

HABILITATIONSSCHRIFT ASS.-PROF., UNIV. ZÜRICH, DR. MED. SVENJA NÖLTING

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK IV
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. M. REINCKE



UNTERSUCHUNG NEUER MOLEKULAR-GEZIELTER THERAPIEOPTIONEN FÜR
NEUROENDOKRINE TUMORE, PHÄOCHROMOZYTOME UND PARAGANGLIOME
IN VITRO, IN VIVO UND *EX VIVO* AN HUMANER PRIMÄRKULTUR SOWIE
CHARAKTERISIERUNG UND ÜBERWINDUNG VON THERAPIERESISTENZEN

KUMULATIVE HABILITATIONSSCHRIFT

ZUR ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI

FÜR DAS FACH INNERE MEDIZIN UND ENDOKRINOLOGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

VORGELEGT VON ASS.-PROF., UNIV. ZÜRICH, DR. MED. SVENJA NÖLTING

2022

I	EINFÜHRUNG: HINTERGRUND UND RATIONALE	3
II	ZIELSETZUNG: INDIVIDUALISIERTE MOLEKULAR-GEZIELTE THERAPIEKOMBINATIONEN FÜR PHÄOCHROMOZYTOME, PARAGANGLIOME UND NEUROENDOKRINE TUMORE (PRÄZISIONSONKOLOGIE)	7
III	ZUSAMMENFASSUNG	8
IV	EINZELPROJEKTE	10
IV.1	ANTI-TUMOR POTENTIAL SIMULTANER INHIBIERUNG MULTIPLER SIGNALWEGE IM PHÄOCHROMOZYTOM <i>IN VITRO</i>	10
IV.2	STARKES ANTI-TUMOR POTENTIAL EINER MOLEKULAR-GEZIELTEN THERAPIEKOMBINATION IM MALIGEN PHÄOCHROMOZYTOM <i>IN VIVO</i>	11
IV.3	HIN ZUR PRÄZISIONSONKOLOGIE: MULTIPLE TESTUNG MOLEKULAR-GEZIELTER THERAPIEOPTIONEN ALLEINE UND IN KOMBINATION AN HUMANER PHÄOCHROMOZYTOM/PARAGANGLIOM PRIMÄRKULTUR, EINER MURINEN SDHB KNOCK-OUT (-/-) ZELLINIE UND 3D PHÄOCHROMOZYTOM SPHEROIDEN	13
IV.4	AUSWEITUNG DER AM PHÄOCHROMOZYTOM MODELL GEWONNENEN ERKENNTNISSE AUF ANDERE ZELLMODELLE: SIMULTANE INHIBIERUNG MULTIPLER SIGNALWEGE IN GASTROENTEROPANKREATISCHEN/PULMONALEN NEUROENDOKRINEN TUMOR, PHÄOCHROMOZYTOM UND HEPATOZELLULÄREN KARZINOM ZELLINIEN	15
IV.5	SYNERGISMUS DES SELEKTIVEN PI3K α INHIBITORS ALPELISIB (BYL719) IN KOMBINATION MIT DEM mTORC1 INHIBITOR EVEROLIMUS IN PANKREATISCHEN NEUROENDOKRINEN TUMOR ZELLINIEN UND INDUKTION DER SOMATOSTATINREZEPTOR 2 RE-EXPRESSION	16
IV.6	DIE BEDEUTUNG DER SELEKTIVEN GSK3 α/β HEMMUNG IN PANKREATISCHEN, DUODENALEN UND PULMONALEN NEUROENDOKRINEN TUMOR ZELLINIEN.....	18
IV.7	ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ERSTEN STABIL EVEROLIMUS-RESISTENTEN PANKREATISCHEN NEUROENDOKRINEN TUMOR ZELLINIE SOWIE RESISTENZÜBERWINDUNG DURCH GSK3 HEMMUNG	20
V	LITERATUR	22

I Einführung: Hintergrund und Rationale

Phäochromozytome (PCCs) und Paragangliome (PGLs) sind seltene katecholaminproduzierende neuroendokrine Tumore des chromaffinen Gewebes des Nebennierenmarks (PCC) oder der extraadrenalen Paraganglien (PGL). Ungefähr 10% aller PCCs, jedoch ein höherer Anteil von circa 35-40% aller PGLs sind maligne und metastasieren. Da es keine klaren histologischen Merkmale für Malignität gibt und theoretisch alle PCCs/PGLs metastasieren können, wurde „maligne“ von der WHO als „metastasiert“ definiert (1). Die 5-Jahres Überlebensrate liegt im metastasierten Stadium bei etwa 60%-70%.

In Deutschland gibt es noch keine offiziell zugelassenen Therapiemöglichkeiten und keine konkrete Leitlinienempfehlung für das metastasierte PCC/PGL, auch wenn es, wie kürzlich zusammengefasst (2-4), einen praktizierten Standard gibt (Abb. 1).

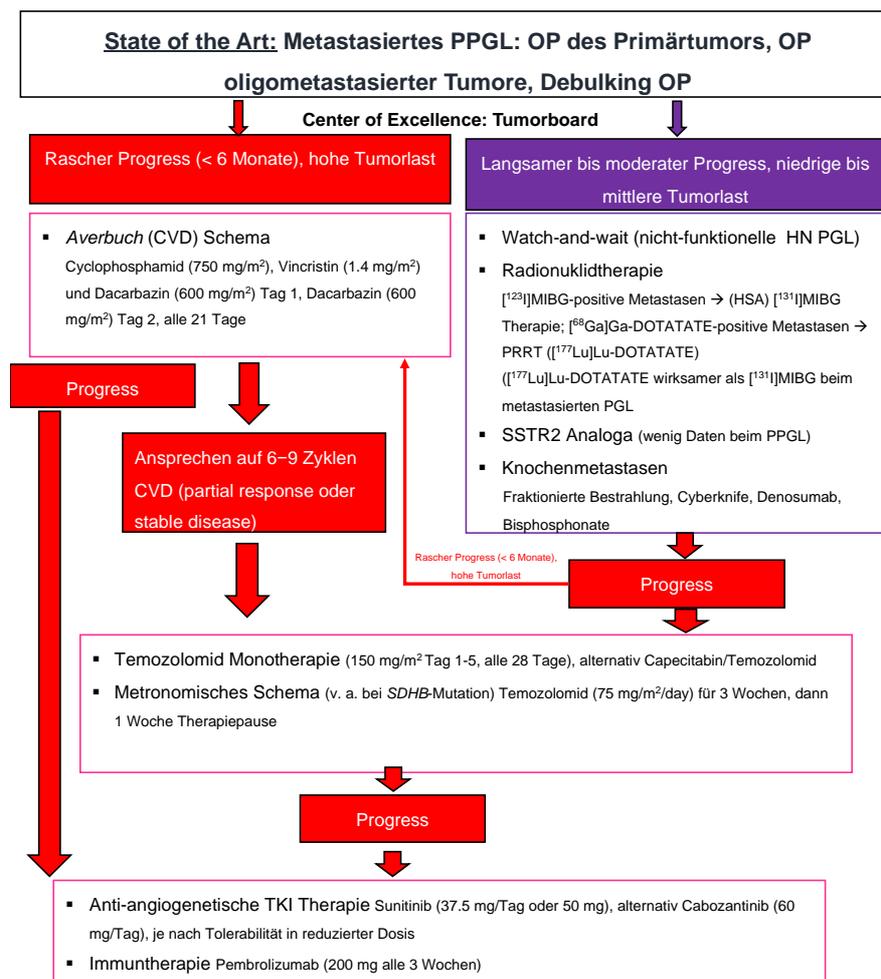


Abb. 1, modifiziert nach (3): Therapie des malignen PCC/PGL (PPGL), TKI: Tyrosin-Kinase-Inhibitor

