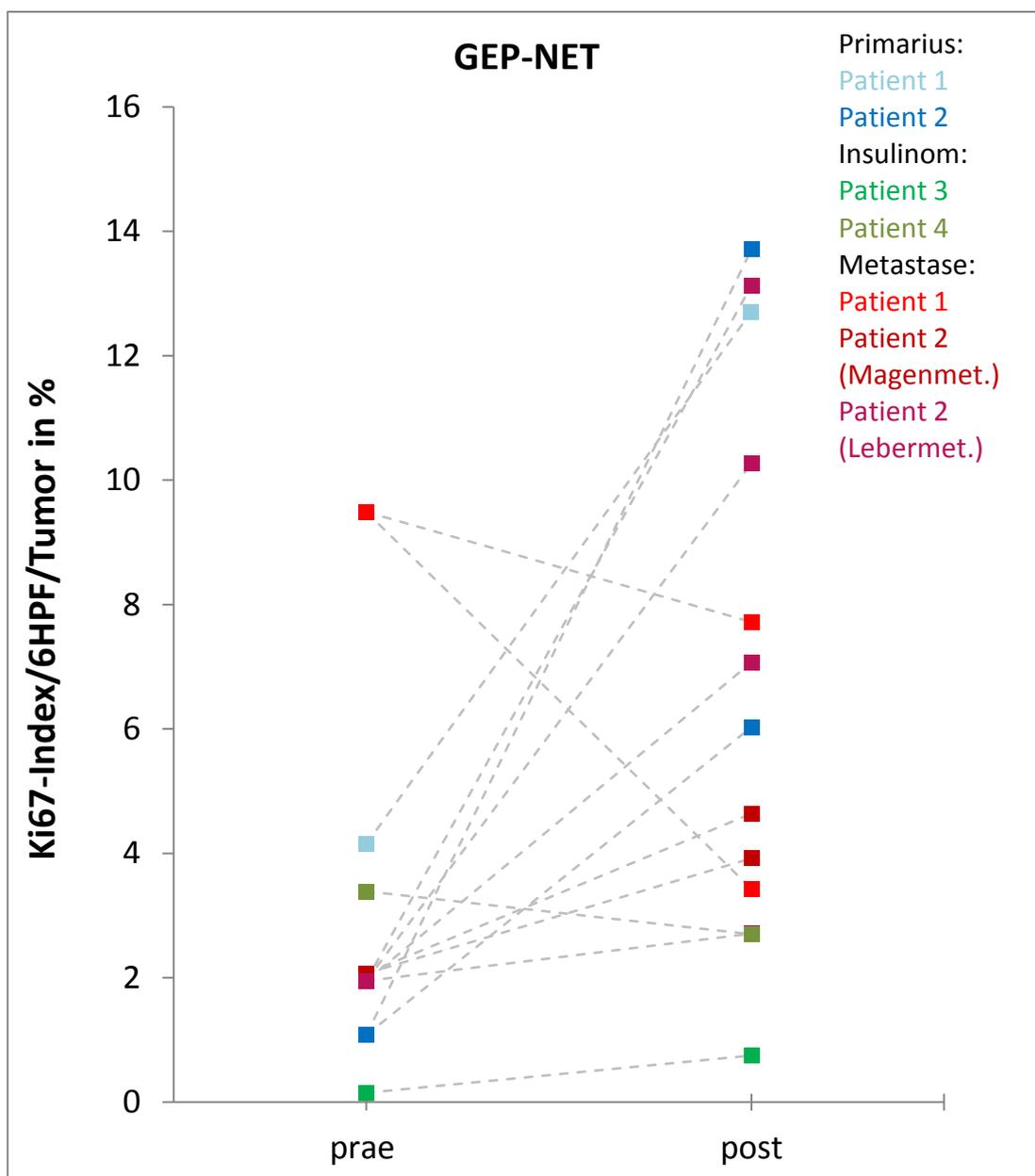


**Abbildung 5: Ki67-IHC der einzelnen Tumorentitäten (jeweils Primarien): B, F, J: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H, L: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: GEP-NET (Patient 2); E-H: NNR-Karzinom (Patient 8); I-L: Phäochromozytom (Patient 10); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G, I, K) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m**

In der vorliegenden Arbeit wurden für die GEP-NET im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Tumorentitäten verhältnismäßig deutliche Anstiege von Ki67 ermittelt. Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, fand sich in einem großen Teil der implantierten Tumorstücke (10/13  $\hat{=}$  77%) eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zum Ausgangswert, in mehreren Fällen erreichten die Unterschiede statistische Signifikanz (Patient 2, Primarius: prae: 1,08 $\pm$ 1,01%, post: 13,71 $\pm$ 9,47%, p: 0,009). Dies zeigte sich nicht nur in den Primärtumoren der GEP-NET, sondern auch in deren Metastasen (Patient 2, Lebermetastase: prae: 1,95 $\pm$ 2,40%, post: 10,27 $\pm$ 1,61%, p < 0,001). In einigen Fällen war die Proliferation von Primärtumor und dem zugehörigen Explantat aber auch vergleichbar (Patient 3, Insulinom: prae: 0,15 $\pm$ 0,23%; post: 0,75 $\pm$ 1,08%; p: 0,212) bis reduziert (3/13  $\hat{=}$  23%) (Patient 1, Lebermetastase: prae: 9,49  $\pm$ 5,26%, post: 3,43 $\pm$ 1,56%, p: 0,022). In einer untersuchten Metastase, deren Gewebe in zwei unterschiedliche Mäuse implantiert wurde, ging die Zellproliferation in der Maus zurück, konsistent in beiden Tieren, in welche implantiert wurde.

<b>Tumore</b>	<b>Ki-67-Index in % prae transplantationem</b>	<b>Ki-67-Index in % post transplantationem</b>	<b>p-Wert</b>
<b>GEP-NET</b>			
GEP-NET Primarius (Patient 1)	4,15±2,34%	12,71±11,21%	0,097
GEP-NET Lebermetastase (Patient 1)	9,49±5,26%	3,43±1,56%	0,022
		7,72±2,61%	0,477
GEP-NET Primarius (Patient 2)	1,08±1,01%	13,71±9,47%	0,009
		6,03±4,44%	0,024
GEP-NET Magenmetastase (Patient 2)	2,07±2,11%	3,92±3,14%	0,259
		4,64±4,81%	0,257
GEP-NET Lebermetastase (Patient 2)	1,95±2,40%	10,27±1,61%	< 0,001
		7,07±2,32%	0,004
		13,13±4,77%	< 0,001
		2,71±1,44%	0,520
GEP-NET Insulinom (Patient 3)	0,15±0,23%	0,75±1,08%	0,212
GEP-NET Insulinom (Patient 4)	3,39±1,46%	2,70±0,63%	0,321

**Tabelle 14: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der GEP-NET**



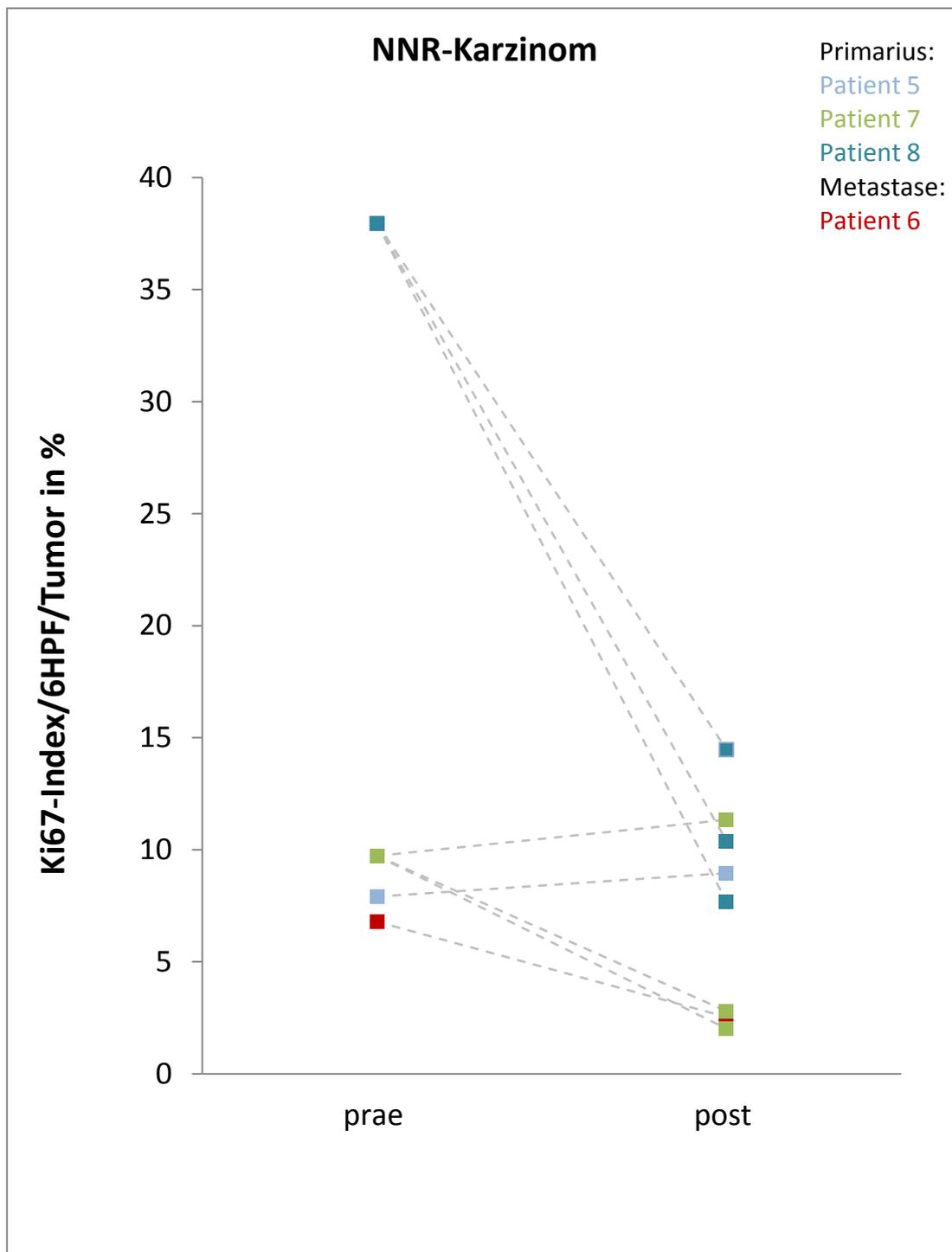
**Abbildung 6: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den GEP-NET**

Bei den NNR-Karzinomen zeigten sich in zwei Fällen der untersuchten Explantate (2/8  $\hat{=}$  25%) Ki67-Indices, die nach der Implantation nur minimal angestiegen sind und somit als mit der originären Tumorhistologie vergleichbar angesehen wurden (Patient 5, Primarius bei MEN Typ 1: prae:  $7,91 \pm 5,73\%$ ; post:  $8,96 \pm 4,92\%$ ;  $p: 0,740$ ) (siehe Abbildung 7). In den restlichen sechs Explantaten war der Ki67-Index niedriger als vor der Implantation; in fünf Primarien (Patient 8, Primarius: prae:  $37,96 \pm 5,99\%$ ; post:  $7,68 \pm 2,82\%$ ;  $p < 0,001$ ) ging die Zellproliferation im Laufe der Nidation in der Maus stark zurück (5/8  $\hat{=}$  62,5%), in einer Metastase (Patient 6, Lebermetastase: prae:  $6,79 \pm 2,31\%$ ; post:  $2,54 \pm 1,42\%$ ;  $p: 0,003$ ) sank der Ki67-Index deutlich geringer (1/8  $\hat{=}$  12,5%).

Bei einem NNR-Karzinom (Patient 7, Primarius) verhielten sich drei einzelne Tumorstücke, die in drei verschiedene Mäuse implantiert wurden, unterschiedlich. In zwei der Gewebstücke nahm die Proliferation ab, im dritten Tumorstück war, wie schon oben beschrieben, die Proliferation vergleichbar mit der originären Tumorhistologie.

<b>Tumore NNR-Karzinome</b>	<b>Ki-67-Index in % prae transplantationem</b>	<b>Ki-67-Index in % post transplantationem</b>	<b>p-Wert</b>
Metastasierendes NNR- Karzinom bei MEN Typ 1 Primarius (Patient 5)	7,91±5,73%	8,96±4,92%	0,740
NNR-Karzinom Lebermetastase (Patient 6)	6,79±2,31%	2,54±1,42%	0,003
NNR-Karzinom Primarius (Patient 7)	9,73±6,24%	2,80±2,29%	0,041
		2,02±3,14%	0,022
		11,34±8,94%	0,725
NNR-Karzinom Primarius (Patient 8)	37,96±5,99%	7,68±2,82%	< 0,001
		14,48±7,50%	< 0,001
		10,40±7,46%	< 0,001

**Tabelle 15: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der NNR-Karzinome**



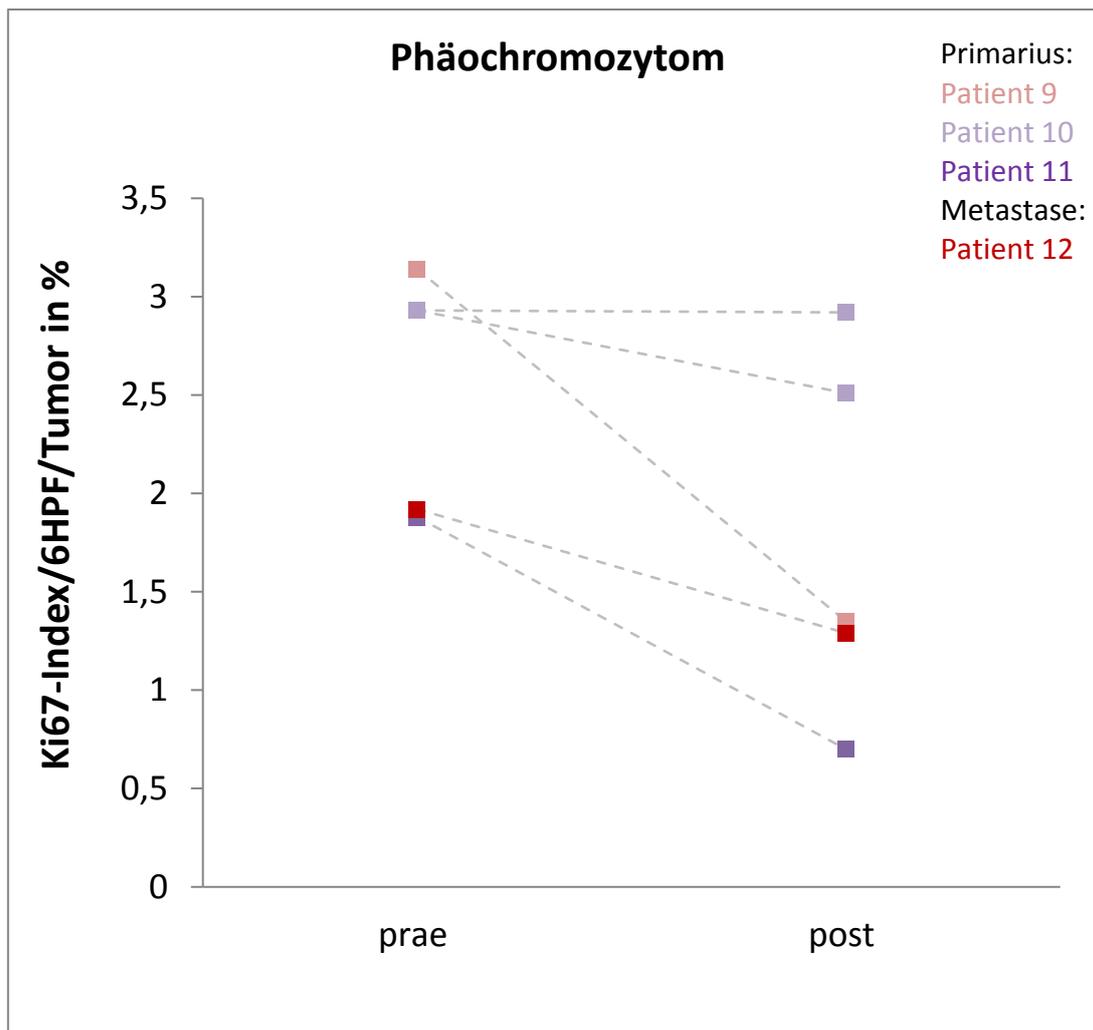
**Abbildung 7: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den NNR-Karzinomen**

Die Ki67-Indices aller untersuchten Phäochromozytome sind in Abbildung 8 dargestellt. Ein Primarius (1/5  $\hat{=}$  20%) zeigte einen vergleichbaren Ki67-Index vor und nach der Implantation (Patient 10, Primarius: prae: 2,93 $\pm$ 1,03%, post: 2,92 $\pm$ 1,77%, p: 0,991). In zwei Phäochromozytomen (2/5  $\hat{=}$  40%), klinisch maligne einerseits (Patient 9, Primarius: prae: 3,14 $\pm$ 2,46%, post: 1,35 $\pm$ 0,92%, p: 0,145), im

Rahmen eines MEN Typ 2 andererseits (Patient 11: prae:  $1,88 \pm 1,19\%$ , post:  $0,70 \pm 0,83\%$ , p: 0,076), sank die Zellproliferation während der Nidation in der Maus relativ deutlich ab, ohne signifikant zu sein. In den letzten beiden untersuchten Phäochromozytomen, einem Primarius (Patient 10: prae:  $2,93 \pm 1,03\%$ , post:  $2,51 \pm 1,51\%$ , p: 0,585) sowie einer Metastase (Patient 12: prae:  $1,92 \pm 0,76\%$ , post:  $1,29 \pm 0,67\%$ , p: 0,157), sank die Zellproliferation nur geringfügig ( $2/5 \hat{=} 40\%$ ).

<b>Tumore</b>	<b>Ki-67-Index in % prae transplantationem</b>	<b>Ki-67-Index in % post transplantationem</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Phäochromozytome</b>			
malignes Phäochromozytom Primarius (Patient 9)	$3,14 \pm 2,46\%$	$1,35 \pm 0,92\%$	0,145
Phäochromozytom Primarius (Patient 10)	$2,93 \pm 1,03\%$	$2,92 \pm 1,77\%$	0,991
		$2,51 \pm 1,51\%$	0,585
Phäochromozytom bei MEN2 (Patient 11)	$1,88 \pm 1,19\%$	$0,70 \pm 0,83\%$	0,076
malignes Phäochromozytom Metastase (Patient 12)	$1,92 \pm 0,76\%$	$1,29 \pm 0,67\%$	0,157

**Tabelle 16: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der Phäochromozytome**



**Abbildung 8: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den Phäochromozytomen**

### 3.2.2. Expression von ChrA in den neuroendokrinen Tumoren

Der ChrA-Wert, wie beschrieben unter 2.6., repräsentierte in dieser Arbeit die neuroendokrine Aktivität der GEP-NET und Phäochromozytome. Im Vergleich zum originären Tumor waren alle ChrA-Werte der untersuchten GEP-NET im Gewebe nach der Implantation niedriger, häufig mit signifikantem Unterschied (Patient 2, Primarius: prae:  $111,94 \pm 40,12$  AU, post:  $6,96 \pm 9,86$  AU,  $p: 0,001$ ) (siehe Abbildung 9). Morphologisch stellten sich die Gewebeproben sehr heterogen dar (siehe Abbildung 10). Vor allem bei den GEP-NET konnten nestförmige Areale gezeigt werden, die teilweise zwischen originärem Patiententumor und explantiertem Gewebe vergleichbar waren (Patient 1, Lebermetastase). Einige untersuchte Tumore wiesen zellkernarme Regionen mit Durchsetzung von Adipozyten und Bindegewebe auf, was vor allem bei den Insulinomen beobachtet wurde (Patient 3, Patient 4). Dennoch konnten in diesen Schnitten Tumorzellen identifiziert und die entsprechenden

Quantifizierungen der Färbungen vorgenommen werden (Patient 4, Insulinom: prae:  $69,78 \pm 16,95$  AU, post:  $10,72 \pm 15,15$  AU,  $p < 0,001$ ).