Bei rasch progredienten metastasierten PCCs/PGLs wird standardmäßig die Chemotherapie nach dem Averbuch-Schema (CVD: Cyclophosphamid, Vincristin und Dacarbazin) eingesetzt, ebenso wie fallabhängig eine Erhaltungs- oder auch primär eine Monotherapie mit Temozolomid. Bei langsam oder moderat wachsenden Tumoren hingegen finden in der Erstlinientherapie das Watch-and-Wait Konzept und die Radionuklidtherapie mit Meta-^[131I]Jodbenzylguanidin (^[131I]MIBG) oder neuerdings die Somatostatinrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie (PRRT) Anwendung. Ferner können alternativ bzw. in der Zweit- oder Drittlinientherapie der Multityrosin-Kinase-Hemmer Sunitinib sowie der c-Met Inhibitor Cabozantinib off-label eingesetzt werden. Sunitinib wurde in der FIRST-MAPP Studie, der ersten randomisierten Placebo-kontrollierten Phase II Studie bei Patienten (n=74) mit malignem PCC/PGL, getestet, jedoch steht die Datenauswertung noch aus. Die Wirksamkeit von Cabozantinib wird gerade in einer kleinen prospektiven Studie untersucht. In einer kürzlich publizierten prospektiven Phase II Studie zur Immuntherapie (Pembrolizumab) am malignen PCC/PGL zeigt sich eine geringe Ansprechrate bei einer moderaten Disease Control Rate von 73% über 6 Monate, sodass dies als Alternative in der Drittlinie erwogen werden kann (5).

Aufgrund des Mangels an zugelassenen Therapieoptionen werden neuartige, insbesondere molekular-gezielte Therapiestrategien, gegebenenfalls in Kombination miteinander, dringend benötigt.

Abb. 2 zeigt die drei molekularen Cluster, denen circa 80% aller PCCs/PGLs in Abhängigkeit von ihrer zugrundeliegenden Keimbahnmutation (30-40% aller PCC/PGL Patienten) oder somatischen Mutation (weitere 40-50% aller PCCs/PGLs) zugeordnet werden können, und die darauf basierenden möglichen molekular-gezielten Therapieoptionen (2,3,6,7).

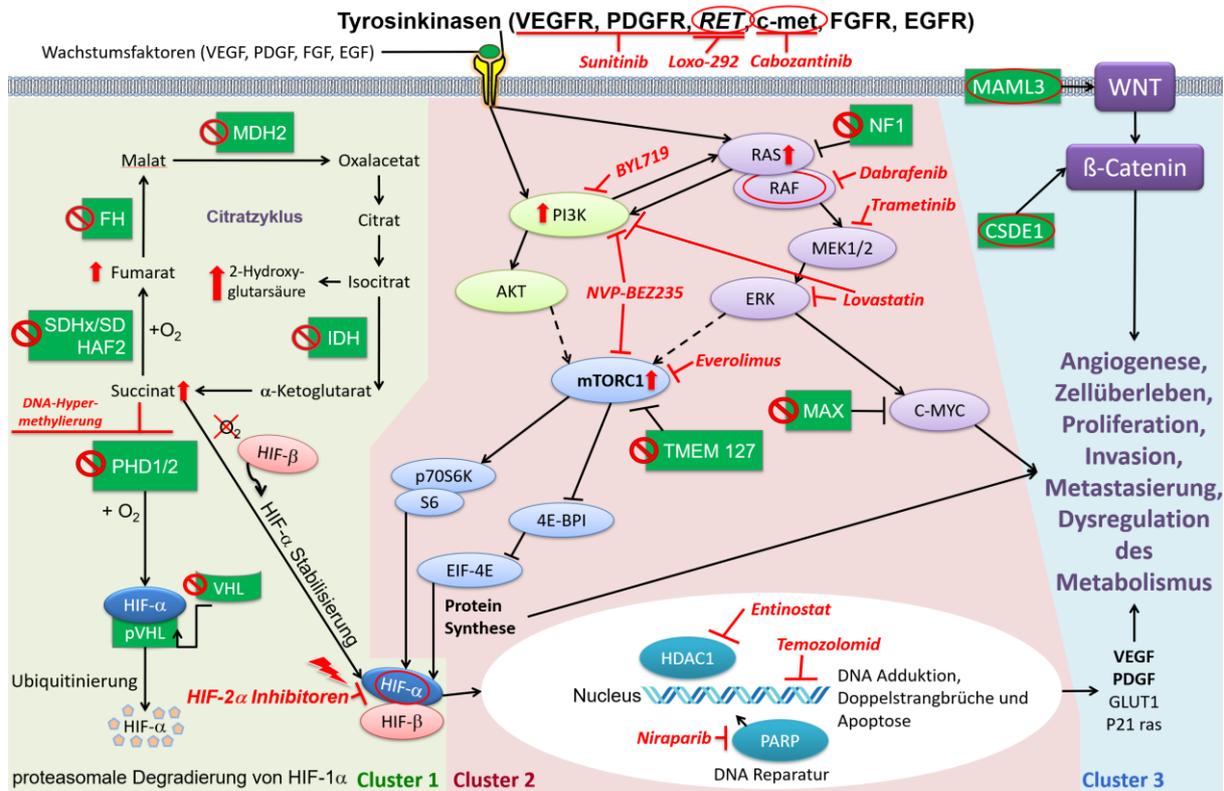
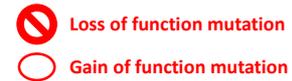


Abb.2 (8) & (Nölting et al., Jahrbuch des Tumorzentrums München, TZM Essentials, 2020): Loss und gain of function Mutationen der drei molekularen Cluster, denen ca. 80% aller PCCs/PGLs anhand ihrer zugrundeliegenden Keimbahn- oder somatischen Mutationen zugeordnet werden können; in rot sind die darauf basierenden molekular-gezielten Therapieoptionen dargestellt, die im Rahmen dieser Habilitationsschrift an verschiedenen PCC/PGL Modellen und auch an neuroendokrinen Tumormodellen untersucht wurden. **Cluster 1:** Zum sogenannten Pseudohypoxie-Cluster (Cluster 1) gehören Mutationen in Genen für Krebszyklus-Enzyme wie Succinatdehydrogenase-Untereinheiten (SDHx [SDHA, SDHB, SDHC, SDHD]), Succinatdehydrogenasekomplex-Assemblierungsfaktor-2 (SDHAF2), Fumarathydratase (FH), Malatdehydrogenase 2 (MDH2), Isocitratdehydrogenase (IDH), für den Hypoxie-induzierbaren Faktor 2α (HIF-2α), sowie den von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (VHL) und die egl-9-Prolylhydroxylase 1 und 2 (PHD1/2 oder EGLN1/2). Cluster 1 wird als Pseudohypoxie-Cluster bezeichnet, da es einen hypoxischen Zustand der Zelle imitiert: Der Krebszyklus (Citratzyklus) wird durch Mutationen in oben genannten Genen unterbrochen. Die resultierende Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung führt zur Akkumulation von Onkometaboliten wie Succinat, Fumarat und 2-Hydroxyglutarat, was wiederum zur DNA-Hypermethylierung und Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene führt, u. a. PHD1/2 (EGLN1/2). Die Inaktivierung von PHD1/2 (EGLN1/2) führt zu verminderter HIF-α-Hydroxylierung und -Ubiquitinierung/Degradierung (HIF-α wird stabilisiert). Die HIF-α-Degradierung ist zudem VHL-abhängig. Somit führen auch VHL-Mutationen zu einer HIF-α-Stabilisierung. Über Stabilisierung und Akkumulation von HIF-α fördern Cluster 1-Mutationen die Angiogenese (u. a. Transkription von vascular endothelial growth factor [VEGF], platelet-derived growth factor [PDGF]), Tumoringression, Metastasen und andere zelluläre Prozesse. HIF-α ist ein Schnittpunkt von Cluster 1 und Cluster 2 und verbindet beide miteinander. **Cluster 2:** Zum Kinase-Signalweg-Cluster gehören Mutationen in Genen für Rearrangements-during-transfection (RET)-Protoonkogen, Neurofibromin 1 (NF1)-Tumorsuppressor, H-RAS- und K-RAS-Protoonkogen, Transmembranprotein 127 (TMEM127) und Myc-assoziiertes Protein X (MAX). All diese Gene sind in die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-assoziierten Signalwege involviert. RTKs (unter anderem RET, VEGF-Rezeptor, c-met) aktivieren über Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg, der das Tuberöse-Sklerose-Protein 1/2 (TSC1/2) inhibiert. Dadurch wird das Mammalian target of rapamycin (mTORC1) enthemmt; mTORC1 phosphoryliert und aktiviert verschiedene Proteine, u. a. p70S6-Kinase (p70S6K), welche p70S6 phosphoryliert. Aktiviertes p70S6 fördert Zellwachstum, Zellteilung und Zellüberleben und führt, neben weiteren Effekten, auch zur Proteinbiosynthese von HIF-1α, welches

Angiogenese (u. a. VEGF-/ PDGF-Transkription), Invasion und Metastasierung unter hypoxischen oder pseudohypoxischen Bedingungen fördert. AKT hemmt außerdem die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3). RTKs (u. a. RET) aktivieren auch den RAS/RAF/ERK-Signalweg, der auch mTORC1 über Zwischenschritte aktiviert. PI3K und RAS aktivieren sich gegenseitig. NF1-Mutationen führen zur Enthemmung von RAS, TMEM127-Mutationen zur Enthemmung von mTORC1. Der Tumorsuppressor MAX antagonisiert MYC-vermitteltes Zellüberleben, Proliferation und Angiogenese. MAX-Mutationen fördern daher Proliferation und Angiogenese. **Cluster 3:** Zum Wnt-Signalweg-Cluster zählen somatische Mutationen in den Fusionsgenen Cold shock domain containing E1 (CSDE1) und Mastermind-like transcriptional coactivator 3 (MAML3). Diese Mutationen aktivieren das Wnt-/β-Catenin-Signaling, was Zellüberleben, Angiogenese, Invasion und Metastasierung fördert.

Auch für neuroendokrine Tumore (NET) des gastroenteropankreatischen Systems gibt es nur wenige offiziell zugelassene Therapieoptionen und ihre Inzidenz steigt stetig. Daher ist es auch hier essentiell, neue molekular-gezielte Therapieoptionen zu finden. Neben dem Multityrosin-Kinase-Inhibitor Sunitinib, welcher nur für pankreatische NET zugelassen ist, und den Somatostatinanaloga, die nur bei gastroenteropankreatischen/pulmonalen NET G1/G2 bis zu einem Ki-67 von 10% als anti-proliferative Therapie zugelassen sind, ist der mTORC1 Inhibitor Everolimus die einzig offiziell zugelassene molekular-gezielte Therapieoption für gastroenteropankreatische und pulmonale NET und besitzt einen hohen Stellenwert in der Zweitlinientherapie, seltener auch in der Erstlinientherapie (zusammengefasst in (9)). Jedoch kommt es trotz zunächst guter Krankheitsstabilisierung unter Everolimus regelmäßig nach weniger als einem Jahr zu einer Resistenzentwicklung (10).

In gastroenteropankreatischen NETs finden sich - im Gegensatz zu PCCs/PGLs - nur selten bekannte auslösende somatische oder Keimbahn-Mutationen. Daher ist eine an den molekularen Signalwegsveränderungen im Tumor orientierte Erforschung möglicher Resistenzmechanismen besonders wichtig.

II Zielsetzung: Individualisierte molekular-gezielte Therapiekombinationen für Phäochromozytome, Paragangliome und neuroendokrine Tumore (*Präzisionsonkologie*)

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit sollten daher an Phäochromozytomen, Paragangliomen und neuroendokrinen Tumoren neue individualisierte molekular-gezielte Therapien alleine und insbesondere auch in Kombination untersucht werden. Über simultane Inhibierung multipler intrazellulärer Signalwege sollten zelluläre „Escapemechanismen“ bzw. die Entwicklung von Resistenzen, wie gegenüber dem mTORC1 Inhibitor Everolimus, verhindert bzw. überwunden werden und darüber hinaus synergistische Effekte erzielt werden. Diese Hypothese sollte an verschiedenen Modellen *in vitro*, *in vivo* und erstmals auch *ex vivo* an humaner Primärkultur geprüft werden.

III Zusammenfassung

Zunächst konnte im Rahmen dieser kumulativen Habilitation an murinen Phäochromozytom Zelllinien *in vitro*, dem am besten etablierten Phäochromozytom Zellmodell, gezeigt werden, dass eine simultane Inhibierung multipler molekularer Signalwege (PI3K/AKT, mTORC1, ERK1/2) über Kombinationstherapien in niedrig klinisch relevanten Dosen zu signifikant gesteigertem Anti-Tumorpotential führte, verglichen mit den Einzelsubstanzen allein. Des Weiteren konnte die Effizienz von Kombinationstherapien *in vivo* am Phäochromozytom Mausmetastasenmodell bestätigt werden: Eine Kombinationstherapie zweier bereits für andere Indikationen zugelassener, gut verträglicher molekular-gezielter Medikamente (Lovastatin plus 13 *cis*-Retinsäure) konnte die Phäochromozytomentstehung *in vivo* teils vollständig verhindern.

Der translationale Aspekt der Arbeit konnte weiter ausgebaut werden durch erstmalige Etablierung einer Methodik zur multiplen Medikamententestung an humaner Phäochromozytom/Paragangliom Primärkultur von an unserer Klinik operierten Patiententumoren. Mittels dieser Methodik können die molekular-gezielten Therapiekombinationen individuell an die verschiedenen Patiententumore angepasst werden. Hierbei konnte auch bereits eine sehr effiziente klinisch hochrelevante Medikamentenkombination aus Alpelisib (BYL719) plus Everolimus identifiziert werden – beide Medikamente sind bereits in der Brustkrebstherapie zugelassen. Die Effizienz dieser Medikamentenkombination konnte an komplementären murinen Zelllinien- und 3D Spheroidmodellen bestätigt werden. Aktuell testen wir diese Medikamentenkombination *in vivo* am Allograft Phäochromozytom Mausmodell. Zudem erfolgte eine Analyse somatischer und Keimbahnmutationen in allen untersuchten Patiententumoren. Diese Arbeit legt somit den Grundstein für die Implementierung der personalisierten Therapie (Präzisionsonkologie) für Phäochromozytome und Paragangliome. Zugleich ist sie die Basis meines bereits in Begutachtung befindlichen DFG Antrages mit dem Titel „Die molekulare Pathologie von Phäochromozytomen/Paragangliomen und molekular gezielte Therapien auf Basis zugrunde liegender (somatischer und Keimbahn-)Mutationen: Hin zur Präzisionsmedizin“ im Rahmen der 2. Förderperiode des Transregio-

Sonderforschungsbereiches CRC/TRR205/1 *The Adrenal Gland: Central Relay in Health and Disease* (Standortsprecher Martin Reincke).

Das Prinzip multipler Signalwegshemmung und hierdurch individueller Resistenzüberwindung wurde erfolgreich auch auf die gastroenteropankreatischen und pulmonalen neuroendokrinen Tumore (NETs) übertragen. Neben dem PI3K/AKT und mTORC1 Signalweg konnte der GSK3 α/β Signalweg als besonders bedeutsam für synergistische Anti-Tumor Effekte und Resistenzüberwindung in NETs identifiziert werden: So konnte zunächst gezeigt werden, dass die Kombination des PI3K α Inhibitors Alpelisib (BYL719) mit dem mTORC1 Inhibitor Everolimus in pankreatischen NET Zelllinien das Tumorzellüberleben synergistisch hemmte, dabei zugleich zu einer synergistischen Induktion der Somatostatinrezeptor 2 Expression und zu einer synergistischen GSK3 α/β Hemmung führte. Hierzu passend, konnte auch über eine selektive GSK3 α/β Hemmung mittels AR-A014418 (AR) das Zellüberleben duodener NET Zellen (GOT) und pankreatischer NET Zellen (BON1) signifikant gehemmt werden - einhergehend mit ausgeprägter GSK3 β Hemmung. AR wirkte in pankreatischen NET Zelllinien zudem synergistisch mit Lovastatin und 5-Fluorouracil.