<b>Tumore</b>	<b>ChrA-Wert in AU</b>	<b>ChrA-Wert in AU</b>	<b>p-Wert</b>
<b>GEP-NET</b>	<b>prae</b>	<b>post</b>	
	<b>transplantationem</b>	<b>transplantationem</b>	
GEP-NET Primarius (Patient 1)	$60,49 \pm 16,21$ AU	$51,57 \pm 11,73$ AU	0,300
GEP-NET Lebermetastase (Patient 1)	$119,27 \pm 35,83$ AU	$46,89 \pm 9,26$ AU	0,004
		$46,54 \pm 24,49$ AU	0,002
GEP-NET Primarius (Patient 2)	$111,94 \pm 40,12$ AU	$32,60 \pm 15,02$ AU	0,003
		$6,96 \pm 9,86$ AU	0,001
GEP-NET Magenmetastase (Patient 2)	$53,17 \pm 7,08$ AU	$37,08 \pm 8,70$ AU	0,006
		$11,14 \pm 11,27$ AU	< 0,001
GEP-NET Lebermetastase (Patient 2)	$69,50 \pm 10,48$ AU	$22,01 \pm 5,02$ AU	< 0,001
		$7,51 \pm 13,21$ AU	< 0,001
		$11,44 \pm 14,48$ AU	< 0,001
		$7,09 \pm 15,59$ AU	< 0,001
GEP-NET Insulinom (Patient 3)	$67,35 \pm 25,63$ AU	$9,42 \pm 6,96$ AU	0,002
GEP-NET Insulinom (Patient 4)	$69,78 \pm 16,95$ AU	$10,72 \pm 15,15$ AU	< 0,001

**Tabelle 17: ChrA-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der GEP-NET**

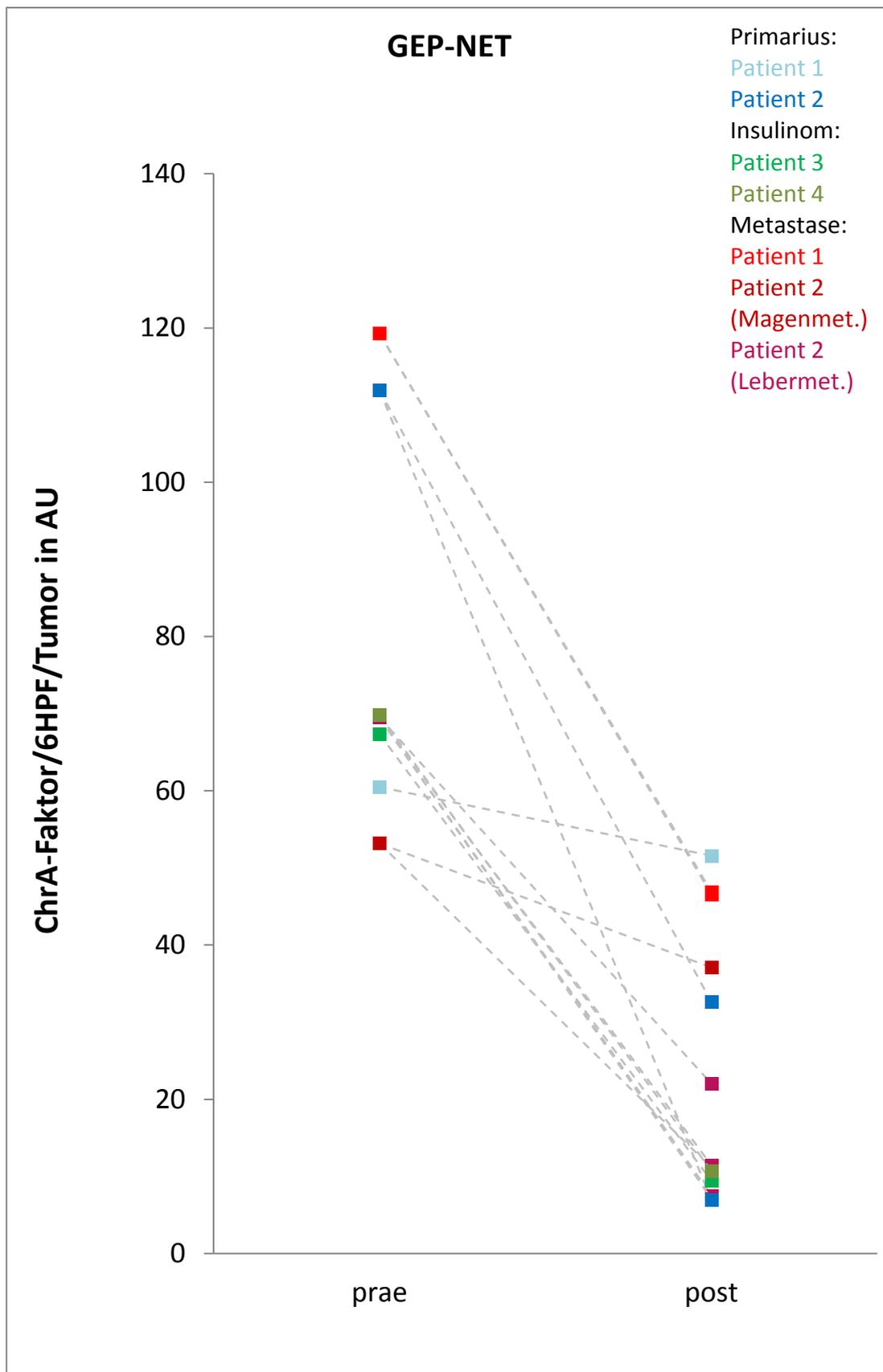
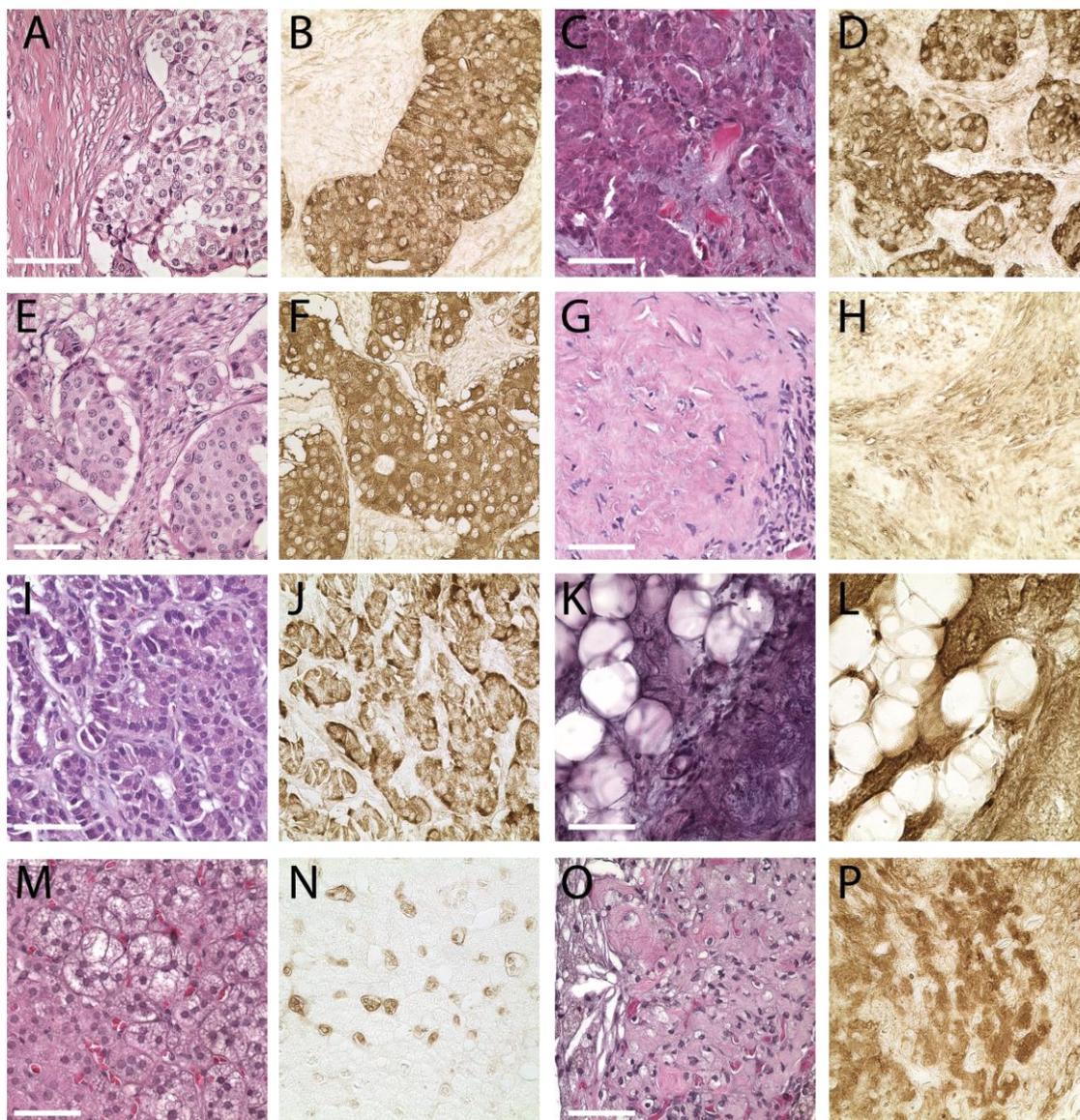


Abbildung 9: Expression von ChrA im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den GEP-NET; AU = arbitrary units



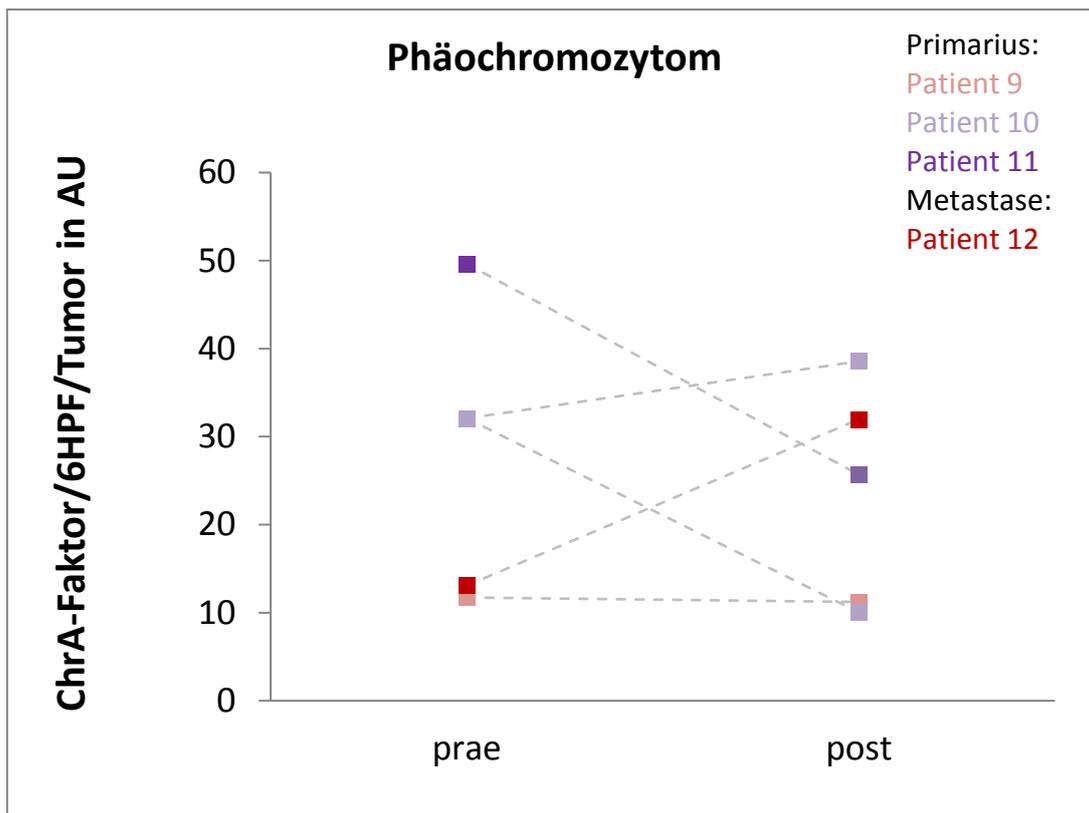
**Abbildung 10: ChrA-IHC: B, F, J, N: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H, L, P: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: Primärtumor eines GEP-NET (Patient 2); E-H: Metastase eines GEP-NET (Patient 2); I-L: Primärtumor eines Insulinoms (Patient 4); M-P: Primärtumor eines Phäochromozytoms (Patient 10); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G, I, K, M, O) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m**

Das Verhalten der ChrA-Expression in den Phäochromozytomen war, anders als bei den GEP-NET, deutlich schwerer einzuordnen, was daran liegen mag, dass das Anwachsen der Phäochromozytome in der immundefizienten Nacktmaus als fraglich zu werten ist. Die ermittelten Werte spiegeln erneut die Heterogenität der Tumore wider: zwei Explantate (2/5  $\hat{=}$  40%) wurden als vergleichbar gewertet (Patient 9, Primarius: prae: 11,73 $\pm$ 2,40 AU, post: 11,22 $\pm$ 1,34 AU, p: 0,661). Das Phäochromozytom im Rahmen der MEN Typ 2 zeigte einen statistisch signifikanten Rückgang des ChrA-Wertes nach der Implantation (Patient 11: prae: 49,62 $\pm$ 2,78 AU, post: 25,68 $\pm$ 22,45 AU, p: 0,027). Es wurden aber auch

erhöhte ChrA-Werte nach der Implantation in der Maus gemessen (Patient 12, Metastase: prae:  $13,08 \pm 2,19$  AU, post:  $31,97 \pm 42,85$  AU, p: 0,330). Interessant ist der Fall des Patienten 10, dessen Tumor in einer Maus einen Anstieg, in einer anderen Maus einen Rückgang des ChrA-Wertes nach Implantation aufzeigte.

<b>Tumore</b>	<b>ChrA-Wert in AU</b>	<b>ChrA-Wert in AU</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Phäochromozytome</b>	<b>prae</b>	<b>post</b>	
	<b>transplantationem</b>	<b>transplantationem</b>	
malignes Phäochromozytom Primarius (Patient 9)	$11,73 \pm 2,40$ AU	$11,22 \pm 1,34$ AU	0,661
Phäochromozytom Primarius (Patient 10)	$32,08 \pm 16,68$ AU	$38,56 \pm 24,09$ AU	0,600
		$10,05 \pm 26,36$ AU	0,114
Phäochromozytom bei MEN2 (Patient 11)	$49,62 \pm 2,78$ AU	$25,68 \pm 22,45$ AU	0,027
malignes Phäochromozytom Metastase (Patient 12)	$13,08 \pm 2,19$ AU	$31,97 \pm 42,85$ AU	0,330

**Tabelle 18: ChrA-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der Phäochromozytome**



**Abbildung 11: Expression von ChrA im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den Phäochromozytomen; AU = arbitrary units**

### 3.2.3. Expression von SF-1 in den NNR-Karzinomen

Zur Evaluation der adrenalen Steroidogenese wurde in dieser Arbeit eine Färbung in den Tumorproben der NNR-Karzinome mittels SF-1 angefertigt. Bei der Auswertung dieses Transkriptionsfaktors wurden ausschließlich positive Kerne gezählt und diese zwischen originärem Patientenmaterial und murinem Gewebe verglichen. Die Expressionslevel von SF-1 in den untersuchten NNR-Karzinomen spiegelten die Heterogenität dieser Tumorentität wider. Ein NNR-Karzinom zeigte in einer von drei Mäusen nahezu idente Werte zwischen originärem Tumor und Tumoräquivalent nach der Implantation (Patient 5, NNR-Karzinom bei MEN Typ 1: prae:  $4,22 \pm 1,62$ , post:  $4,22 \pm 1,57$ ,  $p: 0,997$ ). Nur in einem weiteren Explantat verhielt sich die Expression von SF-1 ebenfalls dem Ausgangsmaterial vergleichbar (Patient 7: prae:  $3,28 \pm 0,93$ , post:  $3,19 \pm 1,01$ ,  $p: 0,880$ ) (siehe Abbildung 12). In den anderen untersuchten Explantaten ( $6/8 \hat{=} 75\%$ ) war die Anzahl gezählter SF-1-positiver Zellkerne deutlich geringer als im ursprünglichen Patientengewebe (siehe Abbildung 13) und zeigten mehrheitlich statistisch signifikante Unterschiede (Patient 8: prae:  $9,11 \pm 1,92$ , post:  $1,78 \pm 1,04$ ,  $p < 0,001$ ).

<b>Tumore</b>	<b>MW der SF-1 positiven Zellen/HPF prae transplantationem</b>	<b>MW der SF-1 positiven Zellen/HPF post transplantationem</b>	<b>p-Wert</b>
<b>NNR-Karzinome</b>			
Metastasierendes NNR-Karzinom bei MEN Typ 1 Primarius (Patient 5)	4,22±1,62	4,22±1,57	0,997
NNR-Karzinom Lebermetastase (Patient 6)	1,75±0,53	0,69±0,29	0,002
NNR-Karzinom Primarius (Patient 7)	3,28±0,93	3,19±1,01	0,880
		0,45±0,25	< 0,001
		1,08±0,51	< 0,001
NNR-Karzinom Primarius (Patient 8)	9,11±1,92	1,78±1,04	< 0,001
		1,92±0,31	< 0,001
		5,08±1,62	0,003

**Tabelle 19: SF-1-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der NNR-Karzinome**

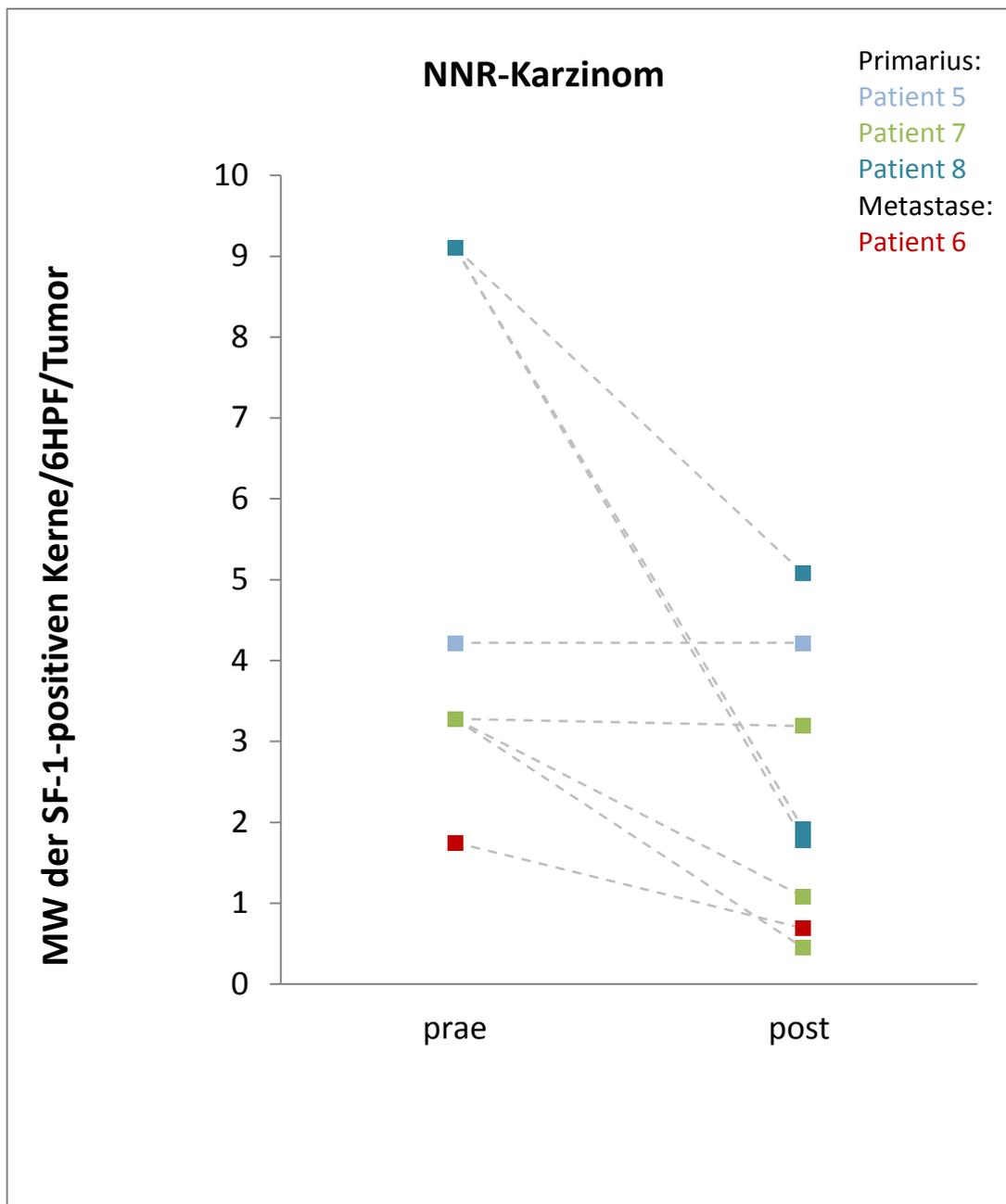
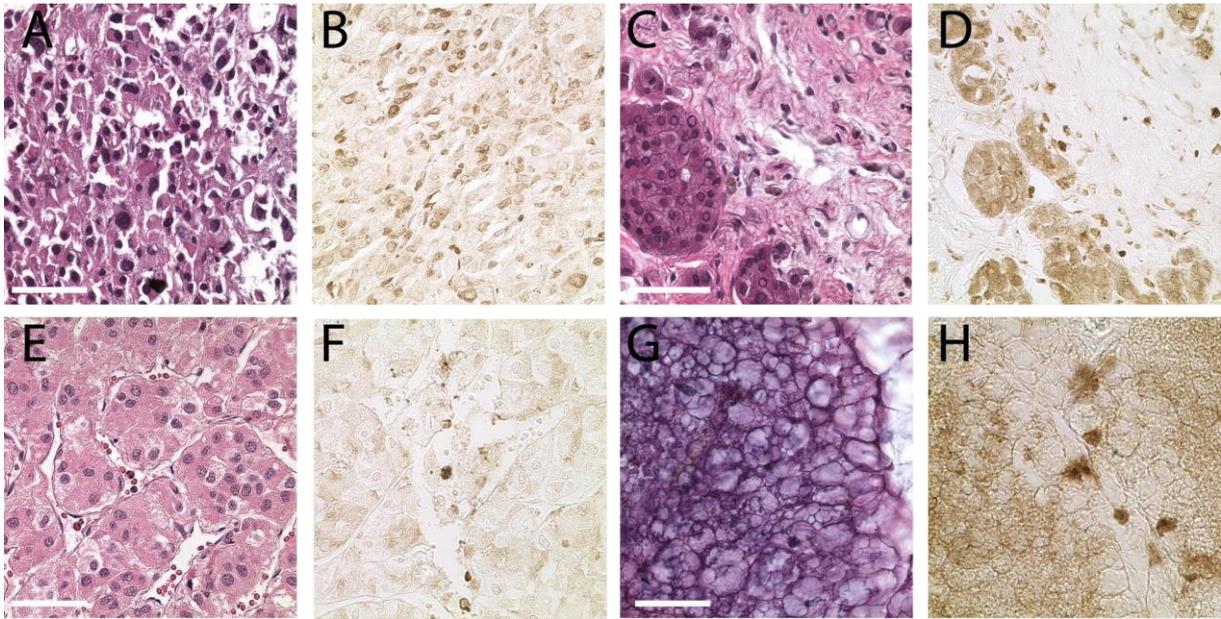