Schließlich gelang uns zudem erstmals die Etablierung stabil gegenüber Everolimus resistenter pankreatischer NET Zelllinien (BON1 RR1 & RR2), in denen sich eine Überaktivierung der GSK3 als möglicher Resistenzmechanismus darstellte. Die Resistenz konnte *in vitro* erfolgreich mittels Alpelisib (BYL719), welches zugleich die GSK3 hemmte, überwunden werden. Diese *in vitro* Versuche stellen die Grundlage unserer aktuell über die Else Kröner-Fresenius Stiftung finanzierten laufenden Tierversuche am orthotopen intrapankreatischen Everolimus-resistenten NET Xenograft Mausmodell dar.

IV Einzelprojekte

IV.1 Anti-Tumor Potential simultaner Inhibierung multipler Signalwege im Phäochromozytom *in vitro*

Zunächst wurden an zwei murinen Phäochromozytom (PCC) Zelllinien (einer maligneren und einer benigneren Zelllinie), dem am besten etablierten PCC Modell *in vitro*, neue molekular-gezielte Therapieoptionen alleine und in Kombination untersucht (11). Da viele PCC/PGL-begünstigende Mutationen mit Alterationen des PI3K/AKT, mTORC1 und RAS/RAF/MEK/ERK Signalweges assoziiert sind (Abb. 1), wurde insbesondere die Wirksamkeit von Inhibitoren dieser Signalwege evaluiert (11). Ich konnte zunächst zeigen, dass der IGF1 Rezeptor Inhibitor NVP-AEW541 erst in hohen Dosen signifikant das Zellüberleben über Inhibierung des PI3K/AKT Signalweges hemmte. Jedoch zeigte sich eine kompensatorische mTORC1 und ERK Aktivierung als möglicher „Escapemechanismus“. Signifikant wirksamer in niedrigen Dosen war dann der kombinierte PI3K/mTORC1/2 Inhibitor NVP-BEZ235 über duale Signalwegshemmung. Jedoch führte auch diese Behandlung zur Aktivierung des ERK Signalweges. Somit wurden die Zellen dann mit einer Kombination aus NVP-BEZ235 und dem Statin Lovastatin, welches als ERK Inhibitor in der Literatur beschrieben wurde, behandelt. Lovastatin verbesserte signifikant die Effizienz von NVP-BEZ235 alleine und konnte die ERK Aktivierung verhindern (Abb. 3).

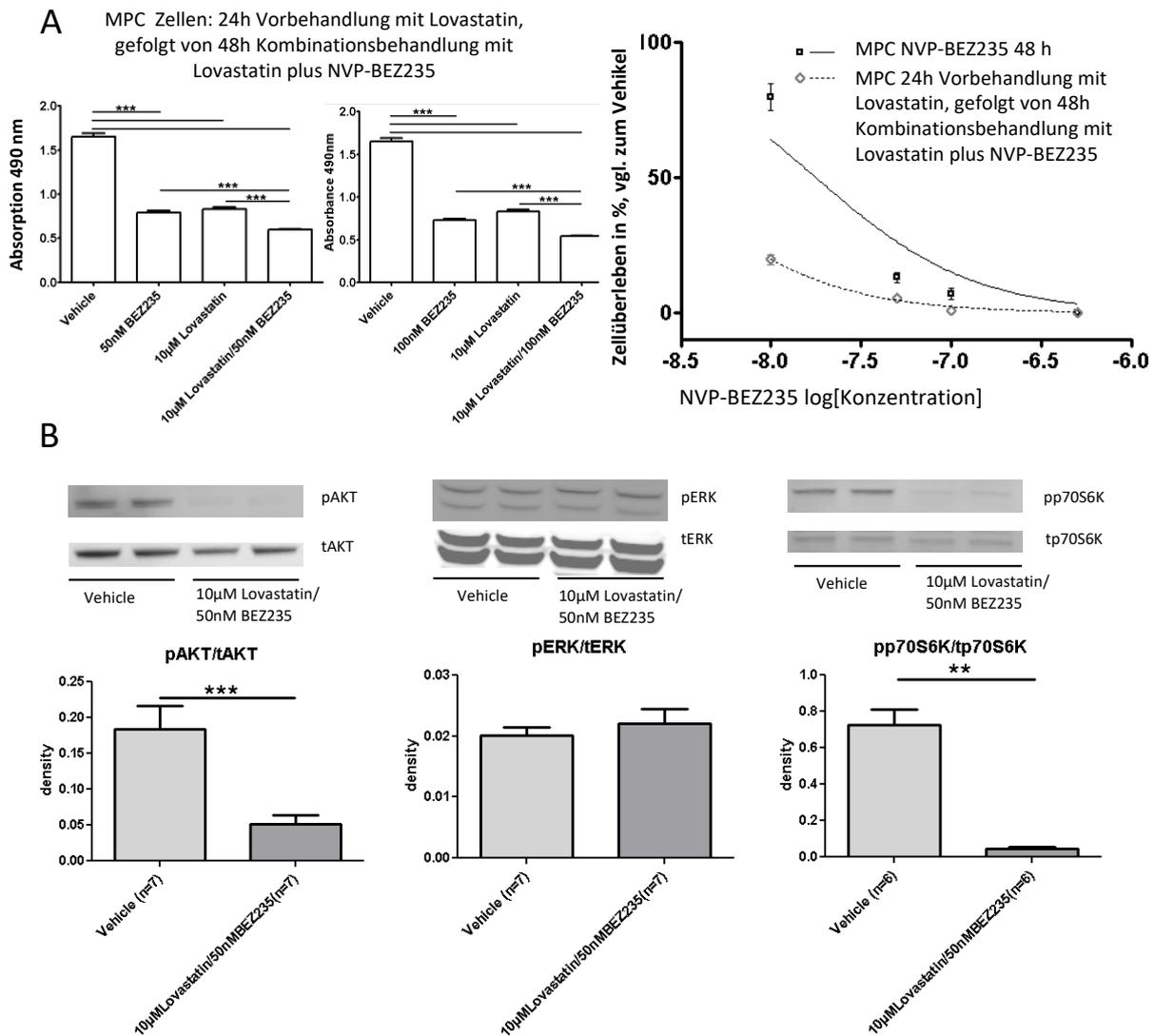


Abb. 3 (11) Murine PCC Zelllinien (MPC): (A) Zellüberleben nach NVP-BE2235 bzw. Lovastatin alleine und nach der Kombination beider Medikamente. (B) Signalweganalysen nach Kombinationsbehandlung mit Lovastatin und NVP-BE2235: Lovastatin verbesserte signifikant die Effizienz von NVP-BE2235 alleine durch Antagonisierung der NVP-BE2235-induzierten ERK Aktivierung.

Simultane Inhibierung von multiplen intrazellulären Signalwegen (PI3K/AKT, mTORC1/2, ERK) ist somit signifikant effektiver als die Inhibierung eines Signalweges oder auch zweier Signalwege in PCC Zellen (11). Diese Publikation war der meist zitierte Artikel des *Journal of Molecular Endocrinology* im Jahr 2012.

IV.2 Starkes Anti-Tumor Potential einer molekular-gezielten Therapiekombination im malignen Phäochromozytom *in vivo*

Anschließend sollten die oben beschriebenen Erkenntnisse aus dem *in vitro* Modell auf ein aggressives PCC Allograft Mausmetastasenmodell *in vivo* übertragen werden. Da zu Beginn der *in vivo* Studie

bereits klar war, dass NVP-BEZ235 nie in die Klinik eintreten würde, u. a. aufgrund von schlechter oraler Bioverfügbarkeit, testeten wir als PI3K- und ERK-Inhibitor das bereits seit langen Jahren in der Lipidsenkung zugelassene Statin Lovastatin in Kombination mit dem metabolisch komplementär wirkenden seit Jahren für die Aknetherapie zugelassenen Vitamin A Derivat 13-cis-Retinsäure (12). Zudem ist das Enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) Reduktase, das durch Lovastatin gehemmt wird, auch am Wirkmechanismus der 13-cis Retinsäure beteiligt. Ferner ist in der Literatur beschrieben, dass 13-cis Retinsäure die Rückbildung prämaligener Läsionen von Haut- und Schleimhaut fördern, der Entstehung von Zweittumoren im Kopf/Hals Bereich vorbeugen sowie die Rezidivwahrscheinlichkeit von Neuroblastomen nach zytotoxischer Therapie senken kann. Ein besonders interessanter Aspekt ist hierbei das sog. „Re-Purposing“, d. h. der Einsatz kostengünstiger für andere Indikationen bereits zugelassener Medikamente für eine neue Indikation in der Tumorthherapie. 13-cis Retinsäure scheint insbesondere in Bezug auf die Prävention des Auftretens von Zweittumoren, Rezidiven oder prämaligen Läsionen erfolgreich zu sein. Da ca. 30-40% der PCC/PGL Patienten eine Tumor-begünstigende Keimbahnmutation („Suszeptibilitätsmutation“) aufweisen, sind hier die präventiven Effekte von 13-cis Retinsäure beim malignen PCC/PGL von höchstem Interesse. Somit wurden den Mäusen die Einzelsubstanzen und auch die Kombination von Lovastatin und 13-cis Retinsäure in therapeutisch relevanten Dosen oral 24 Stunden vor subkutaner Tumorzellinjektion verabreicht. Während Lovastatin alleine in therapeutisch relevanten Dosen signifikant das Tumorwachstum in den Mäusen hemmte, begünstigte 13 cis-Retinsäure alleine in klinisch relevanten Dosen signifikant das Tumorwachstum. Die Mäuse hingegen, denen die Kombination beider Medikamente in therapeutisch relevanten Dosen gegeben wurde, zeigten das langsamste Tumorwachstum, die kleinste Tumorgroße und die kleinste vitale Tumormasse von allen Gruppen [signifikant gegenüber der unbehandelten Kontroll-(Vehikel-)Gruppe]. 4/9 (44%) der Kombinations-behandelten Gruppe entwickelten gar keine sichtbaren Tumore (Abb. 4).

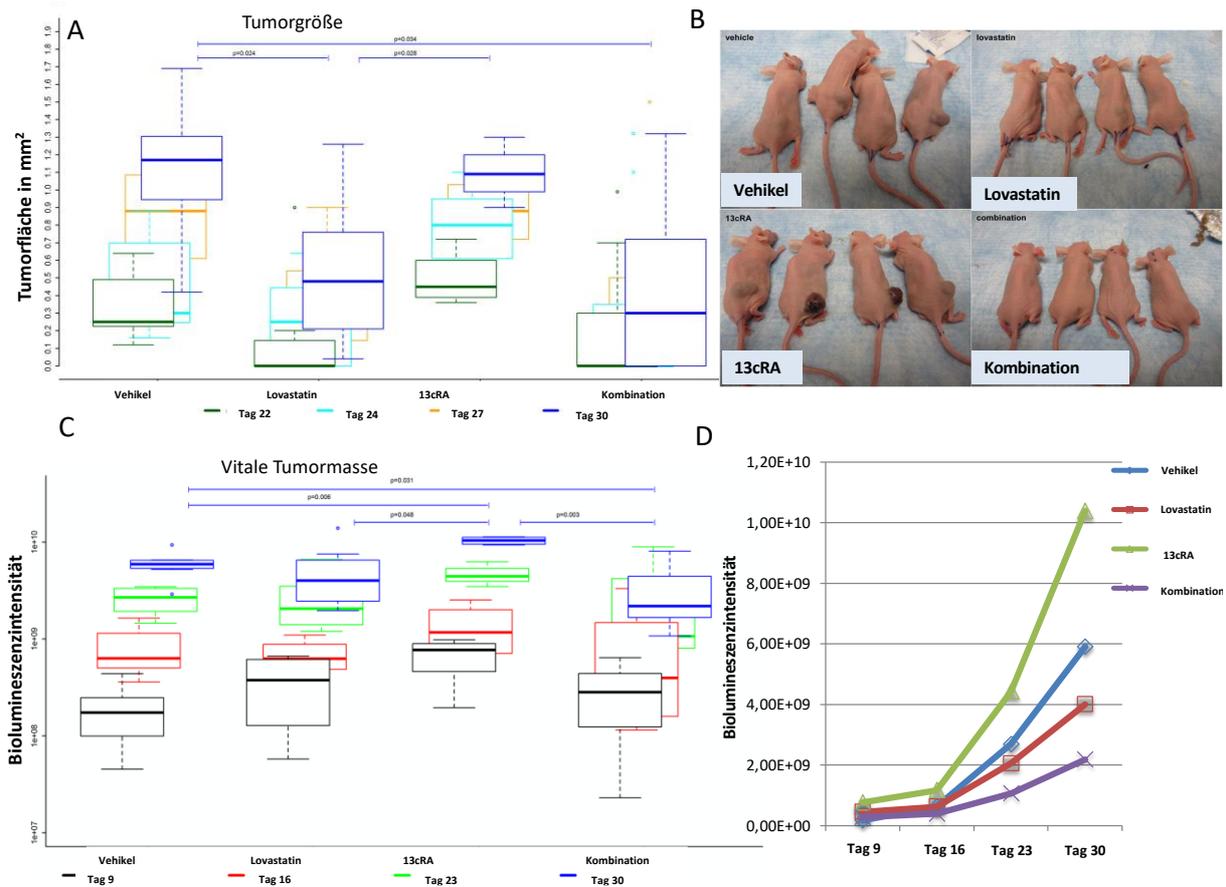


Abb. 4 (12): (A) In der Lovastatin-behandelten und der Kombinations-behandelten Gruppe fanden sich signifikant geringere Tumorgrößen nach 30-tägiger Behandlung, verglichen mit der Kontroll-/Vehikelgruppe, mit den kleinsten Tumoren in der Kombinations-behandelten Gruppe. (B) 4/9 (44%) der Kombinations-behandelten Mäuse entwickelten keine sichtbaren Tumore. (C) Die geringste vitale Tumormasse und (D) das geringste Wachstum der vitalen Tumormasse über die Zeit (30 Tage) fand sich ebenfalls in der Kombinations-behandelten Gruppe (signifikant gegenüber der Vehikelgruppe).

Dies zeigt zum einen die zumindest partielle Übertragbarkeit unserer *in vitro* Ergebnisse auf ein klinisch relevantes *in vivo* Mausmodell. Zum anderen bestätigt es erneut einen Synergismus zweier molekular-gezielter Substanzen - diesmal im Sinne eines „Re-Purposing“ zweier für andere Indikationen bereits zugelassener, gut verträglicher, komplementär wirkender Substanzen in klinisch relevanten Dosen (12).