Abbildung 12: Expression von SF-1 im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den NNR-Karzinomen



**Abbildung 13: SF-1-IHC der NNR-Karzinome; B, F: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: Primärtumor eines NNR-Karzinoms (Patient 8); E-H: Metastase eines NNR-Karzinoms (Patient 6); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m**

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde an der Etablierung eines PDX-Modells gearbeitet. Im Gegensatz zur Implantation von Tumorzelllinien wurde ein ganzes Teilstück eines Patiententumors subkutan in eine immundefiziente Nacktmaus implantiert und dort drei Monate belassen. Dadurch konnte untersucht werden, wie sich das humane Tumorgewebe nach der Implantation verhält und ob sich die Proliferation und die endokrine Aktivität (ChrA für GEP-NET und Phäochromozytome, SF-1 für NNR-Karzinome) des Tumors verändern. Es zeigte sich eine prinzipiell hohe Anwachsrate in der Maus, insbesondere bei GEP-NET (100%) und NNR-Karzinomen (100% der Primarien; N/Q der Metastase). Während es bei den GEP-NET in etwa 80% zu einer steigenden Proliferation kam, nahm die endokrine Aktivität bei dieser Entität ausschließlich ab. In den NNR-Karzinomen nahm die Proliferation bei der Hälfte der Implantate deutlich ab. Ebenso zeigte sich die Steroidogenese in der Mehrzahl der Tumore regredient nach der Implantation in die Maus. Für die Phäochromozytome konnte keine gute Anwachsquote erzielt werden. Die Proliferation war nach der Verweildauer in der Maus in 80% deutlich niedriger als bei dem originären Patiententumor. ChrA als Marker der endokrinen Aktivität zeigte sich hier sehr heterogen in seinem Färbeverhalten.

Prinzipiell geben die Ergebnisse deutliche Hinweise darauf, dass die Implantation ganzer Tumorstücke Potenzial hat, ein valides Tumormodell darzustellen; ein Überleben und sogar Proliferation im Versuchstier gelingen in den allermeisten Fällen. Auch spezifische Charakteristika differenzierter endokriner Gewebe (Expression zum Beispiel von ChrA oder SF-1) bleiben bestehen. Die Quantifizierung insbesondere der funktionellen Charakteristika zeigte jedoch keinen vollständigen Erhalt der Ausgangssituation, sondern eine gewisse Dynamik während der Inkubation in der Maus. Ziel zukünftiger Arbeiten sollte es sein, die Prozedur der Implantation weiter zu optimieren, sodass die Tumorpräparate proliferativ und funktionell noch vergleichbarer werden. Es könnten erste präklinische Therapieversuche angeschlossen werden, welche der Individualität jeder Tumorentität und der einzelnen Patienten besser gerecht würden.

### 4.1. Tumormodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges Tumormodell untersucht. Generell können Tumormodelle auf verschiedene Arten eingeteilt werden. Einerseits gibt es den Unterschied zwischen *in vitro* Modellen im gut standardisierbaren, aber sehr artifiziellen Milieu und *in vivo* Modellen im lebenden Organismus. Zellkulturen als wichtigste Form der *in vitro* Modelle sind oft vielfach erprobte Zelllinien. Deren Vorteil ist, dass die Eigenschaften dieser Tumor-Zelllinien nach Jahre langer Arbeit damit meist hinreichend bekannt sind. Genau dieser Aspekt bedingt aber auch Nachteile; so werden unter Umständen neu aufgetretene Mutationen nach längerer Passage-Dauer

nicht ausreichend berücksichtigt. Auch geht die Heterogenität innerhalb einer Tumorentität oder intratumoral durch die Kultivierung *in vitro* verloren [70]. Offensichtlich und wohl am schwerwiegendsten fehlt dazu im Gegensatz zu *in vivo* Modellen die Einbettung in das komplexe System des Gewebes und die dreidimensionale Struktur des Tumorverbandes.

Bei *in vivo* Tiermodellen kann man mit unterschiedlichsten Spezies wie beispielsweise Fischen, Nagetieren, Hunden, Schweinen oder Affen arbeiten. Einerseits können hiermit Ergebnisse aus vorangegangenen *in vitro* Tests validiert werden. Andererseits stellen die weit komplexeren Gegebenheiten im lebenden Organismus immer noch eine große Herausforderung dar. Versuche sind teilweise wenig plan- oder standardisierbar. Das Wachstum eines humanen Tumors in einer immundefizienten Nacktmaus wurde erstmals 1969 von Rygaard und Povlsen beschrieben. Damals wurde ein 5x5x5mm großes Tumorstück erst zerkleinert, in ein Medium (5ml Gewebekultur „199“, (Glaxo)) gegeben und in diesem (0,5ml) in die Maus implantiert. Nach drei Wochen wurden die Zellen, erneut zum Tumorverbund zusammengewachsen, entnommen und schließlich als 2x2x2mm großes Tumorstück in eine weitere Maus implantiert [8]. In unserer Arbeitsgruppe entfiel der erste Schritt der Implantation mit geschnittenem und in Medium gegebenen Tumorzellen; es wurde sofort ein ganzes Teilstück des Patiententumors in die Maus implantiert. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an *in vivo* Modellen. Als Xenotransplantate (Xenografts) werden entweder Tumorzelllinien oder humane Tumorimplantate eingesetzt [71]. Neben humanen Xenografts gibt es syngene Mausmodelle, Metastasierungsmodelle, farbmarkierte Modelle zur Visualisierung der Tumorzellen oder transgene Tumormodelle [72]. Von humanen Zelllinien abstammende Xenografts können in immundefizienten Mäusen subkutan oder orthotop, also im originären Organsystem eingesetzt werden [70]. Gazdar et al. beschrieben erste Versuche, Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms orthotop zu implantieren. Seitdem hat die orthotope Transplantation starken Auftrieb erfahren, nicht zuletzt da das Modell eine potenziell bessere Bewertbarkeit des Mikromilieus, des Therapieansprechens sowie des Metastasierungsverhaltens verspricht. Mittels Luciferase-Gen-Transfektion können die Tumorzellen und deren Wachstum und Verteilung im Gewebe visualisiert werden [73]. Die Einbringung in das an das Ursprungsorgan angeschlossene Gefäßsystem erweitert den Ansatz noch, mit potenziell besserer Verteilrate [74]. Dennoch wird derzeit die subkutane Xenotransplantation bevorzugt, da die orthotope Transplantation humaner Tumore technisch äußerst kompliziert ist [75].

In PDX-Modellen wird ein ganzes Gewebstück in die Modellspezies implantiert. Dabei bleibt die Architektur und zelluläre Zusammensetzung des ursprünglichen Tumors bestehen, was die Forschung an verschiedensten Tumorarten und den Erhalt deren Heterogenität ermöglicht. Für einige Entitäten wie beispielsweise einen Subtyp des Colorektalen Karzinoms existiert ein PDX-Modell, ohne dass

Zelllinien für diesen Tumor zur Verfügung stünden [70]. Potentielle Nachteile der PDX-Modelle sind neben der nicht ursprungsgetreuen, subkutanen Implantation der schrittweise Ersatz der vom Patienten abstammenden Stromazellen durch murine Stromazellen. Auch das Fehlen eines intakten Immunsystems, das häufige Ausbleiben der Metastasierung und die Kontamination der implantierten humanen Zellen mit murinen xenotropen Viren stellen Schwierigkeiten dar [76], [77]. Hier stellt sich die Frage, inwiefern eine orthotope Implantation es ermöglicht, eine vergleichbare Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie eine ursprungsgetreue Anordnung von Zellen zueinander zu gewährleisten, damit die entarteten Zellen ähnlichen Rahmenbedingungen begegnen. In der Literatur werden solche orthotop transplantierten Tumore mit einer größeren Metastasierungsrate beschrieben [78].

Neben der Einteilung *in vitro* versus *in vivo* kann man Tumormodelle auch in experimentelle, therapeutische sowie prognostische Modelle gliedern. Experimentelle Tumormodelle werden für die Untersuchung der Tumorbiologie genutzt. In der vorliegenden Arbeit liegt ein Fokus auf einem Modell, welches im Rahmen eines Patienten-individuellen Ansatzes sowohl therapeutisch sowie prognostisch fungieren könnte. Dieser Ansatz zielt darauf ab, den Gegebenheiten im humanen, lebenden Organismus möglichst nahe zu kommen und die Heterogenität widerzuspiegeln. Ein Ziel wäre, damit die Antworten der Tumor-induzierenden Zellen, der Tumor- und Stromazellen auf therapeutische Interventionen zu untersuchen [70] und individuelle molekulare Therapien zu entwickeln [77].

Aktuell wird versucht, neue *in vitro* Modelle zu etablieren, die langfristig gegebenenfalls die Forschung am Tiermodell ersetzen könnten. Bislang werden therapeutische Entscheidungen getroffen, die sich an statischen Merkmalen des operierten oder biopsierten Tumorgewebes orientieren. Dabei werden dynamische Zellfunktionen oder Reaktionen auf spezifische Reize nicht berücksichtigt. Um prädiktive Informationen über die Tumorzellen bereitzustellen, sind Gewebsschnitte des Tumors, organoide Kulturen, Immunzellkulturen sowie kurzzeitige *ex vivo* Zellkulturen wichtige Techniken. An der Universität Mainz beispielsweise wird an der Entwicklung eines dreidimensionalen Tumormodells gearbeitet, welches das Verhalten lebender Patienten-individueller Tumorzellen, eingebettet in eine Matrix aus Stromazellen, untersucht sowie deren Antwort auf zielgerichtete Therapeutika analysiert. Mit diesen verfeinerten *ex vivo* Methoden wäre es auch möglich, mittels großen Mutationsanalysen den Genotyp mit dem Phänotyp (Therapieansprechen, Wachstumsverhalten) zu korrelieren [79]. Derlei innovative *in vitro* Verfahren befinden sich weiterhin in der Etablierungsphase: das erklärte Ziel, eine *in vivo* Situation nachzustellen, ist noch nicht erreicht. Wir betrachten damit den Ansatz des PDX-Modells als den

Ansatz mit dem mittelfristig höchsten Potenzial zur Nachstellung und Modellierung der humanen Tumorbiologie und deren Reaktion auf spezifische medikamentöse Therapieverfahren.

#### 4.1.1. GEP-NET

1986 etablierten Evers et al. erstmals die kontinuierliche BON-Zelllinie [80], die einem metastasierten Pankreaskarzinoid entstammte. Bei dem bei Diagnosestellung 28-jährigen Patienten wurde ein metastasiertes Karzinoid des Pankreaskopfes mit befallenen peripankreatischen Lymphknoten, Diarrhö und Verschlussikterus festgestellt. In der Zellkultur wuchsen die BON-Zellen in herkömmlichen Kulturflaschen ohne besondere Beschichtung. Evers et al. hatten schon 1991 beschrieben, dass nach subkutaner Injektion von BON-Zellen in immundefizienten Nacktmäusen hormonproduzierende Tumore entstehen, welche die gleichen histologischen Charakteristika wie die des originären Pankreaskarzinoids aufweisen [81]. Neben Serotonin, Neurotensin und Pankreastatin synthetisieren BON-Zellen ChrA. Auf Grund der nicht ursprungsgetreuen Umgebung des subkutan implantierten Tumors werden mittlerweile orthotope Xenotransplantationen erprobt. Die in dieser Arbeit untersuchten Magen- und Lebermetastasen von GEP-NET könnten in einem nächsten Schritt orthotop in der Maus implantiert werden. Fraedrich et al. beschreiben ein orthotopes Modell für Lebermetastasen eines GEP-NET. Hierfür wurden entweder BON1-Zellen oder Zellen der Tumorklinie QGP, die aus einem nicht-funktionellen, pankreatischen Inselzell-Tumor entstammt, in die Milz einer immundefizienten NOD-SCID-Maus (Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency-Maus) implantiert [74]. Weiterhin wurden im Rahmen biologischer Verteilungsstudien erste Versuche durchgeführt, in welchen Tumorzellen direkt in die Portalvene infiziert wurden. In beiden Fällen konnte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine schnelle Ausbreitung (innerhalb von zwei Stunden) der Tumorzellen in die Leber beobachtet werden. In der histologischen Untersuchung vier Wochen nach Transplantation zeigten sich eine ausgeprägte Hepatomegalie sowie Tumorzellen mit vielen Nestern und nekrotischem Anteil darin. Die Immunhistochemie machte eine starke Expression von ChrA bei den Lebermetastasen der BON1-Zellen deutlich, was das Beibehalten der *in vitro* Charakteristika bezüglich der neuroendokrinen Differenzierung implizierte. Mittels Ki67 und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde eine ausgeprägte Proliferation *in vivo* ermittelt. Die QGP-Zellen waren negativ für ChrA. Die Lebermetastasen dieser Zelllinie wiesen allerdings andere typische Morphologien des NET wie kleine Zellen mit hoher Nukleus/Zytoplasma-Ratio auf. Der Proliferations-Index war bei beiden Zelllinien über 20% hoch, wobei er sich bei den Metastasen etwas kleiner als bei den BON1-Zellen zeigte. Erstaunlicherweise konnte ebenfalls murine Angiogenese im zellulären Xenograft mittels Maus-spezifischem Antikörper von CD31 detektiert werden [74].

Trotz erfolgreicher Tumorgenese mittels Zellimplantation im Tier ist die Bedeutung der Tumormodelle mit humanen Zelllinien für GEP-NET weiterhin kontrovers zu diskutieren. Auf Grund der Heterogenität der Patiententumore ist es durch einzelne Zelllinien nicht hinreichend möglich, ein adäquates Modell darzustellen. Bestehende Zelllinien wie die der BON-Linie sind vor mehreren Jahrzehnten etabliert worden; mögliche genetische Veränderungen werden somit nicht berücksichtigt. Ein detailliertes Verständnis der molekularen Abweichungen des jeweiligen humanen GEP-NET ist für das Design relevanter präklinischer Tumormodelle vonnöten [36]. Die in dieser Arbeit mittels PDX geschaffenen Maustumore zeigten im Vergleich zu den ursprünglichen Patiententumoren ein Proliferationsverhalten, welches in einem Teil der Tumore vergleichbar war. Bei weiterführender Optimierung des Modells im Hinblick auf eine im Verhältnis gleichbleibende Tumordynamik in der Maus wäre ein Modellsystem zur individuellen Therapietestung also durchaus vorstellbar.

#### **4.1.2. NNR-Karzinom**

Für das NNR-Karzinom etablierten Gazdar et al. 1980 die erste kontinuierliche Zelllinie, die sogenannte NCI-H295-Zelllinie. Die dafür genutzten Zellen entstammten einem invasiv wachsenden NNR-Karzinom einer 48 Jahre alten Patientin, die sich mit Gewichtsverlust, Akne, Hirsutismus, Ödemen und Diarrhö präsentierte [7]. Die Verdopplungszeit der Zellen wird als verhältnismäßig lange beschrieben. Das Wachstumsbild der Zellen ist adhärent; diese weisen eine nadelförmige, bisweilen epitheloidzellartige Struktur auf und können *in vitro* und *in vivo* kultiviert werden. Die Autoren injizierten NCI-H295-Zellen subkutan in immundefiziente Mäuse. Sechs bis neun Wochen nach Injektion konnte bei über 80% ein Tumor in den Mäusen detektiert werden. Histologische Charakteristika waren dem ursprünglichen Tumormaterial ähnlich. Allerdings zeigten einige Zellen eine außergewöhnliche Morphologie, die nicht der initialen Form entspricht [7]. NCI-H295-Zellen produzieren auch als Xenotransplantate Glukokortikoide, Mineralokortikoide sowie C19-Steroide, weshalb sie für die Arbeit mit steroidogenen Signalwegen eingesetzt werden können [102]. Außerdem wurde eine dem humanen NNR-Karzinom vergleichbare Dysregulation im IGF-System mit Überexpression von IGF2 und IGF-bindendem Protein-2 detektiert, was als Ansatz einer Therapie mit IGF1R-Antagonisten dienlich sein könnte [83], [84]. NCI-H295-Zellen wurden auch schon genetisch modifiziert subkutan eingesetzt, um die Rolle von  $\beta$ -Catenin hinsichtlich der Entstehung von NNR-Tumoren zu erforschen [85].

Ein weiteres präklinisch herangezogenes Modell basiert auf der subkutanen Injektion von SW13-Zellen, welche ursprünglich einem nicht sezernierenden kleinzelligen Karzinom innerhalb der Nebenniere entstammten und in den 1970er Jahren als Zelllinie etabliert worden sind [86]. Seit

Kurzem gibt es ein erstes pädiatrisches Tumormodell, das SJ-ACC3. Das dafür genutzte NNR-Karzinom wurde zufällig bei einem 11-jährigen Jungen entdeckt. Es zeigte trotz getesteter endokriner Funktionalität keine deutlichen Zeichen von Virilisierung oder Hyperkortisolismus. Mittels Western Blot und immunhistochemisch wurde es für Inhibin A, Keratin 8, Synaptophysin, p53 und für Ki67 mit ca. 60% deutlich positiv getestet, wohingegen Chromogranin, Homatropin-Methylbromid 45 (HMB-45) und das Protein S-100 nicht spezifisch angefärbt wurden. Es wurden ganze Tumorstücke in CB17scid<sup>-/-</sup>-Mäuse implantiert, welche nach der Implantation pathomorphologische Charakteristika des Originaltumors beibehielten. So konnte das SJ-ACC3 als erstes pädiatrisches Tumormodell etabliert werden, das allerdings nicht als Zelllinie propagiert werden kann.

Ein adrenales PDX-Modell mit dem Namen MUC-1 zeigte in der Maus starkes Proliferationsverhalten und verbesserte Anwachsrate und könnte eine Alternative zu den Zellkultur-Xenografts werden [86]. Insgesamt mangelt es bis heute aber weiterhin an Xenograft-Modellen. Auch für Zelllinien gilt, dass es nur wenige für humane NNR-Karzinome gibt. Für die Therapie-Entwicklung müssen weitere suffiziente Modelle etabliert werden, da Zelllinien allein nicht ausreichend für das Erproben neuer Behandlungsstrategien sind [82].

Im Tiermodell werden die Tumorzellen bislang meist subkutan implantiert, da die orthotope Tumorinduktion, unter anderem auf Grund der anatomischen Verhältnisse, komplex ist. In Anlehnung an die vorliegende Arbeit wäre als zukünftiger Schritt denkbar, ein orthotopes PDX-Modell zuerst mit Metastasen eines NNR-Karzinoms, beispielsweise in der Leber zu etablieren. Die Implantation eines Tumorstücks in die Maus wäre in kleineren Organen wie der Nebenniere selbst deutlich anspruchsvoller. Cardoso et al. haben 2010 eine Technik beschrieben, wie die orthotope Implantation von bovinen wie humanen Tumorzellen mittels eines Fibringels gelingt. Dieses Modell mit intraadrenal transplantierten Zellen eignet sich nicht nur, um das Wachstum von Tumorzellen in Rinde und Mark zu untersuchen, sondern bietet auch Gelegenheit, Interaktionen zwischen den beiden Kompartimenten zu erforschen [87]. Unzureichende Möglichkeiten in der Bildgebung erschweren die Optimierung der Modelle. Um die *in vivo* Bildgebung zu erleichtern, wären Tumorzellen geeignet, die kontinuierlich grün-fluoreszente Proteine oder Luciferase exprimieren und dadurch einfacher zu detektieren wären. So würden unter Berücksichtigung der Metastasierung Lymphknoten, Leber, Lunge und Knochen als physiologische Lokalisationen genau betrachtet werden können. Seit einigen Jahren wird an transgenen Mauslinien geforscht, die spontan NNR-Karzinome entwickeln. Neben dem IGF-System, das eine große Rolle im autonomen Wachstum von NNR-Karzinomen spielt [88], kann es auch durch Veränderungen von SF-1 zu Tumoren kommen. 2007 wurde ein Fall eines Tieres mit multiplen Kopien im SF-1-Genlocus beschrieben [89]. Die Vervielfältigung von SF-1 in dessen Genlocus führte nicht nur zu gesteigertem Proteinlevel von SF-1

in der Nebenniere, sondern begünstigte auch die Entstehung makronodulären Gewebes, was letztlich altersabhängig in Nebennierentumoren resultierte [88]. Sowohl unter Berücksichtigung von kindlichen NNR-Karzinomen mit erhöhter SF-1-Expression [90] als auch adulten Patienten, die mit SF-1 assoziiert schlechte Prognosen aufwiesen [91], gibt das transgene Modell Hinweise darauf, dass die Gen-Dosis von SF-1 das NNR-Karzinom phänotypisch begünstigt. Auch in einem Mausmodell mit Telomer-Dysfunktion zeigte sich bei 5% der Tiere mit p53-Haploinsuffizienz die spontane Entwicklung eines NNR-Karzinoms, das zwar keine Metastasen bildete, aber lokal invasiv wuchs und sich in der Histologie als maligne präsentierte [92].

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine große Heterogenität der implantierten NNR-Karzinome, auch unter denjenigen Transplantaten, welche aus einem identischen Ursprungstumor stammen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass gegebenenfalls Gewebstücke unterschiedlicher Tumorregionen unterschiedliches Wachstumsverhalten an den Tag legen. Es bedarf weiterer Untersuchungen bzw. größerer Fallzahlen, um die Heterogenität besser verstehen und berücksichtigen zu können. Komponenten wie Ursprungsort des Tumors, genetischer Hintergrund (siehe Kapitel 4.3.2.), hormonelle Aktivität, Implantationsort und auch Immunkompetenz des Modelltieres sind potenzielle Parameter, die berücksichtigt und/oder verändert werden können. Die genannten Variablen müssen auch im jeweiligen präklinischen Studiendesign für potenzielle Therapiestudien der NNR-Karzinome individuell betrachtet und miteinbezogen werden. Im Rahmen einer Studie mit RNA-knock-down-Mäusen wurde bereits versucht [85], die verschiedenen genetischen Hintergründe der NNR-Karzinome widerzuspiegeln. Studien dieser Art sind zukünftig dringend erforderlich, um prädiktive Aussagen bezüglich der individuellen Karzinome zu machen [86].

#### **4.1.3. Phäochromozytom**

Versuche, Zelllinien humaner Phäochromozytome und Paragangliome zu etablieren, waren bislang wenig erfolgreich, da die Zellen *in vitro* zwar überlebten, aber keine Zellproliferation stattfand. Trotz vielversprechender Ansätze gelang es über 35 Jahre nicht, Zelllinien humaner Phäochromozytome für Zellkultur oder Xenograft-Modelle zu etablieren [4]. Zelllinien sind für Untersuchungen der Tumorgenetik, das Erproben verbesserter bildgebender Verfahren und die Entwicklung neuer Radiotracer dringend erforderlich [93]. Darüber hinaus mangelt es an reliablen Tiermodellen für präklinische Testungen neuer antitumoraler Therapeutika [116], [95]. Aktuell basieren die meisten Zelllinien, bis auf wenige Ausnahmen, auf einem tierischen Hintergrund [96]. Die Mehrzahl der Maus- und Rattenmodelle bringen benigne Phäochromozytome hervor [93], einige wenige Zelllinien malignen Ursprungs sind aber auch in der Literatur beschrieben. Neben der häufig eingesetzten Linie PC12 aus Ratten sind MPC sowie MTT bekannte murine Zelllinien. MTT ging aus Lebermetastasen der

langsamer wachsenden Linie MPC hervor und ist aggressiver. Die MPC-Linie entstammt einem Phäochromozytom, das bei Neurofibromatose Typ 1-knockout-Mäusen auftrat [96], [97] und wurde ursprünglich für ein subkutanes Mausmodell entwickelt [98]. Ein Vorteil der MPC Zellen ist, dass sie humanen chromaffinen Zellen ähneln und die Fähigkeit zur enzymatischen Umwandlung von Noradrenalin in Adrenalin besitzen [96]. MPC und MTT entwickeln im Tiermodell Metastasen. Dadurch können physiologische Veränderungen und Interaktionen erforscht werden, was vor allem interessant ist, seitdem Implantationen in allen Organen gelingen. MPC-Zellen, die in die Schwanzvene von weiblichen Nacktmäusen injiziert wurden, führten in über 90% zu multiplen Herden in der Leber. Biochemische Eigenschaften wie die Expression der Rezeptor Tyrosin-Kinase (Ret) treten bei MPC-Tumoren auf, nicht aber bei der Zelllinie PC12 und sind charakteristisch für zufällig und familiär gehäuft auftretende humane Phäochromozytome [99], [100], [101]. Die Entwicklung von Phäochromozytomen wurde auch in einem transgenen Mausmodell, dem sogenannten  $RET^{MEN2B}$  beschrieben, das den pathogenen Effekt einer spezifischen MEN2B-Mutation untersuchen sollte. Die dafür genutzten Mäuse bildeten neben den Nebennierentumoren gutartige Neuroglia-Tumore im gesamten sympathischen Nervensystem, was dem histologischen Bild des humanen Ganglioneuroms zu entsprechen scheint [102].

Obwohl es bislang nie direkt mit der Entwicklung menschlicher Phäochromozytome in Verbindung gebracht wurde, ist das mutierte PTEN-Gen eine der am häufigsten zu Tumoren führenden genetischen Veränderungen [103]. Einige beschriebene PTEN knock-out-Mausmodelle präsentierten Phäochromozytome in gesteigerter Frequenz. Je nach Mutation entstehen bei den knock-out Mäusen oder Ratten mit hoher Variabilität spontan Phäochromozytome. Auftrittswahrscheinlichkeiten sind zwischen 8 und über 90% beschrieben. Vielversprechend wären Zelllinien aus spontan metastasierenden PTEN knock-out-Mäusen, deren Etablierung bislang allerdings nicht erfolgreich war [93]. Insgesamt werden nur wenige metastasierende Zelllinien beschrieben, die subkutan implantiert wurden [95].

Wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es, ein den GEP-NET und NNR-Karzinomen vergleichbares Tumormodell mit Implantation ganzer Tumorstücke auch für Phäochromozytome zu etablieren: Da es bislang keine humanen Zelllinien gibt, wurde der Schritt der Zellinjektion überschritten und sogleich ganze Tumorzellverbände subkutan implantiert. Die Tumore blieben in der Maus prinzipiell vital. Die Zellproliferation verhielt sich allerdings unterschiedlich. Meist sank diese im Lauf der Nidation ab. In zwei beobachteten Fällen, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht explizit eingegangen wird, stieg sie jedoch an. Diese beiden Fälle sprechen dafür, dass Zellproliferation prinzipiell *in vivo* stattfinden kann, was bislang *in vitro* nicht gelungen ist (wie zu Beginn beschrieben). Ein PDX-Modell für Phäochromozytome könnte langfristig also ein probates Modell für die Untersuchung der

Zellproliferation darstellen. Ebenso die Expression von ChrA wurde nach dem Verbleib in der Maus meist deutlich geringer gemessen; im Falle einer Metastase stieg ChrA aber deutlich an. Um das jeweilige Verhalten der untersuchten Parameter besser einschätzen zu können, bedarf es weiterer, größerer Fallzahlen.

Auch sind Metastasierungsmodelle und bildgebende Verfahren für weitergehende Untersuchungen erforderlich, welche es ermöglichen, das Verhalten des Tumors *in vivo* zu beobachten. Ein interessantes Mittel zur Untersuchung des (Metastasierungs-) Verhaltens der murinen Zelllinien sind neue Techniken der Visualisierung. Giubellino et al. untersuchten ein Mausmodell, in welchem sie Luciferase-getaggte Tumorzellen in die Schwanzvene der Maus injizierten und eine Biolumineszenz-Analyse durchführten. Das stärkste und reproduzierbare Signal kam aus der Leber; histopathologische Untersuchungen konnten das Vorhandensein von Mikro- und Makrometastasen bestätigen. In einem zweiten Versuch mit subkutan implantierten Zellen konnten Mikrometastasen auch in der Lunge detektiert werden [95]. Die Lungen, welche am beständigsten von subkutan implantierten MTT-luc-Zellen befallen waren, weisen auch bei humanen Phäochromozytomen häufig Metastasen auf [95], [104]. Subkutane Tumore sind zwar einfach zu monitoren, geben aber das Mikromilieu des Tumors im tierischen oder humanen Körper nicht ursprungsgetreu wider. Um die Tumorbilogie, die Reaktion auf verschiedene Behandlungen und die Toxizität nach unterschiedlicher Medikamentengabe zu untersuchen, sind Metastasierungsmodelle zu bevorzugen [93].

Konventionelle wie funktionelle Bildgebung zur Quantifizierung der totalen Tumorlast von Metastasen stellt, vor allem in kleinen Tieren, eine weiterhin zeitintensive Herausforderung dar [96]. Mikro-Computertomografen (Mikro-CT) für Kleintiere können Tumore im Tier gut lokalisieren und das Tumorwachstum mit exzellenter räumlicher Auflösung überwachen [93]. Die Kernspintomographie benötigt beispielsweise in der T2-Wichtung kein Kontrastmittel zur genauen Darstellung von Weichteiltumoren und kann eine Ganzkörperaufnahme in weniger als fünf Minuten generieren, was im Umgang mit den Versuchstieren einen Vorteil gegenüber den Mikro-CT bietet. Die Tumorphysiologie kann aber nach wie vor durch keines der zur Verfügung stehenden Verfahren umfassend dargestellt werden [105]. Unter den verschiedenen bildgebenden Techniken scheint für den Gebrauch der *in vivo* Modelle die Biolumineszenz zur Detektion kleinster Residuen jedoch besonders geeignet [95].

Zur Unterscheidung benignes versus malignes Phäochromozytom wurde 2002 von Thompson der sogenannte PASS-Score (Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score) entwickelt, der 12 Parameter beinhaltet. Dieser generiert sich aus morphologischen Merkmalen, unter anderem aus im Tumor gebildeten Nestern und untypischen Mitosefiguren, Invasion in das benachbarte Gewebe, das Gefäßsystem oder die Kapsel (weitere Kriterien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet). Bei einem

Wert  $\geq 4$  kann von einem biologisch aggressiven Verhalten, bei Werten  $< 4$  von Benignität ausgegangen werden. Nicht alle in diesem Score enthaltenen Kriterien wurden bislang in unserem Modell untersucht. Auf Grund der künstlich hergestellten Situation mit Verbleib in einem nicht original-getreuen Mikromilieu könnten andere Ergebnisse festgestellt und dadurch falsche Rückschlüsse gezogen werden. Bereits in der Basischarakterisierung von Patiententumoren hat sich der PASS-Score als wenig geeigneter Parameter zur Dignitätsbeurteilung erwiesen [93]. Es ist demnach wahrscheinlich, dass der PASS-Score in einem PDX-Modell durch weitere schwer vorhersagbare Bedingungen noch weniger reliabel ist. Im Vergleich zu diesem in seiner Aussagekraft schwachen Kriterienkatalog könnte das von uns eingesetzte PDX-Modell mit dezidierten, funktionellen Charakterisierungen langfristig von Nutzen sein, um die Dignität und die sich daraus erschließende Prognose von Patiententumoren einzuordnen.

<b>PASS: Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score</b>	<b>Punkte</b>
Große Nester mit diffuser Größe (> 10%)	2
Zentrale oder konfluierende Tumornekrose	2
Hohe Zellularität	2
Zelluläre Monotonie	2
Zellspindeln	2
Mitosefiguren (> 3/HPF)	2
Atypische Mitosefiguren	2
Ausbreitung in umliegendes Fettgewebe	2
Gefäßinvasion (und Gefäßdichte)	1
Kapselinvasion	1
Ausgeprägter Pleomorphismus der Zellkerne	1
Zellkern-Hyperchromasie	1

**Tabelle 20: PASS: Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score; zur Differenzierung benigne versus maligne; adaptiert nach [66], [63]**

## **4.2. Immunhistochemische Charakterisierung**

Intratumorale Heterogenität bezeichnet die Koexistenz unterschiedlicher Merkmale zwischen einzelnen Tumorzellen, was am besten mittels histochemischer und immunhistochemischer Techniken gezeigt werden kann. Immunhistochemische Färbungen dienen neben der Differenzierung

einzelner Tumortypen [106] unter anderem auch dazu, Expression von bestimmten Markerproteinen in ihrer Lokalisation in der Zelle (z.B. membranständig vs. zytoplasmatisch) darzustellen. Es können somit nützliche Biomarker sichtbar gemacht und dadurch auf spezifische Charakteristika der einzelnen Tumorentitäten geschlossen werden, insbesondere auf die Aggressivität des Tumors und das Metastasierungsverhalten. Ein Vorteil klinisch nützlicher Biomarker (humorale und genetische Marker sowie immunhistochemische Färbungen) ist, dass deren Untersuchung bzw. Bestimmung verhältnismäßig einfach in zertifizierten Laboren durchgeführt werden kann [107]. Trotz der zunehmenden Relevanz molekularer Analysen basieren die meisten „individuellen“ Therapieansätze derzeit auf immunhistologischen Phänotypisierungen [106]. Um einen potenziellen Bias möglichst zu minimieren, werden Färbungen häufig im Vergleich zur Kontrolle hinsichtlich der Färbeintensität in niedrig, mittelgradig und stark beurteilt [106]. Ein wichtiges Ziel ist, dass Möglichkeiten erarbeitet werden, verschiedene IHC-Protokolle zwischen den untersuchenden Laboren noch besser zu standardisieren und dass klinisch-pathologische Validierungen durch randomisierte Multicenter-Studien erfolgen [32].

#### **4.2.1. Proliferationsmarker**

Proliferationsmarker stellen wichtige Diagnose-, Differenzierungs- und Prognosemerkmale dar. Es wird postuliert, dass insbesondere Ki67 als „Hauptvertreter“ baldmöglichst und flächendeckend in die Standard-Diagnostik von Tumorerkrankungen aufgenommen werden sollte [32], [59]. Ki67 ist paraffingängig und eignet sich für die Detektion sowohl in humanem als auch in murinem Gewebe. Die Durchführung der Ki67-IHC war im Rahmen dieser Arbeit also naheliegend. Unter anderen Markern wie beispielsweise EGFR, MCM-2 oder PCNA [108] wird Ki67 bereits jetzt am häufigsten in der klinischen Praxis eingesetzt, auch in unserem Labor, um den jeweiligen Proliferationsindex zu ermitteln. Dabei ist die eigentliche Funktion des Proteins Ki67 noch ungeklärt. Da es im Zellzyklus nur während der aktiven Phasen exprimiert wird und nicht in ruhenden Zellen zu finden ist [109], kann es nicht nur als Proliferations-, sondern auch als Vitalitätsmarker verstanden werden. Am besten belegt ist die Validität von Ki67 für das Prostata- und das Mammakarzinom; damit zeigt sich, dass der Marker nicht Entitäten-spezifisch, sondern allgemein bei Tumorerkrankungen aussagekräftig ist. Da sich der Ki67-Index auf einen physiologischen Parameter bezieht, kann dessen Auswertung den besten Einblick in das Wachstumsverhalten, die Suszeptibilität gegenüber bestimmten Therapeutika und das Outcome einer Tumorerkrankung geben und ist somit valider als die Beurteilung des Wachstums auf Grund einer theoretischen Einschätzung [32]. Allerdings bezieht sich auch der Ki67-Index derzeit nur auf die Anzahl proliferierender Zellen, ohne die Zeitspanne zu berücksichtigen, die ein intermitotischer Zyklus dauert. Bislang können demnach keine Angaben zur Proliferationsrate gemacht werden. Ein zusätzlicher Marker wäre wünschenswert, was hoffentlich im Rahmen von

Multiparameter-Analysen gelingen wird, um die Proliferation und das Tumorwachstum noch besser analysieren zu können. Darüber könnte nicht nur die Prognose präzisiert, sondern schon eine „Vorauswahl“ einer individualisierten Therapie getroffen werden. Immerhin gelingt es durch das Ki67-staining, Zellen in allen Phasen des Zellzyklus zu berücksichtigen, was dem bloßen Auszählen mitotischer Figuren klar überlegen ist und die Sensitivität dieses Verfahrens erhöht [32].

Im klinischen Kontext wird der Ki67-Index wie folgt eingesetzt: Ab einem Index von mindestens 10% sind die Angaben für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben im Falle des NNR-Karzinoms signifikant schlechter [110]. Sofern alle Kriterien des Stagings und der Tumorgrad bekannt sind, gilt der Ki67-Index als unabhängiger und signifikanter Prognosefaktor [32]. In der vorliegenden Arbeit lagen die Daten zur Graduierung der einzelnen Tumore nicht in jedem Fall vor. Standardisierte Angaben bezüglich der pathologischen Befunde wären langfristig wünschenswert, insbesondere, um die Ergebnisse beispielsweise des Ki67-Index als verlässlichen Prädiktor einsetzen zu können. Obwohl die Etablierung spezieller, beispielsweise prognostischer Scores wichtig erscheint, gibt es für den Einsatz von Ki67 allein bislang keinen bedeutenden klinischen Nachteil im Vergleich zu einer Kombination aus Tumorgröße, venösem Tumorthrombus (VTT) und Ki67 [59]. Auch bezüglich der Rezidivbildung nach Radiation kann der Ki67-Index als prädiktiver Marker von Adenokarzinomen herangezogen werden [32]. Ki67 und der mitotische Index haben vergleichbare Endpunkte in der Tumor-Pathophysiologie, was die Relevanz der Mitoseanzahl als Zusatzmittel in der Diagnostik verdeutlicht [59]. Neben dieser prognostischen Fähigkeit kann Ki67 auch dazu genutzt werden, benigne von malignen Tumoren zu unterscheiden; beispielsweise wird Ki67 gemeinsam mit IGF2 eingesetzt, um das NNR-Karzinom vom adrenokortikalen Adenom abzugrenzen [110]. Hohe Ki67-Indices in adrenalem Gewebe sind vor allem in nicht-funktionellen NNR-Karzinomen zu finden. Diese Tatsache legt nahe, dass hormonell inaktive NNR-Karzinome schneller wachsen und aggressiver sind als ihre Hormon-produzierenden Counterparts [103].

#### **4.2.2. Marker für neuroendokrine Tumore**

Für die heterogene Gruppe neuroendokriner Tumore gibt es eine Vielzahl potenzieller Untersuchungsmerkmale. ChrA wird in der Immunhistochemie genutzt, um die Aktivität neuroendokriner Zellen darzustellen. Dieses hydrophile, saure Protein kommt natürlicherweise in den chromaffinen Granula neuroendokriner Zellen vor. ChrA ist somit ein universeller Marker neuroendokrinen Gewebes, dessen Expression vom Zelltyp und der vorherrschenden Anzahl an Sekretgranula in der jeweiligen Zelle abhängt [112]. Bei bestimmten Tumoren wie verschiedenen GEP-NET, Merkelzell-Karzinomen der Haut, Phäochromozytomen oder Neuroblastomen können gesteigerte Serumwerte für ChrA gemessen werden [113]. Somit kann ChrA für diese Tumor-

Entitäten als fluider Tumormarker herangezogen werden. Als paraffingängig und sowohl in humanem wie murinem Gewebe in der IHC sichtbar eignete sich ChrA für die vorliegende Arbeit. In einer Arbeit zum lokal fortgeschrittenen oder metastasierten endokrinen Pankreaskarzinom wurde die Assoziation zwischen ChrA-Reduktion im Serum und positivem Reaktionsverhalten des Tumors auf Chemotherapeutika betont, was die zusätzliche Eignung dieses Markers als Verlaufsparemeter darstellt [114]. ChrA kann im Falle von metastasierten, aber noch gut differenzierten GEP-NET sowohl über die Tumormast als auch über die funktionelle Aktivität Aufschluss geben. Eine positive Korrelation mit dem Gesamtüberleben wurde im Rahmen univariater Analysen beschrieben [115].