IV.3 Hin zur Präzisionsonkologie: Multiple Testung molekular-gezielter Therapieoptionen alleine und in Kombination an humaner Phäochromozytom/Paragangliom Primärkultur, einer murinen SDHB knock-out (-/-) Zelllinie und 3D Phäochromozytom Spheroiden

Aufgrund der starken Heterogenität der PCCs/PGLs - je nach zugrundeliegender Mutation und Clusterzugehörigkeit - sollte dann ein System entwickelt werden, um erstmals individualisiert direkt an

humaner PCC/PGL Primärkultur eine Vielzahl von molekular-gezielten Medikamenten zu testen. Die besonders wirksamen Kombinationen sollten dann an etablierten PCC Mauszelllinien, der ersten murinen SDHB^{-/-} Zelllinie sowie an 3D PCC Spheroide getestet werden. In der Tat gelang uns erstmals die Etablierung einer Methode zur Testung molekular-gezielter Therapieoptionen an humaner PCC/PGL Primärkultur aus individuellem Tumorgewebe unserer ins ENS@T Register eingeschlossenen Patienten (8). Diese Primärkulturen wurden von jedem Patiententumor unmittelbar postoperativ isoliert und nach kurzer Rekonvaleszenzzeit von circa 3 Tagen mit mehr als 13 unterschiedlichen molekular-gezielten Medikamenten alleine oder in Kombination stimuliert. Wir konnten hierbei bereits eine hoch effektive Medikamentenkombination aus dem PI3K α Inhibitor Alpelisib (BYL719) und dem mTORC1 Inhibitor Everolimus identifizieren, die in 6 PCC Patienten Primärkulturen zusammengenommen einen synergistischen Effekt zeigte (Abb. 5) (8).

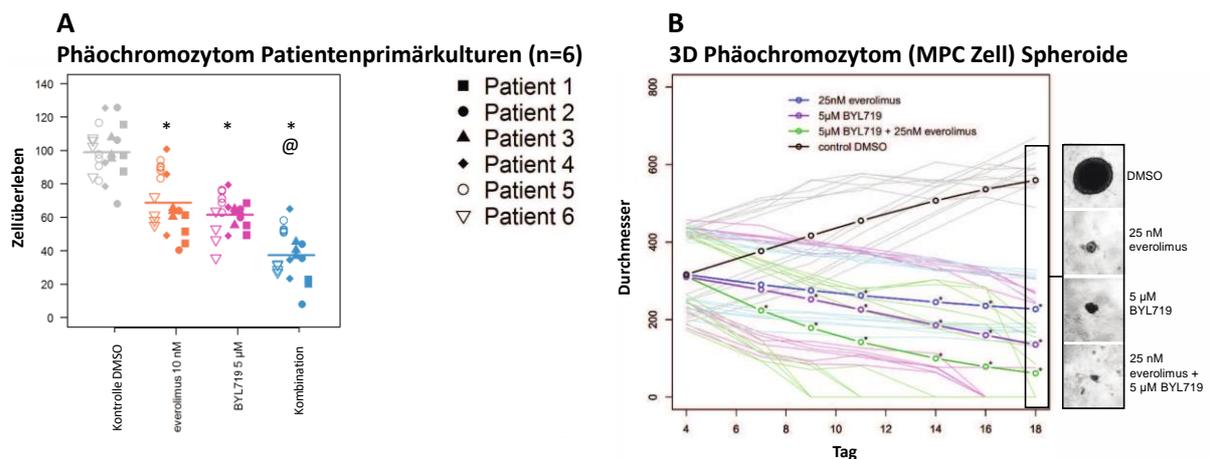


Abb.5 (8) (A) Synergistischer Anti-Tumor Effekt (@) der Kombination von Everolimus und Alpelisib (BYL719) in 6 Phäochromozytom Patientenprimärkulturen, signifikante Abnahme des Zellüberlebens (*) nach Behandlung mit Everolimus, Alpelisib (BYL719) bzw. der Kombination gegenüber der Kontrolle. (B) Signifikante Wachstumsstörung der 3D Phäochromozytom (MPC Zell) Spheroid und teils vollständiger Kollaps nach Kombinationsbehandlung mit Everolimus plus Alpelisib (BYL719).

Diese Kombination wirkte auch in den PCC Zelllinienmodellen synergistisch und führte teils zum vollständigen Kollaps der 3D PCC Spheroid. Die Alterationen der Signalwege in den individuellen Patientenprimärkulturen konnten mittels Westernblottechnologie untersucht werden. Diese Methodik und Ergebnisse ebnet den Weg zur personalisierten molekular-gezielten Kombinationstherapie, um Patiententumore individualisiert zu behandeln (8). Dieser umfassende Forschungsansatz wurde in einem kürzlich in der Fachzeitschrift *Endocrine Related Cancer*

erschienenen Review als der aktuell beste verfügbare Forschungsansatz zitiert (13). Er ist zudem Grundlage meines nun existierenden PCC/PGL Primärkultur Patientenkollektivs aus mittlerweile 25 Patienten und meines bereits in Begutachtung befindlichen DFG Antrages als Primary Investigator mit dem Titel „Die molekulare Pathologie von Phäochromozytomen/Paragangliomen und molekular gezielte Therapien auf Basis zugrunde liegender (somatischer und Keimbahn-)Mutationen: Hin zur Präzisionsmedizin“ im Rahmen des DFG Transregio-Sonderforschungsbereiches CRC/TRR205/1 *The Adrenal Gland: Central Relay in Health and Disease* (Standortsprecher Martin Reincke). Zudem konnten zwischenzeitlich neben den humanen 2D auch humane 3D Primärkulturen aus Patiententumoren etabliert werden und humane Xenograft Mausmodelle aus Patiententumoren befinden sich in der Entwicklung in Kooperation mit dem Helmholtzzentrum München.

IV.4 Ausweitung der am Phäochromozytom Modell gewonnenen Erkenntnisse auf andere Zellmodelle: Simultane Inhibierung multipler Signalwege in gastroenteropankreatischen/pulmonalen neuroendokrinen Tumor, Phäochromozytom und hepatozellulären Karzinom Zelllinien

Das Prinzip der simultanen Inhibierung multipler Signalwege sollte auf gastroenteropankreatische/pulmonale neuroendokrine Tumor (NET) und hepatozellulären Karzinom (HCC) Zelllinien übertragen werden. In diesen Modellen wurde das zur Cholesterinsenkung schon lange zugelassene Lovastatin in Kombination mit dem mTORC1 Inhibitor Everolimus, der für die Therapie gastroenteropankreatischer und pulmonaler NET zugelassen ist, getestet (14). Interessanterweise zeigte diese Kombination in klinisch relevanten Dosen einen additiven Effekt in pulmonalen NET, PCC und HCC Zelllinien. Die Kombination wirkte über simultane EGFR, PI3K/AKT und mTORC1/p70S6K Inhibierung additiv (schematisch in Abb. 6 dargestellt):

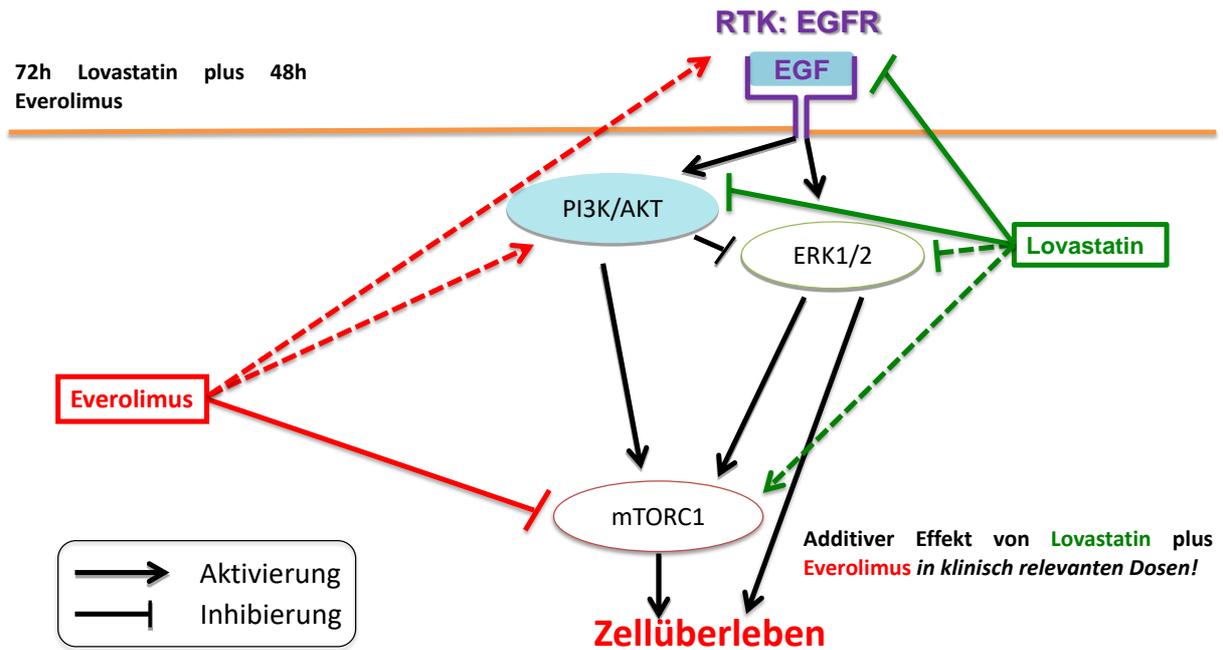


Abb. 6 (14): Simultane Inhibierung von EGFR, PI3K/AKT und mTORC1/p70S6K durch die Kombination von Everolimus plus Lovastatin