Neben ChrA sollten weitere Sekretionsprodukte funktioneller GEP-NET und Tumormarker wie Synaptophysin, NSE und CEA untersucht werden. Beim diagnostischen Einsatz des Enzyms NSE als bekanntestem zytosolischem Marker muss bedacht werden, dass dieses auch in nicht neuroendokrinen Gewebe wie der gestreiften Muskulatur positiv sein kann [112]. Das gilt ebenso für ein neurales Zelladhäsionsmolekül, kurz NCAM (neural cell adhesion molecule) oder CD56 genannt, was neben neuroendokrinen Gewebe ebenfalls in gestreifter Muskulatur, aber auch in Gliazellen und natürlichen Killerzellen auftritt.

Zusätzlich können Somatostatin-Rezeptor-Subtypen als Prognosefaktor und zur Differenzierung zwischen gastrointestinalen und pankreatischen Tumoren herangezogen werden. Die Charakterisierung des Somatostatin-Rezeptor Status ist auch aus therapeutischen Aspekten interessant, da so das potenzielle Ansprechen auf Somatostatin-Analoga voruntersucht werden könnte [116]. Ein weiteres Beispiel zur Differenzierung der GEP-NET mittels IHC stellt die p16-Färbung dar, die ausschließlich bei pankreatischen neuroendokrinen Karzinomen (pNET) positiv ausfällt [36]. Darüber hinaus wurden Tumorsuppressorgene und potentielle Onkogene beschrieben, beispielsweise vermehrt exprimierte Src-ähnliche Kinasen oder Cyclin D1 (CCND1), die bei der Entstehung des pNET eine Rolle spielen und mittels IHC dargestellt werden können [117]. In gastrointestinalen Karzinoiden kann auch CDH1, das E-Cadherin kodiert, in der immunhistologischen Färbung dargestellt werden, welches bei dieser Tumorart oft reduziert erscheint [36].

Bei der Betrachtung von Phäochromozytomen stellt sich die Situation etwas diffiziler dar. Für diese Entität gibt es im Vergleich zu anderen Tumortypen nur wenige geeignete Färbemethoden, darunter SDHA und SDHB, insbesondere bei Paragangliomen. Die Unterscheidung in benigne versus maligne kann also kaum durch histologische Untersuchungsprofile unterstützt werden. Insofern sollten zumindest der biochemische Phänotyp analysiert und eine Immunhistochemie von SDHB und SDHA durchgeführt werden. Dadurch würde das genetische Screening vereinfacht, indem im Vorfeld Gene für die Mutationsanalyse bestimmt wären. So könnten durch die IHC von SDHA, MAX oder S-(2-

Succinyl) Cystein Rückschlüsse auf genetische Veränderungen von SDHA, MAX oder FH gezogen werden [118].

Bei den häufiger untersuchten neuroendokrinen Markern ChrA, Synaptophysin und NSE sei darauf hingewiesen, dass ChrA der einzige dieser drei Parameter ist, der beim Phäochromozytom, nicht aber beim NNR-Karzinom positives Reaktionsverhalten in der IHC zeigt. ChrA eignet sich somit besonders, zwischen Phäochromozytomen und NNR-Karzinomen zu unterscheiden, während Synaptophysin und NSE nicht das gleiche Ausmaß an Spezifität zeigen [56].

### **4.2.3. Marker für NNR-Karzinome**

Für die adrenale Tumor-Differenzierung kann SF-1 immunhistochemisch eingesetzt werden. SF-1 weist eine hohe Spezifität und Sensitivität auf und eignet sich klinisch als Stadien-unabhängiger Prognose-Parameter [91]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde SF-1 ausgewählt, da dieser Marker paraffingängig und sowohl für humane als auch murine Tumormodelle geeignet ist. SF-1 ist ein nukleärer Rezeptor und als Transkriptionsfaktor neben der Kontrolle über die Steroidogenese bei der sexuellen Entwicklung und Reproduktion von Schlüsselgenen beteiligt [119].

NNR-Karzinome weisen in der IHC auch im p53-staining oft Veränderungen auf [120]. Die meisten NNR-Karzinome zeigen hier ein positives Reaktionsverhalten. Differentialdiagnostisch ist die Untersuchung dieses Parameters nützlich, da Adenome, unabhängig vom funktionellen Status, keine positive Anfärbung zeigen. Bei Karzinomen hingegen werden erhöhte Expressionslevel von p53 vor allem in nicht-funktionellen und Androgen-produzierenden Tumoren beobachtet [111]. Ein anderer interessanter Marker in Diagnostik und Management des NNR-Karzinoms ist die Expression des FSH-Rezeptors. In der Literatur wird einerseits eine starke Anfärbung der Epithelien intratumoraler Blutgefäße beschrieben. Andererseits wurde eine deutliche Reaktion auch in Zellmembranen von gesundem Gewebe detektiert, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass keine Korrelation zwischen der Expression des FSH-Rezeptors und dem Stadium der Tumorerkrankung existiert. Die Rolle der FSH-Rezeptor-Expression, beispielsweise die Stimulation der Angiogenese bedarf weiterer Studien [121]. Die Angiogenese an sich stellt ein zusätzliches Feld dar, das es zu untersuchen lohnt. Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD31, auch PECAM-1 genannt, ist unter anderem an der Angiogenese beteiligt. Die Etablierung eines funktionierenden Färbeprotokolls für diesen zentralen Marker wird die individuelle Charakterisierung von NNR-Karzinomen und deren Modellen deutlich verbessern. Im Blut von Patienten mit NNR-Karzinom wurden auch erhöhte Spiegel von VEGF gefunden, was einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt [121].

Zur Diagnosesicherung bzw. zum Ausschluss einer spezifischen Tumorerkrankung gibt es neben ChrA verschiedene Marker, die herangezogen werden können. Dazu zählen im Falle des NNR-Karzinoms D11, Inhibin- $\alpha$  sowie Melan A, ein Produkt des MART-1-Gens. Neuere Marker wie überexprimiertes IGF-II, Cyclin E oder LOH im Bereich von 17p13 dienen der Diskriminierung zwischen benignen und malignen Tumoren [5]. Durch Immunhistochemie konnte in Zellen der Nebenniere auch eine Anhäufung von  $\beta$ -Catenin dargestellt werden [120], was durch Genanalysen für das NNR-Karzinom, nicht aber in NNR-Adenomen bestätigt werden konnte [122].

Zukünftig von großem Nutzen kann die Kombination gewonnener Daten aus IHC und Gewebe-Microarrays (TMA) sein. Daraus lassen sich gegebenenfalls Angaben zum Outcome hinsichtlich des Überlebens nach erfolgter chirurgischer Intervention des NNR-Karzinoms generieren. Bereits im Vorfeld identifizierte dysregulierte Gene des NNR-Karzinoms wurden mittels TMA und IHC validiert, um neue Expressionssignaturen zu identifizieren.

Neue Biomarker, die die Prognose mitbestimmen könnten, sind unter anderem TOP2A, was den Zellzyklus kontrolliert und das an der Transkription beteiligte EZH2, die beide eine schlechte Prognose implizieren. Dazu scheint eine erhöhte Expression von BARD1, was geschädigte DNA repariert, mit einem besseren Gesamtüberleben vergesellschaftet zu sein. Es bleibt zu hoffen, dass diese Biomarker bei der Etablierung zusätzlicher Behandlungsregime helfen oder potenzielle Ansätze gerichteter Therapien generieren können. Gerade auch die Kombination mit molekulargenetischen Studien bzw. weiteren „omics“-Ansätzen kann hierfür hilfreich sein (siehe Kapitel 4.3.).

### **4.3. Weitere Ansätze individueller Tumorcharakterisierung**

Auf Grund der häufig frustranen Prognosen aller hier besprochenen Entitäten ist eine weitergehende Charakterisierung für diese insgesamt verhältnismäßig seltenen Tumore dringend erforderlich. Schon aus der geringen Inzidenz für jede der drei Gruppen geht hervor, dass verwertbare Gewebeproben nur in geringer Anzahl zur Verfügung stehen. Insofern werden der Austausch und das übergreifende Arbeiten zwischen den einzelnen spezialisierten Zentren in Zukunft immer wichtiger sein. Da bis heute viele Modelle mit Zelllinien arbeiten, die nur partiell spezifische Charakteristika berücksichtigen, ist die vorliegende Arbeit ein erster Schritt, auf individuelle Tumoreigenschaften einzugehen und damit spezifisch beurteilen zu können. Die Heterogenität der drei Tumorentitäten bleibt weiterhin eine der größten Herausforderungen. Zwischenzeitlich gibt es mehrere neue und vielversprechende Ansätze insbesondere aus dem Feld der Molekularbiologie, die Heterogenität durch spezielle Marker zu erkennen und die Tumorentitäten zu speziellen Untergruppen zu kategorisieren. Dazu gehören Genanalysen und Genexpressionsstudien, bei denen teils das gesamte Transkriptom einer Tumorzelle berücksichtigt wird. Im Rahmen dieses Kapitels soll auf einen

Ausschnitt dieser Techniken eingegangen und diskutiert werden, inwiefern sie Erkenntnisse aus den Tumormodellen ergänzen können beziehungsweise welche Limitationen die Techniken mit sich bringen.

Zentral in der Analyse von genetischem Material steht die gezielte Untersuchung somatischer Mutationen sowie die Sequenzierung von größeren Abschnitten bis hin zum kompletten Genom, um beispielsweise Aufschluss über SNPs (Single Nucleotide Polymorphismen), Copy Number-Variationen und INDELS zu erhalten. Insgesamt werden teils schon etablierte Techniken wie PCR eingesetzt, gleichzeitig ermöglichen moderne Verfahren wie das „Next Generation Sequencing“ die Analyse von Exomen oder auch dem gesamten Genom. Dabei laufen viele Sequenzierreaktionen gleichzeitig ab, wodurch diese Technik in hohem Durchsatz durchführbar ist. Mittlerweile wurden auf diese Weise mehrere Tausend Genome verschiedener Untertypen humaner Tumore untersucht. Durch diese Studien konnten Tumortyp-spezifische, „genetische Landschaften“ beschrieben werden [123], [36].

Auch Genexpressionsstudien an Tumoren wurden grundlegend weiterentwickelt und durch die Möglichkeit ergänzt, das gesamte Transkriptom zu analysieren. Die lange etablierten Techniken wie Northern-Blot, quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) oder In-situ-Hybridisierung wurden um DNA-Microarrays (Biochips) erweitert, wobei viele Transkripte parallel bestimmt werden können. Mittels dieser Microarrays können nur bekannte Genprodukte analysiert werden; dafür ist diese Technik sehr zeiteffizient. Neueste Entwicklungen brachten die „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“, (kurz RNA-Seq) hervor, die ebenfalls noch kompliziert in der bioinformatischen Auswertung ist.

Auch im Feld der Protein-Analyse gibt es verschiedenste traditionelle sowie modernste Techniken, welche es dem Untersucher ermöglichen, sich einen Überblick über das Proteom der Tumorzelle zu verschaffen. Western-Blot, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und Radioimmunassays stellen bewährte Techniken dar. Auch für die automatisierte Proteinanalyse gibt es Biochips, in diesem Fall Protein-Microarrays. Weitere Analyseverfahren umfassen die Massenspektrometrie, welche eine Vielzahl an Proteinen zuverlässig und eindeutig anhand deren einzigartigen Peptide identifizieren und durch unterschiedliche Verfahren (wie SILAC, ICAT, TMT und iTRAQ) auch quantifizieren kann. Mit dieser Technik werden sowohl gezielte Proteinanalysen als auch „Shotgun-Approach“, d.h. die breite Suche nach proteinischen Biomarkern und „Fingerprints“ möglich. In der momentanen „Post-Genom-Ära“ kann die Proteomik aus Genexpressionsanalysen gewonnene Daten ergänzen und weitere Informationen über Stoffwechselwege und molekulare Regelkreise liefern.

Insgesamt konnten in anderen Feldern durch den Erkenntnisgewinn aus Genanalysen und Transkriptomstudien die Tumorbilogie besser verstanden und Tumor-Klassifikationsschemata sowie

das Patientenmanagement optimiert werden. Das sich rapide weiterentwickelnde Feld der „omics“-Analysen wird sicherlich auch in der Zukunft dazu dienen, neue Erkenntnisse, speziell bezüglich der Heterogenität verschiedener Tumorentitäten zu liefern. In den folgenden Unterkapiteln soll ein kurzer Blick auf den Stand der genetischen und Expressionsanalysen geworfen und beleuchtet werden, inwiefern sich funktionelle, klinische Endpunkte in den daraus resultierenden Tumor-Untergruppen unterscheiden. Das in dieser Arbeit etablierte PDX-Modell wäre eine Möglichkeit, zukünftig solche definierten Untergruppen auf deren Therapieansprechen zu testen.

#### **4.3.1. GEP-NET**

Das Wissen über die zelluläre und molekulare Biologie der GEP-NET war lange vor allem auf Grund der geringen Inzidenz weniger fundiert als das anderer Tumorarten. Durch moderne Techniken wie die „Next Generation“ DNA-Sequenzierung bessert sich das Verständnis nachhaltig [36]. So wurden in den letzten Jahren erstmals Details über das genetische Profil gut differenzierter pNET, wenig differenzierter pNEC und NET des Dünndarms veröffentlicht [124]. Diese Ergebnisse wurden um Aspekte der Epigenetik inklusive veränderter, Tumor-typischer DNA-Methylierung, modifizierter Histonproteine und Expression nicht kodierender RNA, beispielsweise microRNA (miRNA) erweitert. Diese Studien beschreiben, dass spezifische genetische und epigenetische Veränderungen mit klinisch relevanten histopathologischen Tumorcharakteristika (z.B. Tumorgroße, Stadium, anatomische Lage und klinisches Outcome) assoziiert sind. Ziel dieser Anstrengungen ist es, systemische Therapeutika gezielter einzusetzen oder auch neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden. Trotz guter Evidenz für einige Schlüsselgene, die sich in veränderten Chromosomenregionen der GEP-NET befinden, bleibt es bislang eine Herausforderung, weitere noch unentdeckte verantwortliche Zielstrukturen zu identifizieren [36].

Ein gutes Beispiel für das Zusammenspiel verschiedener molekulargenetischer Studien zur Etablierung eines möglichen prognostischen Biomarkers ist die Identifizierung des ALT- (alternative lengthening of telomeres) Phänotyps: die wachstumsbedingte Abnahme der telomeren DNA stellt ein wichtiges Element für Kontrollstellen dar, welche die Proliferation größer werdender Zellklone irreversibel blockieren, indem ein Stadium zellulärer Seneszenz initiiert wird. Die Mehrzahl humaner Tumorarten übergeht diesen Proliferationsblock durch Telomer-spezifische DNA-Polymerase, die sogenannte Telomerase. Ein geringer Teil aller Tumore nutzt einen alternativen, Telomerase-unabhängigen Mechanismus, die sogenannte ALT. Diese wird häufig in nicht-epithelialen Tumoren wie pNET, Sarkomen oder ZNS-Tumoren entdeckt. Ebenso korrelieren Mutationen in den sogenannten ATRX- oder DAXX-Genen gut mit einem ungewöhnlichen Telomer-Phänotyp und ALT-Positivität [125], [36]. Allerdings wurden ATRX- sowie DAXX-Mutationen bislang nur in pNET

beschrieben, welche ein höheres Grading und einen Durchmesser größer als 3cm zeigten, was auf ein spätes Auftreten in der Tumorgenese hinweisen könnte. Interessanterweise haben Patienten mit ALT-Phänotyp oft ein besseres Outcome als Patienten, deren Tumore Telomerase-positiv sind. Das bessere Therapieansprechen der ALT-positiven Tumore stellt somit einen klinisch wertvollen Biomarker dar. Ansätze dieser Art werden in der Zukunft eine zunehmende Rolle einnehmen, da sie potenziell eine eigene Entität definieren, welche im in dieser Arbeit beschriebenen Tumormodell weiter charakterisiert und therapeutisch getestet werden könnte. Auch die gezielte Nutzung dieses mechanistischen Wissens für selektive zytostatische Therapie ist eine zukünftige Möglichkeit, welche weiter experimentell mittels Drugscreens an ATRX/DAXX-defizienten Zelllinien verfolgt werden könnte.

In Genom-weiten Studien konnten verschiedene Assoziationen zwischen genetischen Veränderungen und dem klinischen Erscheinungsbild festgestellt werden. SNP-Analysen ergaben, dass die Anzahl genetischer Imbalancen mit der Tumorgroße von pNET einhergehen. Eine positive Korrelation wurde mittels vergleichender Genom-Hybridisierung auch zwischen Anzahl chromosomaler Veränderungen und Metastasen gesehen. Heterozygotie-Verlust und Aneuploidie wurden zusätzlich als unabhängige Prognosefaktoren ermittelt. Hinsichtlich genetischer Veränderungen wurden auch funktionelle und nicht-funktionelle pNET untersucht und gegenübergestellt. Es wurden signifikante Unterschiede mit der zweifachen Anzahl an Veränderungen bei nicht-funktionellen pNET im Vergleich zu funktionellen Tumoren beschrieben [36].

Neben DNA-basierten Modifikationen könnten epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. Um epigenetische Untersuchungen durchzuführen wurde die DNA-Methylierung von GEP-NET betrachtet. Globale Analysen des Methylierungsstatus verschiedener repetitiver Sequenzen, welche über das gesamte Genom weit verbreitet sind, ergaben, dass speziell diese Regionen in der Mehrzahl der GEP-NET im Gegensatz zu benachbarten Strukturen hypomethyliert sind und die Hypomethylierung mit klinisch-pathologischen Parametern wie der Tumoreinteilung korrelieren. Ein ebenfalls häufig vorkommendes Phänomen in der DNA-Methylierung ist der „CpG island methylator-Phänotyp“, kurz CIMP. Die abnorme Methylierung der CpG-Inseln (candidate plasticity-related genes-Inseln) geht mit bekannten Tumorsuppressorgenen einher und zeigt eine signifikante Assoziation mit Ki67. Klinisch geht das Methylierungsprofil häufig, vor allem wenn viele Gene betroffen sind, mit einem frühen Rezidiv und geringer Überlebenschance nach operativer Tumorentfernung einher. Schließlich gibt es eine Vielzahl an Tumor-bezogenen Kandidaten-Genen, deren Promoter-Regionen diverse Hypermethylierungen aufweisen.

Zusammenfassend kann das molekularbiologische Verständnis für GEP-NET seit einigen Jahren durch die modernen Hochdurchsatz-Techniken kontinuierlich verbessert werden. Weitere Felder wie das Proteom und das Transkriptom liefern in der Zukunft hoffentlich zusätzliche Krankheits-relevante molekulare Veränderungen. Im Bereich des intestinalen NET, der annähernd frei von sich wiederholenden Genmutationen zu sein scheint, könnten durch die komplette Genomsequenzierung und genomweite epigenetische Untersuchungen neue Informationen gewonnen werden. Auch die Etablierung neuer Zelllinien, die für GEP-NET bislang äußerst diffizil ist, könnte mittels Einbeziehung gewonnener Erkenntnisse gelingen und so das Testen neuer Wirkmechanismen erleichtert werden [36].

#### **4.3.2. NNR-Karzinom**

Zu den NNR-Karzinomen wurden in den letzten Jahren sowohl Sequenzierungsstudien durchgeführt als auch komplette Genexpressionsprofile erstellt. Insgesamt wurden durch Exom-Sequenzierung 125 Mutationen identifiziert und 42 Varianten durch gezielte Sequenzierung entdeckt. Alle Mutationen in den Schlüsselgenen wurden validiert [126]. Zusätzlich zu Mutationen im MEN1-Gen werden mutierte DAXX und ATRX-Gene beschrieben, was mit dem ALT-Phänotyp assoziiert zu sein scheint (siehe 4.3.1) [125]. Für einen umfassenden Überblick des NNR-Karzinom-Genoms haben Assié und Kollegen DNA-Methylierungen, mRNA- und miRNA-Expressionen untersucht [126]. Mittels RPMM (recursively partitioned mixture) [127] wurden vier Tumormuster identifiziert, die auf DNA-Methylierungen basieren. Zwei dieser Tumormuster ähneln sogenannten CIMP-Untergruppen (hoher und niedriger CpG island methylator-Phänotyp) [128], verbunden mit einer schlechten Prognose [126]. Cluster-Analysen bei Expressionsmustern von mRNA ergaben, dass es zwei Hauptcluster für die Transkription gibt, die stark mit dem Überleben korrelieren: die aggressive C1A-Gruppe mit schlechter Prognose zeigte viele Mutationen und veränderte DNA-Methylierungen, wohingegen die benigne C1B-Gruppe mit guter Prognose spezifische Deregulationen bei zwei miRNA-Clustern präsentierte [144], [122]. C1A-Tumore konnten wiederum in drei Untergruppen unterteilt werden, welche deutlich mit den DNA-Methylierungsmustern assoziiert sind. Aggressive und indolente NNR-Karzinome beziehen sich demnach auf zwei unterschiedliche molekulare Gruppen mit unterschiedlichen Veränderungen in den Onkogenen [126].

Genexpressionsanalysen konnten in der Vergangenheit bereits mechanistische Einblicke ermöglichen. So wurde beispielsweise in etwa 90% eine hohe Expression von IGF2 im Vergleich zu Adenomen bei NNR-Karzinomen festgestellt, eine veränderte IGF2-Expression sogar als eines der dominantesten Transkriptom-Ereignisse im NNR-Karzinom gezeigt [120]. IGF2 wirkt durch den IGF1- und den Insulin-Rezeptor, um eine Signalkaskade anzustoßen, welche Proliferation und Migration

anstößt. Erstaunlicherweise ist der IGF1-Rezeptor, der *in vivo* für die meisten zellulären Effekte verantwortlich ist [129], im IGF2-überexprimierenden NNR-Karzinom nicht herunterreguliert. Aus diesen molekulargenetischen Daten haben die Erkenntnisse zu neuen Therapiemöglichkeiten geführt [120]. Zwei präklinische Studien konnten die Auswirkung dieses Weges in der Tumorgenese des NNR-Karzinoms zeigen [130], [83] und eine internationale klinische Studie zur Blockade des IGF1-Rezeptors wurde bereits durchgeführt. Diese konnte allerdings in dem untersuchten Kollektiv keine Verbesserung des Überlebens erzielen [131]. Dieses negative Outcome fördert jedoch die Hypothese, dass mittels Genexpressionsanalysen individuelle Patientengruppen identifiziert werden könnten, bei welchen die Therapie dennoch einen deutlichen Effekt zeigen könnte. Einer solchen Studie könnte zukünftig eine präklinische Testung im Mausmodell vorangehen.

Neben der IGF2-Expression spielen das Tumor-Suppressorgen TP53 sowie der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese. Etwa ein Viertel der sporadischen NNR-Karzinome bei Erwachsenen weist eine somatische TP53-Mutation auf [132]. In Studien über das familiäre NNR-Karzinom wurden TP53-inaktivierende Mutationen und eine gesteigerte IGF2-Expression als Schlüsselereignis identifiziert [133]. Wie schon im ersten Teil der Diskussion erwähnt, können Veränderungen des Proteins p53 auch durch immunhistochemische Färbungen deutlich gemacht werden. Mittels einer Cluster-Analyse konnte gezeigt werden, dass TP53-Mutationen in einer Untergruppe von NNR-Karzinomen gehäuft auftreten [134], welche zu den aggressiven NNR-Karzinomen zählen. Wie schon für p53 beschrieben scheinen auch die Veränderungen im Wnt/ $\beta$ -Cateninweg eine zentrale Rolle einer Untergruppe der NNR-Karzinome innezuhaben und treten ebenfalls erst spät in der Tumorentstehung auf [120], [134]. Es wird angenommen, dass sich p53 und  $\beta$ -Catenin-Mutationen in aggressiven NNR-Karzinomen gegenseitig ausschließen und damit für die Einteilung in zwei unterschiedliche Subgruppen geeignet sind [120]. Interessanterweise wurde in den letzten Jahren eine dritte Untergruppe entdeckt, die weder p53 noch  $\beta$ -Catenin in mutierter Form präsentiert und dennoch eine schlechte Prognose aufweist [134]. Insgesamt wurde eine höhere Anzahl an Mutationen mit einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate, einem höheren Weiss Score sowie einer höheren ENSAT-Stadieneinteilung assoziiert [126]. Das gesamte Spektrum der Mutationen für NNR-Karzinome ist allerdings weiterhin nicht vollständig bekannt [120].

Moderne Methodik wie Transkriptom-Analysen stellen nicht nur für therapeutische Überlegungen oder mechanistische Einblicke wichtige Daten bereit, gerade auch die klinische Prognose könnte stark davon profitieren. Die Stadieneinteilung stellt aktuell den stärksten prognostischen Prädiktor dar. Allerdings variiert das Überleben innerhalb des jeweiligen Tumorstadiums stark. Im Falle einer vorliegenden Metastasierung wird das Überleben beispielsweise als sehr variabel beschrieben. Das Fortschreiten einer Tumorerkrankung stellt zwar einen starken prognostischen Marker dar, kann

allerdings nur retrospektiv eruiert werden [120]. Das Setting der antimetastatischen Behandlung kann auf Grund der begrenzten Aussagefähigkeit hinsichtlich der Prognose eingeschränkt sein. Effektive Therapieansätze gibt es vorwiegend für Tumorerkrankungen mit guter Prognose, also bei limitierter Tumorausbreitung und regional begrenztem Vorgehen wie wiederholter chirurgischer Maßnahmen. Vor allem bei Vorliegen einer schlechten Prognose wird die systemische Therapie bevorzugt. Für das NNR-Karzinom, welches lokal auf die Nebenniere begrenzt ist und scheinbar komplett reseziert werden konnte, sind die Prognose betreffende Aussagen weiterhin diffizil. Ein molekularer Prädiktor wäre, speziell in dieser Konstellation, von großem Nutzen [120].

Mittlerweile ist die Technologie für Transkriptom-Analysen etwas weiter verbreitet, an akademischen Zentren verfügbar und deren Kosten gesenkt [120]. Für manche Tumorarten wie Brustkrebs kann das Verfahren schon herangezogen werden [135]. Einige Hürden bestehen derzeit aber noch. Die aussagekräftigsten Daten werden von noch nicht fixierten gefrorenen Gewebstücken erhalten, welche nur selten in dieser Form zur Verfügung stehen [120]. Darüber hinaus sind noch weitere Validierungen nötig, bis das Transkriptom und daraus hervorgehende Analysemethoden komplett in Routinelabor-Untersuchungen aufgenommen werden können.

### **4.3.3. Phäochromozytom**

Auch beim Phäochromozytom haben die „omics“-Ansätze in den letzten Jahren zu wichtigen Erkenntnissen geführt. Unter anderem konnten weitere Suszeptibilitätsgene entdeckt und Signalwege untersucht werden, welche durch Phäochromozytom-typische Mutationen aktiviert werden. Darüber hinaus wurden das Muster von DNA-Methylierung sowie mRNA-Expression gründlich studiert und daraus Untergruppen generiert, welche im Zusammenhang mit Mutationen in identifizierten Schlüsselgenen stehen. Die genetische Komponente der Tumorgenese ist für diese Tumorentität sehr stark ausgeprägt. Bislang mangelt es aber an Studien, welche multi-dimensionale molekulare Daten zu integrieren versuchen, um ein umfangreiches Verständnis der Tumorgenese des Phäochromozytoms zu bekommen.

Eine interessante Möglichkeit liegt in der Kombination von radioaktiv-markierten Tracern und PDX-Modellen. Für das endogene Phäochromozytom konnte gezeigt werden, dass <sup>18</sup>F-LMI1195 ein vielversprechender Tracer für Diagnose, Staging und das Follow-Up ist. Besonders in Anbetracht dessen, dass es für Phäochromozytome bislang nur wenige Zelllinien und kein suffizientes Tumormodell gibt, könnte ein kürzlich beschriebens MENX-Modell eine geeignete Ausgangslage für weitere Etablierungen darstellen [137]. Die Kombination von PDX und radioaktiven Tracern zeigt sich hier als potenzielles Mittel, um bereits bestehende Modelle weiterzuentwickeln.

Zusammengefasst konnte mit integrierten Genom-Studien gezeigt werden, wie eng die multi-„omics“-Daten mit dem genetischen Status übereinstimmen. Prädisponierende Mutationen können als hauptverantwortlich für die Entstehung des Phäochromozytoms verstanden werden. Darüber hinaus konnte die funktionelle Abhängigkeit von genomischen und epigenomischen Dysregulationen gezeigt werden. Die einzelnen Subtypen können durch die genomischen Veränderungen spezifiziert werden und höchstwahrscheinlich verschiedene molekulare Entitäten darstellen. Zukünftige multidimensionale Tests sollten einer präzisen molekularen Klassifikation und der Anwendung praktizierender Ärzte dienen. Die Kenntnis spezifischer Genom-Veränderungen des malignen Phäochromozytoms soll das individuelle Patienten-Management und eine zielgerichtete Therapie im Sinne der personalisierten Medizin verbessern [136].

#### **4.3.4. Ausblick**

Zukunftsgewandte Tumorthapien mit kurativem Ansatz werden zunehmend individueller. Insbesondere bei häufigen Neoplasien, aber auch bei seltenen Entitäten ist schon aktuell eine Charakterisierung des jeweiligen Tumors wichtig, bevor therapeutische Schritte eingeleitet werden können. Wie vorangegangen beschrieben, könnten in dieser Hinsicht PDX-Modelle ein wichtiger Ausgangspunkt individueller Therapien sein. Das gesamte Feld der Molekularbiologie hat in den letzten Jahren wertvolle Erkenntnisse über die zytogenetische Architektur verschiedenster Tumorarten gebracht. Neue Ergebnisse werden die Ansatzpunkte für Diagnostik, Prognosemodalitäten und Therapiemöglichkeiten weiter spezifizieren.

Erstaunlicherweise wurden einige Fragen rund um PDX-Modelle schon vor ca. 30 Jahren erörtert. Damals war noch unklar, inwieweit Patiententumore im Modell ihre Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika beibehalten. Es wurde erwartet, dass eine der großen Herausforderungen darin bestehe, Therapeutika in klinisch relevanter Dosis zuzulassen und Therapieschemata zu entwickeln, welche die humanen Gegebenheiten berücksichtigen. Die Antworten dieser beiden Fragen bleiben der zentrale Fokus der aktuellen Debatte über die Nützlichkeit von PDX-Modellen [70].

An dieser Stelle werden nochmal die Vor- und Nachteile von PDX-Modellen erörtert. Zu den Stärken gehört, dass die Histologie und das Genexpressionsprofil die humane Pathologie möglichst gut widerspiegeln, was speziell für die Testung und das Auswählen konventioneller wie zielgerichteter Therapeutika von Nutzen ist. Der Erkenntnisgewinn aus PDX-Modellen dient auch *in vitro* Versuchen, Medikamenten-Screenings und Tests zielgerichteter Gentherapeutika.

Wie bereits erwähnt gibt es nach wie vor einige Aspekte, die PDX-Modelle derzeit limitieren. Für das Anwachsen und zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bedarf es immunsupprimierter Versuchstiere, was unter anderem die Arbeit mit zielgerichteter Immuntherapie verhindert. Das

humane Gewebe kann von murinen Viren befallen werden und nach einer gewissen Passagierung sprießen oft murine Stroma- und vaskuläre Zellen ein. Der Implantationsort ist nach wie vor nur selten der originäre, wodurch dem humanen Gegenstück nur unzureichend Rechnung getragen wird. Auch der Metastasierungsweg wird nicht adäquat imitiert, da im PDX-Modell nur selten Metastasierung stattfindet und diese nicht repräsentativ für den Ablauf im humanen Organismus ist. Aktuell mangelt es noch an großen, in der Umsetzung kostengünstigen Modellen [76].

Für die Testung der konventionellen und zielgerichteten Therapie ist ein wichtiger Schritt im Umgang mit PDX-Modellen, große Tumorbanken inklusive verschiedener Tumortypen einzuführen. Mit Hilfe einer umfangreichen Tumorbank und darin enthaltenen Vergleichsmöglichkeiten sollte ein Zentrum langfristig in der Lage sein, neben den üblichen Möglichkeiten des histopathologischen Schnellschnitts die histologische Beschaffenheit des Tumors weitergehend zu charakterisieren und mit bestehenden Proben zu vergleichen, um so die individuelle Entität genauer definieren zu können. Langfristig könnte durch eine solche Methodik die effektivste Therapie mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil für jeden Patienten individuell bestimmt werden. Um Kosten und Anstrengungen der Etablierung solcher Tumorbanken zu minimieren und deren Ressourcen der allgemeinen Wissenschaft bereitzustellen, sollten Konsortien wie die EurOPDX gebildet werden [76].

In Zukunft sollte bei PDX-Modellen versucht werden, dass die Tumore *in vivo* weiterwachsen, um neue Erkenntnisse über deren Viabilität und mögliche Ansätze der Pharmakotherapie zu gewinnen. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob es weitere, bislang unbekannte Subtypen der jeweiligen Tumorentität gibt.

Wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, konnte das Wissen über neuroendokrine Tumore durch die Forschung in der Molekularbiologie um wertvolle Faktoren ergänzt werden. Neben der untersuchten histologischen gibt es auch eine genetische Heterogenität in den einzelnen Tumoren. Molekularbiologische Tests sollten im Rahmen großer Studien an Xenografts erprobt werden. Die Kombination aus den histologischen Ergebnissen und jenen aus der Molekulargenetik führen in der Zukunft hoffentlich zu einem noch detaillierteren Verständnis bezüglich der Tumorgenese einerseits, des Wachstums-, Differenzierungs- und Sekretionsverhaltens andererseits.

Zusammenfassend wurden PDX-Modelle als Mittel validiert, um langfristig einen zusätzlichen multidimensionalen Biomarker für Tumore zu generieren. Es gibt Hinweise darauf, dass an PDX-Modellen durchgeführte pharmakologische Studien einen höheren prädiktiven Aussagewert bezüglich des klinischen Outcomes haben als Modelle, die mit Zelllinien arbeiten, insbesondere, wenn das therapeutische Präparat in klinisch relevanter Dosis getestet wurde [70]. Bislang existieren

nur wenige onkologische Therapeutika, die nach der Anwendung im PDX-Modell klinisch komplett evaluiert wurden. Die Ermittlung des prädiktiven Wertes der PDX-Modelle im prospektiven Setting bleibt bislang also eine schwierige Aufgabe: in den einzelnen Mausstämmen sind die Sensitivitäten bezüglich zytotoxischer Stoffe sehr verschieden, ebenso die experimentellen Fragestellungen von pharmakologischen Studien. Die Zeitspanne zwischen Tumorimplantation und Behandlungsbeginn kann die Antwort auf die antitumorale Therapie maßgeblich beeinflussen und sollte intensiv verglichen und erforscht werden [70].

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um die Charakterisierung der heterogenen GEP-NET, NNR-Karzinome und Phäochromozytome zu erweitern und die Basis für PDX-Modelle zu generieren. Dafür wurden Stücke des jeweiligen Originaltumors sowie desselben Tumors nach 12 Wochen subkutaner Nidation in der immundefizienten Nacktmaus histologisch aufgearbeitet, für den Tumor charakteristische Parameter immunhistochemisch untersucht und deren Ergebnisse miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Tumore in der Maus anwachsen und im Gewebe weiterhin Zellproliferation stattfindet. Hinsichtlich der endokrinen Charakteristika konnte auch im Mausmodell eine bleibende Differenzierung der Gewebe gezeigt werden. Allerdings wiesen die einzelnen Tumorentitäten eine starke Heterogenität auf, sowohl unter den einzelnen Tumorarten sowie im Vergleich zwischen Ausgangstumor und analogem Tumor nach der Nidation. Hier sind größere Fallzahlen nötig, um die Kausalität besser zu verstehen und das Modell in seiner Standardisierung weiter zu optimieren.

Im präklinischen Setting ist der Einsatz des vorliegenden PDX-Modells einerseits schwierig, da die behandelten Tumore eine große Heterogenität aufweisen. In der aktuellen präklinischen Forschung werden oft sehr homogene Studiendesigns angewandt, die die Diversität der Tumorentitäten nur teilweise berücksichtigen können. Andererseits ist genau dieser Aspekt die große Stärke der zugrundeliegenden Idee, da beispielsweise die Wirkung eines Medikaments an unterschiedlichen Subentitäten getestet und man gegebenenfalls dem individuellen Patienten schneller gerecht werden kann.

Diverse in den letzten Jahren entdeckte Marker sind zwar hilfreich für Diagnosestellung, Therapieansätze sowie fundiertere Prognosen über therapeutische Ansprechraten, setzen allerdings ein experimentelles System voraus, das in möglichst hohem Maße der Biologie des individuellen Tumors entspricht. Dies könnte in ausgewählten Fällen durch PDX-Modelle erreicht werden.

Insgesamt könnten PDX-Modelle ergänzende Daten zu standardisierten Forschungsmethoden liefern und in Kooperation mit modernen Analysen (z.B. „omics“-Verfahren) der individualisierten Tumorthherapie dienen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] a. Faggiano, P. Ferolla, F. Grimaldi, D. Campana, M. Manzoni, M. V. Davì, a. Bianchi, R. Valcavi, E. Papini, D. Giuffrida, D. Ferone, G. Fanciulli, G. Arnaldi, G. M. Franchi, G. Francia, G. Fasola, L. Crinò, a. Pontecorvi, P. Tomassetti, and a. Colao, "Natural history of gastro-enteropancreatic and thoracic neuroendocrine tumors. Data from a large prospective and retrospective Italian Epidemiological study: The net management study," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 35, no. 11, pp. 817–823, 2012.
- [2] I. M. Modlin, K. Oberg, D. C. Chung, R. T. Jensen, W. W. De Herder, R. V Thakker, M. Caplin, G. D. Fave, G. A. Kaltsas, E. P. Krenning, S. F. Moss, O. Nilsson, G. Rindi, R. Salazar, P. Ruzsniewski, and A. Sundin, "Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours," *Lancet Oncol.*, vol. 9, no. January, 2008.
- [3] M. Beuschlein, F; Reincke, "Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems," *Internist (Berl.)*, pp. 129–130, 2012.
- [4] J. F. Powers, P. G. Korgaonkar, S. Fliedner, A. Giubellino, K. Pacak, G. G. Sahagian, and A. S. Tischler, "Cytocidal activities of topoisomerase 1 inhibitors and 5-azacytidine against pheochromocytoma/paraganglioma cells in primary human tumor cultures and mouse cell lines," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [5] B. Allolio and M. Fassnacht, "Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, no. 6, pp. 2027–37, Jun. 2006.
- [6] D. Parekh, J. Ishizuka, C. M. Townsend, B. Haber, R. D. Beauchamp, G. Karp, S. W. Kim, S. Rajaraman, G. Greeley, and J. C. Thompson, "Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion," *Pancreas*, vol. 9, no. 1, pp. 83–90, Jan. 1994.
- [7] A. F. Gazdar, H. K. Oie, C. H. Shackleton, T. R. Chen, T. J. Triche, C. E. Myers, G. P. Chrousos, M. F. Brennan, C. A. Stein, and R. V. La Rocca, "Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of," *Cancer Res.*, pp. 5488–5496, 1990.
- [8] C. Rygaard, J; Povlsen, "Heterotransplantation of a human malignant tumour to the mouse mutant 'nude,'" *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, pp. 604–606, 1969.
- [9] I. M. Modlin, M. D. Shapiro, and M. Kidd, "Siegfried oberndorfer: Origins and perspectives of carcinoid tumors," *Hum. Pathol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1440–1451, Dec. 2004.
- [10] I. Drozdov, I. M. Modlin, M. Kidd, and V. V Goloubinov, "From Leningrad to London: the saga of Kulchitsky and the legacy of the enterochromaffin cell," *Neuroendocrinology*, vol. 89, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2009.
- [11] P. Masson, "Carcinoids (argenataffin cell-tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa," *Am. J. Pathol.*, vol. IV, 1928.
- [12] K. Langley, U. Inserm, and U.–biologie De Communication, "The Neuroendocrine Concept Today," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, pp. 1–17, 1994.
- [13] M. C. Champaneria, I. M. Modlin, M. Kidd, and G. N. Eick, "Friedrich Feyrter: a precise intellect in a diffuse system," *Neuroendocrinology*, vol. 83, no. 5–6, pp. 394–404, Jan. 2006.
- [14] P. D. Leotlela, a Jauch, H. Holtgreve-Grez, and R. V Thakker, "Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 437–50, Dec. 2003.
- [15] M. Pavel, E. Baudin, A. Couvelard, E. Krenning, K. Öberg, T. Steinmüller, M. Anlauf, B. Wiedenmann, and R. Salazar, "ENETS consensus guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut,