In allen Zelllinien hemmte Lovastatin PI3K/AKT und EGFR. Je nach Zelllinie verstärkte Lovastatin die PI3K/AKT und EGFR Hemmung gegenüber Everolimus allein oder schwächte zumindest die Everolimus-induzierte PI3K/AKT und EGFR Aktivierung ab. Everolimus hemmte immer mTORC1/p70S6K. Je nach Zelllinie verstärkte Everolimus wiederum entweder die Lovastatin-induzierte mTORC1/p70S6K Hemmung oder schwächte zumindest die Lovastatin-induzierte mTORC1/p70S6K Aktivierung ab - erneut ein Beleg für die Sinnhaftigkeit einer simultanen Hemmung multipler Signalwege in endokrinen Tumoren (14). In pankreatischen NET (BON1) und duodenalen NET (GOT) Zellen wirkte Lovastatin alleine schwach und entfaltete keinen additiven Effekt in Kombination mit Everolimus.

IV.5 Synergismus des selektiven PI3K α Inhibitors Alpelisib (BYL719) in Kombination mit dem mTORC1 Inhibitor Everolimus in pankreatischen neuroendokrinen Tumor Zelllinien und Induktion der Somatostatinrezeptor 2 Re-expression

Der mTORC1 Inhibitor Everolimus führt bekanntermaßen zu einer kompensatorischen PI3K/AKT Aktivierung als wichtigster „Escapemechanismus“ (Abb. 7) (15-18).

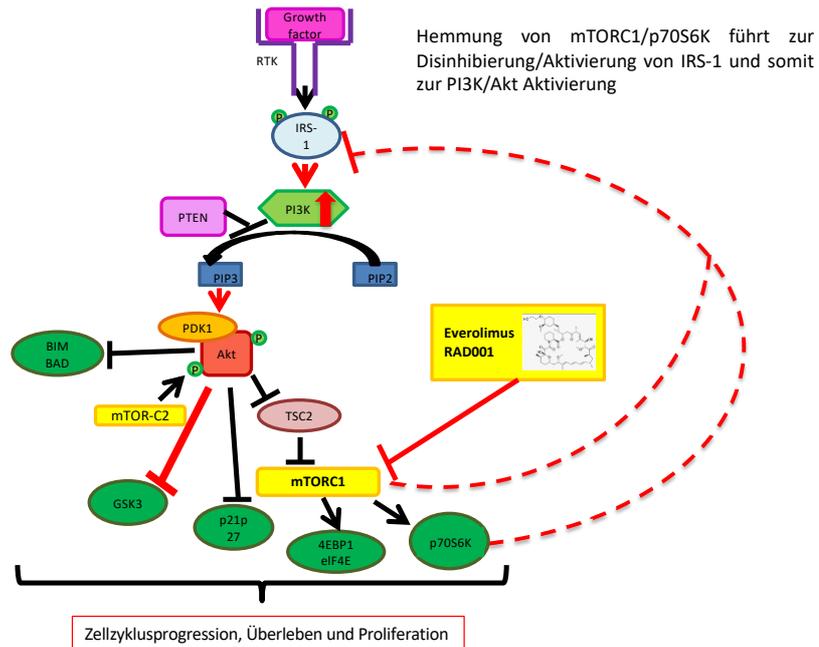


Abb. 7 (19) IRS1/PI3K Aktivierung als „Escapemechanismus“ nach mTORC1 Hemmung durch Everolimus

Daher wurde in Kollaboration mit dem NETZ-Werk, einem Zusammenschluss mehrerer ENETS Centers of Excellence in Deutschland, der kürzlich in den USA zur Behandlung von Brustkrebs zugelassene selektive PI3K α Inhibitor Alpelisib (BYL719) alleine und in Kombination mit Everolimus an humanen pankreatischen und pulmonalen NET Zelllinien untersucht (20). Hier zeigte sich ein synergistischer antiproliferativer Effekt in den humanen pankreatischen NET Zelllinien BON1 und QGP1. Zudem führte BYL719 interessanterweise in den BON1 und pulmonalen NET Zelllinien H727 auch zur signifikanten Zellredifferenzierung mit Hochregulation der Somatostatinrezeptoren 2 (SSTR2) und der CgA Expression. Auch wenn BYL719 alleine in QGP1 Zellen schlecht wirksam war und keine SSTR2 Hochregulation induzierte, führte die BYL719/Everolimus Kombination in niedrig therapeutisch relevanten Dosen sowohl in BON1 als auch in QGP1 Zellen zur signifikanten synergistischen SSTR2 Hochregulation. Dies zeigt nicht nur einen starken synergistischen Effekt zweier bereits im klinischen Gebrauch befindlicher molekular-gezielter Substanzen in pankreatischen NET, sondern legt zudem eine potentielle (Re-)Sensitivierung der NET Zellen gegenüber Somatostatinanaloga sowie gegenüber Somatostatinrezeptor-vermittelter Radionuklidtherapie durch die Kombinationstherapie nahe. Ferner sollte der molekulare Mechanismus der unterschiedlichen Sensitivität der verschiedenen NET Zelllinien gegenüber BYL719 untersucht werden. So zeigte die QGP1 Zelllinie mit der geringsten

Sensitivität gegenüber BYL719 die geringste BYL719-induzierte p70S6K Hemmung, was wiederum auch den Synergismus mit Everolimus erklären könnte. Zudem fand sich in den QGP1 Zellen eine BYL719-induzierte GSK3 Aktivierung (De-phosphorylierung) im Gegensatz zu einer GSK3 Hemmung (Phosphorylierung) in den anderen beiden sensitiveren Zelllinien (20) (Abb. 8).

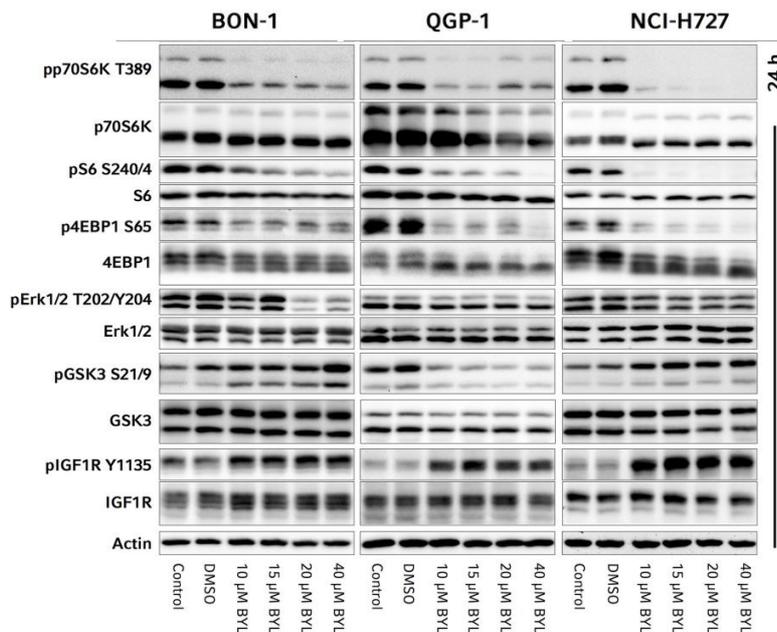


Abb. 8 (20): BYL719 abgekürzt als BYL; Geringste BYL719-induzierte p70S6K Hemmung (höchste pp70S6K Level nach BYL719 Behandlung) in QGP1 Zellen, stärkste GSK3 Aktivierung (GSK3 De-phosphorylierung) in QGP1 Zellen, verglichen mit BON1 und H727 Zellen;