- hindgut, and unknown primary," *Neuroendocrinology*, vol. 95, pp. 157–176, 2012.
- [16] I. M. Modlin and a Sandor, "An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors.," *Cancer*, vol. 79, no. 4, pp. 813–29, Feb. 1997.
- [17] E. D. . Williams, "The classification of carcinoid tumors," *Lancet*, vol. LXII, no. 13, p. 993, Mar. 1963.
- [18] M. Schott, G. Klöppel, A. Raffel, A. Saleh, W. T. Knoefel, and W. a Scherbaum, "Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract.," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 108, no. 18, pp. 305–12, May 2011.
- [19] G. Rindi, M. Falconi, C. Klersy, L. Albarello, L. Boninsegna, M. W. Buchler, C. Capella, M. Caplin, a. Couvelard, C. Doglioni, G. Delle Fave, L. Fischer, G. Fusai, W. W. De Herder, H. Jann, P. Komminoth, R. R. De Krijger, S. La Rosa, T. V. Luong, U. Pape, a. Perren, P. Ruzsniowski, a. Scarpa, a. Schmitt, E. Solcia, and B. Wiedenmann, "TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: Results from a large international cohort study," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 104, no. 10, pp. 764–777, 2012.
- [20] G. Rindi and B. Wiedenmann, "Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas-new insights," *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2011.
- [21] J. D. Godwin, "Carcinoid tumors. An analysis of 2,837 cases.," *Cancer*, vol. 36, pp. 560–569, 1975.
- [22] I. M. Modlin, K. D. Lye, and M. Kidd, "A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors.," *Cancer*, vol. 97, no. 4, pp. 934–59, Feb. 2003.
- [23] U. Ploeckinger, G. Kloepfel, B. Wiedenmann, and R. Lohmann, "The German NET-registry: An audit on the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors," *Neuroendocrinology*, vol. 90, pp. 349–363, 2009.
- [24] E. Johannesen and V. Nguyen, "WHO Grade 2 Neuroendocrine Tumor in a 15-Year-Old Male: A Case Report and Literature Review," *Case Rep. Pathol.*, vol. 2014, pp. 1–4, 2014.
- [25] U.-F. Pape, U. Berndt, J. Müller-Nordhorn, M. Böhmig, S. Roll, M. Koch, S. N. Willich, and B. Wiedenmann, "Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 15, pp. 1083–1097, 2008.
- [26] R. Garcia-Carbonero, J. Capdevila, G. Crespo-Herrero, J. a. Díaz-Pérez, M. P. Martínez del Prado, V. Alonso Orduña, I. Sevilla-García, C. Villabona-Artero, a. Beguiristain-Gómez, M. Llanos-Muñoz, M. Marazuela, C. Alvarez-Escola, D. Castellano, E. Vilar, P. Jiménez-Fonseca, a. Teulé, J. Sastre-Valera, M. Benavent-Viñuelas, a. Monleon, and R. Salazar, "Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): Results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE)," *Ann. Oncol.*, vol. 21, no. February, pp. 1794–1803, 2010.
- [27] J. C. Yao, M. Hassan, A. Phan, C. Dagohoy, C. Leary, J. E. Mares, E. K. Abdalla, J. B. Fleming, J.-N. Vauthey, A. Rashid, and D. B. Evans, "One hundred years after 'carcinoid': epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 18, pp. 3063–72, Jun. 2008.
- [28] L. F. Starker and T. Carling, "Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.," *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 21, no. 1, pp. 29–33, 2009.
- [29] O. Corcos, A. Couvelard, S. Giraud, M.-P. Vullierme, Dermot O'Toole, V. Rebours, J.-L. Stievenart, A. Penfornis, P. Niccoli-Sire, E. Baudin, A. Sauvanet, P. Levy, P. Ruzsniowski, S. Richard, and P. Hammel, "Endocrine pancreatic tumors in von Hippel-Lindau disease: clinical, histological, and genetic features.," *Pancreas*, vol. 37, no. 1, pp. 85–93, 2008.
- [30] E. Bajetta, L. Ferrari, M. Sc, A. Martinetti, L. Celio, G. Procopio, S. Artale, N. Zilembo, M. Di Bartolomeo, E. Seregni, E. Bombardieri, and N. Tumors, "Chromogranin A , Neuron Specific

- Enolase , Carcinoembryonic Antigen , and Hydroxyindole Neuroendocrine Tumors," *Cancer*, pp. 858–865, 1999.
- [31] B. Eriksson, K. Oberg, and M. Stridsberg, "Tumor markers in neuroendocrine tumors.," *Digestion*, vol. 62 Suppl 1, no. suppl 1, pp. 33–38, 2000.
- [32] T. Scholzen and J. Gerdes, "The Ki-67 protein: From the known and the unknown," *J. Cell. Physiol.*, vol. 182, no. 3, pp. 311–322, 2000.
- [33] G. Kaltsas, M. Korbonits, E. Heintz, J. J. Mukherjee, P. J. Jenkins, S. L. Chew, R. Reznick, J. P. Monson, G. M. Besser, R. Foley, K. E. Britton, and A. B. Grossman, "Comparison of somatostatin analog and meta-iodobenzylguanidine radionuclides in the diagnosis and localization of advanced neuroendocrine tumors," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 2, pp. 895–902, 2001.
- [34] B. Tilling, N; Ricke, J; Wiedenmann, "Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems," *Internist (Berl.)*, vol. 43, no. 2, pp. 210–218, 2002.
- [35] B. Eriksson, G. Klöppel, E. Krenning, H. Ahlman, U. Plöckinger, B. Wiedenmann, R. Arnold, C. Auernhammer, M. Körner, G. Rindi, and S. Wildi, "Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumors--well-differentiated jejunal-ileal tumor/carcinoma.," *Neuroendocrinology*, vol. 87, no. 1, pp. 8–19, 2008.
- [36] A. Meeker and C. Heaphy, "Gastroenteropancreatic endocrine tumors," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 386, no. 1–2, pp. 101–120, 2014.
- [37] M. Falconi, U. Plockinger, D. J. Kwakkeboom, R. Manfredi, M. Korner, L. Kvols, U. F. Pape, J. Ricke, P. E. Goretzki, S. Wildi, T. Steinmuller, K. Oberg, and J.-Y. Scoazec, "Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma.," *Neuroendocrinology*, vol. 84, no. 3, pp. 196–211, 2006.
- [38] R. Arnold, A. Rinke, C. Schmidt, and L. Hofbauer, "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy.," *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 19, no. 4, pp. 649–656, 2005.
- [39] G. a. Kaltsas, G. M. Besser, and A. B. Grossman, "The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors," *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 3, pp. 458–511, 2004.
- [40] K. Öberg, "Management of neuroendocrine tumours," *Ann. Oncol.*, vol. 11, no. 5, pp. 295–302, 2004.
- [41] M. H. Kulke, "Gastrointestinal neuroendocrine tumors: A role for targeted therapies?," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 207–219, 2007.
- [42] J. R. Buscombe, M. E. Caplin, and A. J. W. Hilson, "Long-term efficacy of high-activity <sup>111</sup>In-pentetreotide therapy in patients with disseminated neuroendocrine tumors.," *J. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 1, pp. 1–6, 2003.
- [43] J. C. Yao, "Molecular targeted therapy for carcinoid and islet-cell carcinoma," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 1, pp. 163–172, 2007.
- [44] I. M. Modlin, M. C. Champaneria, A. K. C. Chan, and M. Kidd, "A three-decade analysis of 3,911 small intestinal neuroendocrine tumors: The rapid pace of no progress," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 102, no. 1, pp. 1464–1473, 2007.
- [45] D. McFarlane, "Cancer of the adrenal cortex. The natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases.," *Ann R Coll Surg Eng*, pp. 155–186, 1958.
- [46] M. Fassnacht, S. Johanssen, M. Quinkler, P. Bucsky, H. S. Willenberg, F. Beuschlein, M. Terzolo, H. H. Mueller, S. Hahner, and B. Allolio, "Limited prognostic value of the 2004 international union against cancer staging classification for adrenocortical carcinoma," *Cancer*, vol. 115, no. 2, pp. 243–250, 2009.
- [47] M. Fassnacht, M. Kroiss, and B. Allolio, "Update in adrenocortical carcinoma.," *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 12, pp. 4551–64, Dec. 2013.
- [48] C. A. Stratakis, “Cushing Syndrome in Pediatrics,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [49] M. Reincke, “Mutations in adrenocortical tumors.,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 30, no. 6–7, pp. 447–455, 1998.
- [50] B. Zwermann, “Die Rolle der Telomerase in der Immortalisation und malignen Transformation von Nebennierenrindenzellen,” 2012.
- [51] S. Johanssen, M. Fassnacht, D. Brix, A.-C. Koschker, S. Hahner, H. Riedmiller, and B. Allolio, “Das Nebennierenkarzinom Diagnostik und Therapie,” *Urologe*, vol. 47, no. 2, pp. 172–81, Feb. 2008.
- [52] B. Allolio, “Maligne Tumoren der Nebennierenrinde,” *Internist (Berl.)*, pp. 186–195, 2002.
- [53] A.-C. Koschker, M. Fassnacht, S. Hahner, D. Weismann, and B. Allolio, “Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures.,” *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 114, no. 2, pp. 45–51, 2006.
- [54] L. Weiss, “Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical carcinoma .pdf,” *Am. J. Surg. Pathol.*, 1984.
- [55] J. Weiss, LJ; Medeiros, “Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma,” *Am. J. Surg. Pathol.*, 1989.
- [56] W. Saeger, “Histopathological classification of adrenal tumours.,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 30 Suppl 3, pp. 58–62, 2000.
- [57] T. Else, A. C. Kim, A. Sabolch, V. M. Raymond, A. Kandathil, E. M. Caoili, S. Jolly, B. S. Miller, T. J. Giordano, and G. D. Hammer, “Adrenocortical carcinoma,” *Endocr. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 282–326, 2014.
- [58] B. Allolio, S. Hahner, D. Weismann, and M. Fassnacht, “Management of adrenocortical carcinoma,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, pp. 273–287, 2004.
- [59] F. Beuschlein, J. Weigel, W. Saeger, M. Kroiss, V. Wild, F. Daffara, R. Libé, A. Ardito, A. Al Ghuzlan, M. Quinkler, A. Oßwald, C. L. Ronchi, R. de Krijger, R. a. Feelders, J. Waldmann, H. S. Willenberg, T. Deutschbein, A. Stell, M. Reincke, M. Papotti, E. Baudin, F. Tissier, H. R. Haak, P. Loli, M. Terzolo, B. Allolio, H.-H. Müller, and M. Fassnacht, “Major Prognostic Role of Ki67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 3, pp. 841–849, 2015.
- [60] K. Y. Bilimoria, W. T. Shen, D. Elaraj, D. J. Bentrem, D. J. Winchester, E. Kebebew, and C. Sturgeon, “Adrenocortical carcinoma in the United States: Treatment utilization and prognostic factors,” *Cancer*, vol. 113, no. 11, pp. 3130–3136, 2008.
- [61] a. Buffet, a. Venisse, V. Nau, I. Roncellin, V. Boccio, N. Le Pottier, M. Bousson, C. Travers, C. Simian, N. Burnichon, N. Abermil, J. Favier, X. Jeunemaitre, and a. P. Gimenez-Roqueplo, “A decade (2001-2010) of genetic testing for pheochromocytoma and paraganglioma,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 359–366, 2012.
- [62] L. J. Castro-Vega, C. Lepoutre-Lussey, a-P. Gimenez-Roqueplo, and J. Favier, “Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective,” *Oncogene*, no. January, pp. 1–10, 2015.
- [63] K. L. Fishbein, L; Nathanson, “Pheochromocytoma and Paraganglioma: Understanding the Complexities of the Genetic Background,” *Cancer Genet.*, vol. 29, pp. 997–1003, 2012.
- [64] A. Agarwal, P. K. Mehrotra, M. Jain, S. K. Gupta, A. Mishra, G. Chand, G. Agarwal, a. K. Verma, S. K. Mishra, and U. Singh, “Size of the tumor and pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS): Can they predict malignancy?,” *World J. Surg.*, vol. 34, no. 12, pp. 3022–

- 3028, 2010.
- [65] E. O. Estey, M; Diamandis, "Questions & Answers Pheochromocytom," *Clin. Chem.*, vol. 29, no. 3, pp. 997–1003, 2013.
- [66] E. Baudin, M. A. Habra, F. Deschamps, G. Cote, F. Dumont, M. Cabanillas, J. Arfi-Roufe, A. Berdelou, B. Moon, A. Al Ghuzlan, S. Patel, S. Leboulleux, and C. Jimenez, "Therapy of endocrine disease: Treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma.," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 171, no. 3, pp. R111–R122, 2014.
- [67] N. Burnichon, L. Vescovo, L. Amar, R. Libé, A. de Reynies, A. Venisse, E. Jouanno, I. Laurendeau, B. Parfait, J. Bertherat, P. F. Plouin, X. Jeunemaitre, J. Favier, and A. P. Gimenez-Roqueplo, "Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 20, pp. 3974–3985, 2011.
- [68] J. W. M. Lenders, Q.-Y. Duh, G. Eisenhofer, A.-P. Gimenez-Roqueplo, S. K. G. Grebe, M. H. Murad, M. Naruse, K. Pacak, and W. F. Young, "Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 99, no. 6, pp. 1915–42, 2014.
- [69] G. Avwioro, "Histochemical use of Haematoxylin-a review," *JPCS*, vol. 1, no. June, pp. 24–34, 2011.
- [70] E. Rosfjord, J. Lucas, G. Li, and H. P. Gerber, "Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 91, no. 2, pp. 135–143, 2014.
- [71] A. Fiebig, HH; Burger, "Human Tumor Xenografts and Explants," in *Tumor models in cancer reseaech Springer*, 2001, pp. 113–137.
- [72] B. A. Teicher, "Tumor models for efficacy determination.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 10, pp. 2435–43, 2006.
- [73] H. Pharma, "Orthotopic tumor models." [Online]. Available: <http://www.heidelberg-pharma.com/services/cancer/orthotopic-tumor-models/>. [Accessed: 12-Mar-2017].
- [74] K. Fraedrich, J. Schrader, H. Ittrich, G. Keller, A. Gontarewicz, V. Matzat, A. Kromminga, A. Pace, J. Moll, M. Bläker, A. W. Lohse, D. Hörsch, T. H. Brümmendorf, and D. Benten, "Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 17, pp. 4621–32, Sep. 2012.
- [75] E. A. Sausville and A. M. Burger, "Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 7, pp. 3351–4, discussion 3354, Apr. 2006.
- [76] A. F. Gazdar, F. R. Hirsch, and J. D. Minna, "From Mice to Men and Back: An Assessment of Preclinical Model Systems for the Study of Lung Cancers," *J. Thorac. Oncol.*, 2015.
- [77] A. Kellar, C. Egan, and D. Morris, "Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–17, 2015.
- [78] K. Kiguchi, T. Kubota, D. Aoki, Y. Udagawa, S. Yamanouchi, M. Saga, A. Amemiya, F. X. Sun, S. Nozawa, A. R. Moossa, and R. M. Hoffman, "A patient-like orthotopic implantation nude mouse model of highly metastatic human ovarian cancer," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 16, no. 8, pp. 751–756, 1998.
- [79] U. Mainz, "3D multicellular in vitro models for tumors, angiogenesis and tissue engineering." [Online]. Available: <https://www.unimedizin-mainz.de/pathologie/forschung/3d-tumormodelle-angiogenese-und-tissue-engineering.html>. [Accessed: 21-Mar-2017].
- [80] B. M. Evers, C. M. Townsend, J. R. Upp, E. Allen, S. C. Hurlbut, S. W. Kim, S. Rajaraman, P. Singh, J. C. Reubi, and J. C. Thompson, "Establishment and characterization of a human

- carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth.," *Gastroenterology*, vol. 101, no. 2, pp. 303–11, Aug. 1991.
- [81] B. Evers, "Novel Therapy for the Treatment of Human Carcinoid," *Ann. Surg.*, 1991.
- [82] a Logié, P. Boudou, L. Boccon-Gibod, E. Baudin, G. Vassal, M. Schlumberger, Y. Le Bouc, and C. Gicquel, "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma xenograft model.," *Endocrinology*, vol. 141, no. 9, pp. 3165–71, Sep. 2000.
- [83] F. M. Barlaskar, A. C. Spalding, J. H. Heaton, R. Kuick, A. C. Kim, D. G. Thomas, T. J. Giordano, E. Ben-Josef, and G. D. Hammer, "Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 1, pp. 204–212, 2009.
- [84] C. Hantel, F. Lewrick, M. Reincke, R. Süß, and F. Beuschlein, "Liposomal doxorubicin-based treatment in a preclinical model of adrenocortical carcinoma.," *J. Endocrinol.*, vol. 213, no. 2, pp. 155–61, May 2012.
- [85] S. Gaujoux, C. Hantel, P. Launay, S. Bonnet, K. Perlemoine, L. Lefèvre, M. Guillaud-Bataille, F. Beuschlein, F. Tissier, J. Bertherat, M. Rizk-Rabin, and B. Ragazzon, "Silencing mutated  $\beta$ -catenin inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis in the adrenocortical cancer cell line H295R.," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e55743, Jan. 2013.
- [86] C. Hantel and F. Beuschlein, "Xenograft models for adrenocortical carcinoma," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 421, pp. 28–33, 2016.
- [87] C. C. Cardoso, S. R. Bornstein, and P. J. Hornsby, "Optimizing orthotopic cell transplantation in the mouse adrenal gland," *Cell Transplant.*, vol. 19, no. 5, pp. 565–572, 2010.
- [88] F. Beuschlein, S. Galac, and D. B. Wilson, "Animal models of adrenocortical tumorigenesis.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 351, no. 1, pp. 78–86, Mar. 2012.
- [89] M. Doghman, T. Karpova, G. A. Rodrigues, M. Arhatte, J. De Moura, L. R. Cavalli, V. Virolle, P. Barbry, G. P. Zambetti, B. C. Figueiredo, L. L. Heckert, and E. Lalli, "Increased Steroidogenic Factor-1 Dosage Triggers Adrenocortical Cell Proliferation and Cancer," *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, no. 12, pp. 2968–2987, 2007.
- [90] B. C. Figueiredo, L. R. Cavalli, M. A. D. Pianovski, E. Lalli, R. Sandrini, R. C. Ribeiro, G. Zambetti, L. DeLacerda, G. A. Rodrigues, and B. R. Haddad, "Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 2, pp. 615–619, 2005.
- [91] S. Sbierra, S. Schnull, G. Assie, H. U. Voelker, L. Kraus, M. Beyer, B. Ragazzon, F. Beuschlein, H. S. Willenberg, S. Hahner, W. Saeger, J. Bertherat, B. Allolio, and M. Fassnacht, "High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 10, pp. 161–171, 2010.
- [92] G. D. Else, Tobias; Trovato, Alessia; Kim, Alex C.; Wu, Yipin; Ferguson, David O.; Kuick, Rork D.; Lucas, Peter C.; Hammer, "Genetic p53 deficiency partially rescues the adrenocortical dysplasia (acd) phenotype at the expense of increased tumorigenesis," *Cancer Cell*, vol. 15, pp. 465–476, 2009.
- [93] E. Korpershoek, K. Pacak, and L. Martiniova, "Murine models and cell lines for the investigation of pheochromocytoma: Applications for future therapies?," *Endocr. Pathol.*, vol. 23, no. 1, pp. 43–54, 2012.
- [94] J. Tischler, A.S.; Powers, J.F.; Alroy, "Animal models of pheochromocytoma," *Histol. Histopathol.*, vol. 19, pp. 883–895, 2004.
- [95] A. Giubellino, G. M. Woldemichael, C. Sourbier, M. J. Lizak, and F. James, "Characerterization of two mouse models of metastatic pheochromocytoma using bioluminescence imaging," *Cancer Lett.*, vol. 316, no. 1, pp. 46–52, 2012.

- [96] M. Ullrich, R. Bergmann, M. Peitzsch, M. Cartellieri, N. Qin, M. Ehrhart-Bornstein, N. L. Block, A. V Schally, J. Pietzsch, G. Eisenhofer, S. R. Bornstein, and C. G. Ziegler, "In vivo fluorescence imaging and urinary monoamines as surrogate biomarkers of disease progression in a mouse model of pheochromocytoma," *Endocrinology*, vol. 155, no. 11, pp. 4149–56, 2014.
- [97] J. F. Powers, M. J. Evinger, P. Tsokas, S. Bedri, J. Alroy, M. Shahsavari, and a S. Tischler, "Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice.," *Cell Tissue Res.*, vol. 302, no. 3, pp. 309–320, 2000.
- [98] S. Ohta, E. W. Lai, J. C. Morris, A. L. Y. Pang, M. Watanabe, H. Yazawa, R. Zhang, J. E. Green, W. Y. Chan, P. Sirajuddin, S. Taniguchi, J. F. Powers, A. S. Tischler, and K. Pacak, "Metastasis-associated gene expression profile of liver and subcutaneous lesions derived from mouse pheochromocytoma cells," *Mol. Carcinog.*, vol. 47, no. 4, pp. 245–251, 2008.
- [99] J. F. Powers, K. Schelling, J. M. Brachold, P. Tsokas, H. Schayek, E. Friedman, and A. S. Tischler, "High-Level Expression of Receptor Tyrosine Kinase Ret and Responsiveness to Ret-Activating," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 389, pp. 382–389, 2002.
- [100] V. Pachnis, B. Mankoo, and F. Costantini, "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis.," *Development*, vol. 119, pp. 1005–1017, 1993.
- [101] A. S. . Powers, J.F.; Schelling, K.H.; Brachold, J.M.; Tischler, "Plasticity of Pheochromocytoma Cell Lines from Neurofibromatosis Knockout Mice," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 971, pp. 371–378, 2002.
- [102] D. a Sweetser, G. J. Froelick, a M. Matsumoto, K. E. Kafer, B. Marck, R. D. Palmiter, and R. P. Kapur, "Ganglioneuromas and renal anomalies are induced by activated RET(MEN2B) in transgenic mice.," *Oncogene*, vol. 18, no. 4, pp. 877–86, 1999.
- [103] F. H. van Nederveen, A. Perren, H. Dannenberg, B. J. Petri, W. N. M. Dinjens, P. Komminoth, and R. R. de Krijger, "PTEN gene loss, but not mutation, in benign and malignant phaeochromocytomas," *J. Pathol.*, vol. 209, no. 2, pp. 274–280, 2006.
- [104] L. Amar, E. Baudin, N. Burnichon, S. Peyrard, S. Silvera, J. Bertherat, X. Bertagna, M. Schlumberger, X. Jeunemaitre, A.-P. Gimenez-Roqueplo, and P.-F. Plouin, "Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 10, pp. 3822–3828, 2007.
- [105] L. Martiniova, M. S. Kotys, D. Thomasson, D. Schimel, E. W. Lai, M. Bernardo, M. J. Merino, F. James, P. J. Ruzicka, R. Kvetnansky, and P. L. Choyke, "Non-invasive monitoring of a murine model of metastatic pheochromocytoma: a comparison of contrast enhanced microCT and non-enhanced MRI," *JMRI*, vol. 29, no. 3, pp. 685–691, 2009.
- [106] O. M. Zlatian, M. V. Com??nescu, A. F. Ro??u, L. Ro??u, M. Cruce, A. E. G??man, C. D. C??lina, and V. Sfredel, "Histochemical and immunohistochemical evidence of tumor heterogeneity in colorectal cancer," *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 56, no. 1, pp. 175–181, 2015.
- [107] B. O. Einarsdottir, R. Olofsson Bagge, J. Bhadury, H. Jespersen, J. Mattsson, L. M. Nilsson, K. Truvé, M. Dávila López, P. Naredi, O. Nilsson, U. Stierner, L. Ny, and J. A. Nilsson, "Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions," *Oncotarget*, vol. 5, no. 20, pp. 9609–9618, 2014.
- [108] "cell proliferation guide." [Online]. Available: <http://www.abcam.com/primary-antibodies/the-cell-proliferation-guide>. [Accessed: 03-Aug-2017].
- [109] J. Gerdes, F. Dallenbach, K. Lennert, H. Lemke, and H. Stein, "Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67," *Hematol. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 365–371, Oct. 1984.
- [110] J. C. Y. Ip, T. C. Y. Pang, A. R. Glover, P. Soon, J. T. Zhao, S. Clarke, B. G. Robinson, A. J. Gill, and

- S. B. Sidhu, "Immunohistochemical validation of overexpressed genes identified by global expression microarrays in adrenocortical carcinoma reveals potential predictive and prognostic biomarkers.," *Oncologist*, vol. 20, no. 3, pp. 247–256, 2015.
- [111] K. Arola, J. Salmenkivi, "P53 and Ki67 in adrenocortical carcinoma," *Endocr. Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 861–865, 2000.
- [112] G. Klöppel, "Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours.," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 1, pp. 15–31, Mar. 2007.
- [113] I. M. Modlin, B. I. Gustafsson, S. F. Moss, M. Pavel, A. V Tsolakis, and M. Kidd, "Chromogranin A—biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease.," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 17, no. 9, pp. 2427–2443, 2010.
- [114] M. a. Kouvaraki, J. a. Ajani, P. Hoff, R. Wolff, D. B. Evans, R. Lozano, and J. C. Yao, "Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas," *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 23, pp. 4710–4719, 2004.
- [115] C. Durante, H. Boukheris, C. Dromain, P. Duvillard, S. Leboulleux, D. Elias, T. de Baere, D. Malka, J. Lumbroso, J. Guigay, M. Schlumberger, M. Ducreux, and E. Baudin, "Prognostic factors influencing survival from metastatic (stage IV) gastroenteropancreatic well-differentiated endocrine carcinoma," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 585–597, 2009.
- [116] F. Panzuto, S. Nasoni, M. Falconi, V. D. Corleto, G. Capurso, S. Cassetta, M. Di Fonzo, V. Tornatore, M. Milione, S. Angeletti, M. S. Cattaruzza, V. Ziparo, C. Bordi, P. Pederzoli, and G. Delle Fave, "Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: Comparison between gastrointestinal and pancreatic localization," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 1083–1092, 2005.
- [117] G. Capurso, S. Festa, R. Valente, M. Piciucchi, F. Panzuto, R. T. Jensen, and G. D. Fave, "Molecular pathology and genetics of pancreatic endocrine tumours," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 49, no. 1, 2012.
- [118] M. Currás-Freixes, L. Inglada-Pérez, V. Mancikova, C. Montero-Conde, R. Letón, I. Comino-Méndez, M. Apellániz-Ruiz, L. Sánchez-Barroso, M. Aguirre Sánchez-Covisa, V. Alcázar, J. Aller, C. Álvarez-Escolá, V. M. Andía-Melero, S. Azriel-Mira, M. Calatayud-Gutiérrez, J. Á. Díaz, A. Díez-Hernández, C. Lamas-Oliveira, M. Marazuela, X. Matias-Guiu, A. Meoro-Avilés, A. Patiño-García, S. Pedrinaci, G. Riesco-Eizaguirre, C. Sábado-Álvarez, R. Sáez-Villaverde, A. de Los Terreros, Ó. Sanz Guadarrama, J. Sastre-Marcos, B. Scolá-Yurrita, Á. Segura-Huerta, M. de la S. Serrano-Corredor, M. R. Villar-Vicente, C. Rodríguez-Antona, E. Korpershoek, A. Cascón, and M. Robledo, "Recommendations for somatic and germline genetic testing of single pheochromocytoma and paraganglioma based on findings from a series of 329 patients.," *J. Med. Genet.*, vol. 52, no. 10, pp. 647–656, 2015.
- [119] J. R. Gardiner, Y. Shima, K. Morohashi, and A. Swain, "SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 351, no. 1, pp. 12–8, Mar. 2012.
- [120] G. Assie, T. J. Giordano, and J. Bertherat, "Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 351, no. 1, pp. 111–7, Mar. 2012.
- [121] M. Pawlikowski, H. Pisarek, R. Kubiak, M. Jaranowska, and H. Stepień, "Immunohistochemical detection of FSH receptors in pituitary adenomas and adrenal tumors," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 325–330, 2012.
- [122] A. De Reyniès, G. Assié, D. S. Rickman, F. Tissier, L. Groussin, F. René-Corail, B. Dousset, X. Bertagna, E. Clauser, and J. Bertherat, "Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1108–1115, 2009.

- [123] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. a Diaz, and K. W. Kinzler, "Cancer Genome Landscapes," *Science (80-. )*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546–1558, 2013.
- [124] S. Yachida, E. Vakiani, C. M. White, Y. Zhong, J. Hicks, A. M. Demarzo, and C. Shi, "Small Cell and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas of the Pancreas Are Genetically Similar and Distinct from Well-differentiate Pancreatic Neuroendocrine Tumors," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 36, no. 2, pp. 173–184, 2013.
- [125] C. M. Heaphy, R. F. De Wilde, Y. Jiao, A. P. Klein, B. H. Edil, C. Shi, C. Bettegowda, F. J. Rodriguez, G. Charles, S. Hebbar, G. J. Offerhaus, R. Mclendon, B. Ahmed, Y. He, H. Yan, D. D. Bigner, S. M. Oba-shinjo, S. Kazue, N. Marie, G. J. Riggins, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, H. Ralph, A. Maitra, N. Papadopoulos, and A. K. Meeker, "Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations," *Science (80-. )*, vol. 333, no. 6041, pp. 1–4, 2012.
- [126] G. Assié, E. Letouzé, M. Fassnacht, A. Jouinot, W. Luscip, O. Barreau, H. Omeiri, S. Rodriguez, K. Perlemoine, F. René-Corail, N. Elarouci, S. Sbiera, M. Kroiss, B. Allolio, J. Waldmann, M. Quinkler, M. Mannelli, F. Mantero, T. Papatthomas, R. De Krijger, A. Tabarin, V. Kerlan, E. Baudin, F. Tissier, B. Dousset, L. Groussin, L. Amar, E. Clauser, X. Bertagna, B. Ragazzon, F. Beuschlein, R. Libé, A. de Reyniès, and J. Bertherat, "Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma.," *Nat. Genet.*, vol. 46, no. 6, pp. 607–612, Apr. 2014.
- [127] E. A. Houseman, B. C. Christensen, R. F. Yeh, C. J. Marsit, M. R. Karagas, M. Wrensch, H. H. Nelson, J. Wiemels, S. Zheng, J. K. Wiencke, and K. T. Kelsey, "Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 365, 2008.
- [128] O. Barreau, G. Assié, H. Wilmot-Roussel, B. Ragazzon, C. Baudry, K. Perlemoine, F. René-Corail, X. Bertagna, B. Dousset, N. Hamzaoui, F. Tissier, A. De Reynies, and J. Bertherat, "Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 1, pp. 174–184, 2013.
- [129] C. Gicquel and Y. Le Bouc, "Hormonal regulation of fetal growth," *Horm. Res.*, vol. 65, no. SUPPL. 3, pp. 28–33, 2006.
- [130] M. Q. Almeida, M. C. B. V. Fragoso, C. F. P. Lotfi, M. G. Santos, M. Y. Nishi, M. H. S. Costa, A. M. Lerario, C. C. Maciel, G. E. Mattos, A. A. L. Jorge, B. B. Mendonca, and A. C. Latronico, "Expression of Insulin-Like Growth Factor-II and Its Receptor in Pediatric and Adult Adrenocortical Tumors," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, no. 9, pp. 3524–3531, 2008.
- [131] M. Fassnacht, A. Berruti, E. Baudin, M. J. Demeure, J. Gilbert, H. Haak, M. Kroiss, D. I. Quinn, E. Hesseltine, C. L. Ronchi, M. Terzolo, T. K. Choueiri, S. Poondru, T. Fleege, R. Rorig, J. Chen, A. W. Stephens, F. Worden, and G. D. Hammer, "Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: A double-blind, randomised, phase 3 study," *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 4, pp. 426–435, 2015.
- [132] R. Libé, L. Groussin, F. Tissier, C. Elie, F. René-Corail, A. Fratticci, E. Jullian, P. Beck-Peccoz, X. Bertagna, C. Gicquel, and J. Bertherat, "Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 844–850, 2007.
- [133] R. Libé, A. Fratticci, and J. Bertherat, "Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 13–28, Mar. 2007.
- [134] B. Ragazzon, R. Libé, S. Gaujoux, G. Assié, A. Fratticci, P. Launay, E. Clauser, X. Bertagna, F. Tissier, A. De Reyniès, and J. Bertherat, "Transcriptome analysis reveals that p53 and  $\beta$ -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 21, pp. 8276–8281, 2010.
- [135] M. Kaufmann and L. Pusztai, "Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy," *Cancer*, vol. 117, no. 8, pp. 1575–1582, 2011.

- [136] L. J. Castro-Vega, E. Letouze, N. Burnichon, A. Buffet, P. H. Disderot, E. Khalifa, C. Lorient, N. Elarouci, A. Morin, M. Menara, C. Lepoutre-Lussey, C. Badoual, M. Sibony, B. Dousset, R. Libe, F. Zinzindohoue, P. F. Plouin, J. Bertherat, L. Amar, A. de Reynies, J. Favier, and A. P. Gimenez-Roqueplo, "Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas," *Nat Commun*, vol. 6, p. 6044, 2015.
- [137] F. C. Gaertner, T. Wiedemann, B. H. Yousefi, M. Lee, I. Repokis, T. Higuchi, S. G. Nekolla, M. Yu, S. Robinson, M. Schwaiger, and N. S. Pellegata, "Preclinical Evaluation of <sup>18</sup>F-LMI1195 for In Vivo Imaging of Pheochromocytoma in the MENX Tumor Model," *J. Nucl. Med.*, vol. 54, no. 12, pp. 2111–2117, 2013.

## 7. Anhang

### 7.1. Veröffentlichte Teilaspekte

**Hantel C., Scheller F., Ozimek A., Chiapponi C., Mussack T., Beuschlein F.** Establishment of patient-individual tumor models for endocrine tumors. *12<sup>th</sup> ENS@T Scientific Meeting of the European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENS@T) 2013, Budapest/Ungarn*; Posterpräsentation

**Hantel C., Scheller F., Ozimek A., Chiapponi C., Mussack T., Beuschlein F.** Establishment of patient-individual tumor models for endocrine tumors. *15<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ECE) 2013, Kopenhagen/Dänemark*; Posterpräsentation

**Hantel C., Ozimek A., Frantsev R., Scheller F., Reincke M., Mussack T., Beuschlein F.** Differential TNF $\alpha$  –synthesis and signaling in endocrine tumors after treatment with the Tumor-Vascular-Disrupting Agent ASA404 (vadimezan). *14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ECE) 2012, Florenz/Italien*; Posterpräsentation

**Hantel C., Ozimek A., Frantsev R., Scheller F., Reincke M., Mussack T., Beuschlein F.** Differential TNF $\alpha$ -synthesis and signaling in endocrine tumors after the treatment with the Tumor-Vascular-Disrupting-Agent ASA404 (vadimezan). *55.Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) 2012, Mannheim/Deutschland*; Vortrag von C. Hantel

**Hantel C., Scheller F., Ozimek A., Chiapponi C., Mussack T., Beuschlein F.** Development and characterisation of patient-individual tumor-models for endocrine tumors. *54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) 2011, Hamburg/Deutschland*; Posterpräsentation

**Hantel C., Scheller F., Ozimek A., Chiapponi C., Mussack T., Beuschlein F.** Development and characterisation of patient-individual tumor-models for endocrine tumors. *13<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ECE) 2011, Rotterdam/Niederlande*; Posterpräsentation

**Hantel C., Ozimek A., Scheller F., Stocker U., Mussack T., Beuschlein F.** Development and characterisation of patient-individual tumor models for endocrine tumors. *9<sup>th</sup> Scientific Meeting of the European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENS@T) 2010, Turin/Italien*; Posterpräsentation

**Hantel C., Frantsev R., Scheller F., Ozimek A., Mussack T., Beuschlein F.** Anti-tumor activity of the tumor-vascular-disrupting agent ASA404 (vadimezan) in endocrine tumor models. *92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society (ENDO) 2010, San Diego/USA*; Posterpräsentation

**Scheller F., Ozimek A., Stocker U., Mussack T., Hantel C., Beuschlein F.** Characterisation of patient-individual tumor models for ACC and GEP-NET. *12<sup>th</sup> annual meeting Young active research (DGE) 2010, Düsseldorf/Deutschland*; Symposium Talk

**Hantel C., Ozimek A., Scheller F., Chiapponi C., Mussack T., Beuschlein F.** Development and characterisation of patient-individual tumor models for endocrine tumors. *1st Basic Postgraduate Course of the European Society of Endocrinology (ESE) 2009, Turin/Italien*; Posterpräsentation

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Workflow eines PDX-Modells (Abb. nach C. Hantel).....	28
Abbildung 2: 8-10 Wochen alte immundefiziente Nacktmäuse; A: Präparation des s.c. Implantationsortes nuchal; B: s.c. Gewebsimplantation des humanen Tumors an der Flanke; C: exemplarisches Bild eines angewachsenen Tumors (Pfeil); Quellen: A. Ozimek, C. Hantel .....	45
Abbildung 3: A: humanes GEP-NET (Oberfläche); B: humanes NNR-Karzinom (Pfeil) (Schnittfläche); C: humanes malignes Phäochromozytom (Pfeile) (Schnittfläche); D: Wachstumsverhalten eines humanen GEP-NET in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 9 Wochen; E: Wachstumsverhalten eines humanen NNR-Karzinoms in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 24 Wochen; F: Wachstumsverhalten eines humanen malignen Phäochromozytoms in einer immundefizienten Nacktmaus innerhalb von 16 Wochen; Bilder-Quelle: A. Ozimek.....	46
Abbildung 4: HE-Färbung der einzelnen Tumorentitäten: A, C, E: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; B, D, F: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A, B: Primärtumor eines GEP-NET (Patient 2); C, D: Primärtumor eines NNR-Karzinoms (Patient 8); E, F: Primärtumor eines Phäochromozytoms (Patient 10); 40x Objektiv; Skalierungsbalken $\hat{=}$ 100 $\mu$ m .....	48
Abbildung 5: Ki67-IHC der einzelnen Tumorentitäten (jeweils Primären): B, F, J: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H, L: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: GEP-NET (Patient 2); E-H: NNR-Karzinom (Patient 8); I-L: Phäochromozytom (Patient 10); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G, I, K) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken $\hat{=}$ 100 $\mu$ m .....	49
Abbildung 6: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den GEP-NET .....	51
Abbildung 7: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den NNR-Karzinomen.....	53

Abbildung 8: Proliferationsverhalten im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den Phäochromozytomen.....	55
Abbildung 9: Expression von ChrA im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den GEP-NET; AU = arbitrary units.....	57
Abbildung 10: ChrA-IHC: B, F, J, N: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H, L, P: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: Primärtumor eines GEP-NET (Patient 2); EH: Metastase eines GEP-NET (Patient 2); I-L: Primärtumor eines Insulinoms (Patient 4); M-P: Primärtumor eines Phäochromozytoms (Patient 10); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G, I, K, M, O) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken $\hat{=}$ 100 $\mu$ m .....	58
Abbildung 11: Expression von ChrA im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den Phäochromozytomen; AU = arbitrary units .....	60
Abbildung 12: Expression von SF-1 im Verlauf der Implantation im Vergleich zur humanen Ausgangssituation in den NNR-Karzinomen.....	62
Abbildung 13: SF-1-IHC der NNR-Karzinome; B, F: humanes Tumorgewebe prae transplantationem; D, H: humanes Tumorgewebe nach 12 Wochen Verweildauer in der immundefizienten Nacktmaus; A-D: Primärtumor eines NNR-Karzinoms (Patient 8); E-H: Metastase eines NNR-Karzinoms (Patient 6); Aufnahmen der zugehörigen HE (A, C, E, G) jeweils links des entsprechenden Bildes; 40x Objektiv; Skalierungsbalken $\hat{=}$ 100 $\mu$ m .....	63

### 7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikationen der neuroendokrinen gastro-entero-pankreatischen Neoplasien im Vergleich (adaptiert nach Schott et al. [18]) .....	16
Tabelle 2: Klassifikations-Modelle für das NNR-Karzinom .....	20
Tabelle 3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte .....	30
Tabelle 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien.....	31
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien.....	32
Tabelle 6: Alphabetische Auflistung der verwendeten Antikörper.....	33
Tabelle 7: Auflistung der bearbeiteten Tumorentitäten mit jeweiliger Anzahl der OP-Präparate und Implantationsort.....	34
Tabelle 8: Angaben zu den Patienten und zugehörige Tumorgößen nach Entität und in chronologischer Aufarbeitung; Größenangaben, immunhistochemische Charakterisierung (Ki67, ChrA) aus den jeweiligen Pathologie-Befunden.....	36
Tabelle 9: Färbe-Protokoll für HE .....	39
Tabelle 10: Färbe-Protokoll für Ki67.....	42

Tabelle 11: Färbe-Protokoll für ChrA.....	42
Tabelle 12: Färbe-Protokoll für SF-1.....	43
Tabelle 13: Rate der angewachsenen Tumore je ausgewerteter Entität in Prozent. N/Q = nicht quantifizierbar, *bei zwei Tumoren N/Q.....	47
Tabelle 14: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der GEP-NET .....	50
Tabelle 15: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der NNR-Karzinome.	52
Tabelle 16: Ki67-Indices mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der Phäochromozytome .....	54
Tabelle 17: ChrA-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der GEP-NET.....	56
Tabelle 18: ChrA-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der Phäochromozytome .....	59
Tabelle 19: SF-1-Werte mit Standardabweichung und zugehöriger Signifikanz der NNR-Karzinome..	61
Tabelle 20: PASS: Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score; zur Differenzierung benigne versus maligne; adaptiert nach [66], [63] .....	73

#### **7.4. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Felix Beuschlein, der sich stets Zeit nahm, mir bei kniffligen Fragen zu helfen, wertvolle Denkanstöße gab und generell immer ein offenes Ohr für mich hatte. Auch Frau Dr. Constanze Hantel danke ich. Eine sehr wichtige Person im Labor war Frau Brigitte Mauracher, die sich meiner in jeder Angelegenheit annahm und mich durch ihre herzliche Art aufgeheitert hat. Unendlich dankbar bin ich meinem besten Freund Dr. Minh Schumacher, der mich in all den Jahren so treu und konstruktiv begleitet hat. Ebenfalls bei Frau Dr. Julia Neitzel möchte ich mich bedanken, dass sie mich hinsichtlich der Statistik beraten hat. Nicht unerwähnt bleiben soll meine Freundin Dr. Katharina Singer, die mir zuletzt viel Zeit geopfert hat.

Neben all der fachlichen Expertise möchte ich meine Familie erwähnen, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit wahrscheinlich nicht fertig geworden wäre. Neben vielen Stunden der Kinderbetreuung haben mich mein Mann und meine Eltern auch in der Fertigstellung der Arbeit seelisch motiviert.

**Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung Patienten-individueller Tumormodelle für endokrine Tumore“ selbständig 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.

Wörthsee, den 31.10.2018

---

Franziska-Helene Scheller