IV.6 Die Bedeutung der selektiven GSK3 α/β Hemmung in pankreatischen, duodenalen und pulmonalen neuroendokrinen Tumor Zelllinien

In einem weiteren Projekt wurde dann die Wirksamkeit des selektiven GSK3 α/β Inhibitors AR-A014418 (AR) an humanen pankreatischen, duodenalen und pulmonalen NET Zelllinien untersucht (21). Die pulmonale H727 und die pankreatische QGP1 Zelllinie zeigten die geringste Sensitivität gegenüber AR, einhergehend mit geringer bzw. fehlender GSK3 β Hemmung, verglichen mit den anderen beiden Zelllinien. Die höchste Sensitivität zeigten die duodenalen GOT Zellen, gefolgt von den pankreatischen BON1 Zellen mit ausgeprägter GSK3 β Hemmung (Abb. 9).

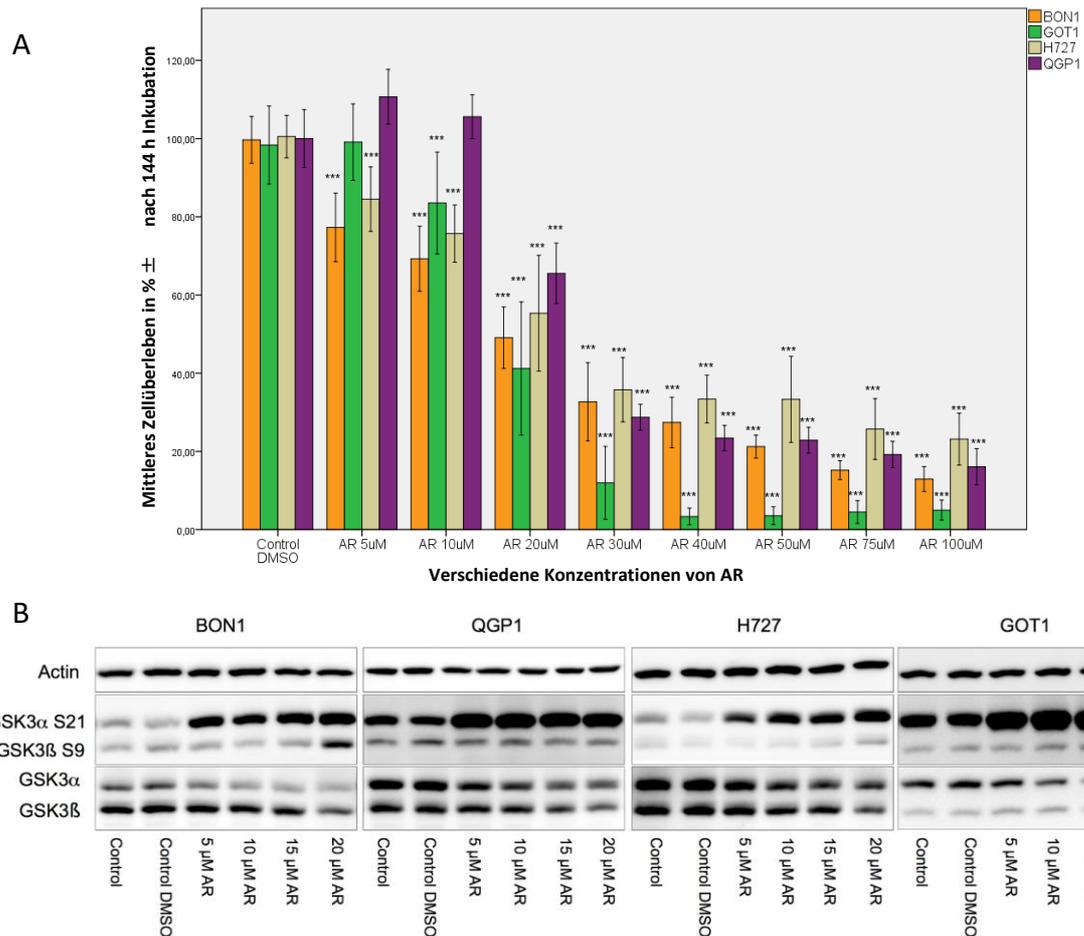


Abb. 9 (21) (A) Zellüberleben pankreatischer (BON1, QGP1), duodenaler (GOT1) und pulmonaler (H727) NET Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Dosen des selektiven GSK3 α/β Inhibitors AR: Höhere Sensitivität der BON1 und GOT1 Zellen, verglichen mit den QGP1 und H727 Zellen, in klinisch potentiell relevanten Dosen bis 20 μ M – möglicherweise aufgrund von (B) stärkerer GSK3 β Inhibierung (Phosphorylierung) in Bon1 und GOT1 Zellen.

AR führte zudem zu einer EGFR und mTORC1/p70S6K Hemmung, jedoch zu einer kompensatorischen AKT und ERK Aktivierung. Die AR-induzierte AKT und ERK Aktivierung konnte durch Lovastatin gehemmt werden, welches in Kombination mit AR in den pankreatischen NET Zelllinien (BON1 und QGP1) synergistisch wirkte. Zudem zeigte sich in den QGP1 Zellen ein synergistischer Anti-Tumor Effekt durch kombinierte Behandlung mit AR und dem in der Behandlung pankreatischer NET Patienten regelmäßig angewandten Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5FU). Diese Daten zeigen neben einer potentiellen Bedeutung der GSK3 α/β in der NET Tumorgenese und Therapie erneut sehr deutlich einen synergistischen inhibitorischen Effekt auf das Tumorzellüberleben durch simultane Inhibierung multipler Signalwege (GSK3 α/β , PI3K/AKT und ERK) (21).

IV.7 Entwicklung und Charakterisierung der ersten stabil Everolimus-resistenten pankreatischen neuroendokrinen Tumor Zelllinie sowie Resistenzüberwindung durch GSK3 Hemmung

Trotz zunächst guter Stabilisierung des Tumorwachstums entwickeln die meisten Patienten nach weniger als einem Jahr eine Resistenz gegenüber dem mTORC1 Inhibitor Everolimus oder zeigen sogar eine a priori Resistenz (10). Daher sollte eine molekulare Charakterisierung der Resistenzmechanismen pankreatischer NET gegenüber Everolimus anhand von Everolimus-resistenten pankreatischen NET Zelllinien erfolgen mit dem Ziel, die Resistenz zu überwinden.

In der Tat gelang uns erstmals die Entwicklung zweier stabil gegenüber Everolimus resistenter pankreatischer NET Zelllinien aus BON1 Zellen (BON1 RR1 und BON1 RR2). Hierfür waren die BON1 Zellen über 24 Wochen kontinuierlich mit einer niedrig therapeutisch relevanten Dosis (10 nM) Everolimus behandelt worden und eine Kontrollzelllinie (BON1 Control DMSO) über 24 Wochen mit einer entsprechenden Dosis des Lösungsmittels (DMSO) (19). Die BON RR1 Zellen zeigten einen 153-fach höheren extrapolierten IC50 von 5200 nM, verglichen zur Kontrollzelllinie (34 nM); die BON1 RR2 zeigten einen 74-fach höheren extrapolierten IC50 von 2500 nM, verglichen zur Kontrollzelllinie (19) (Abb. 10A).

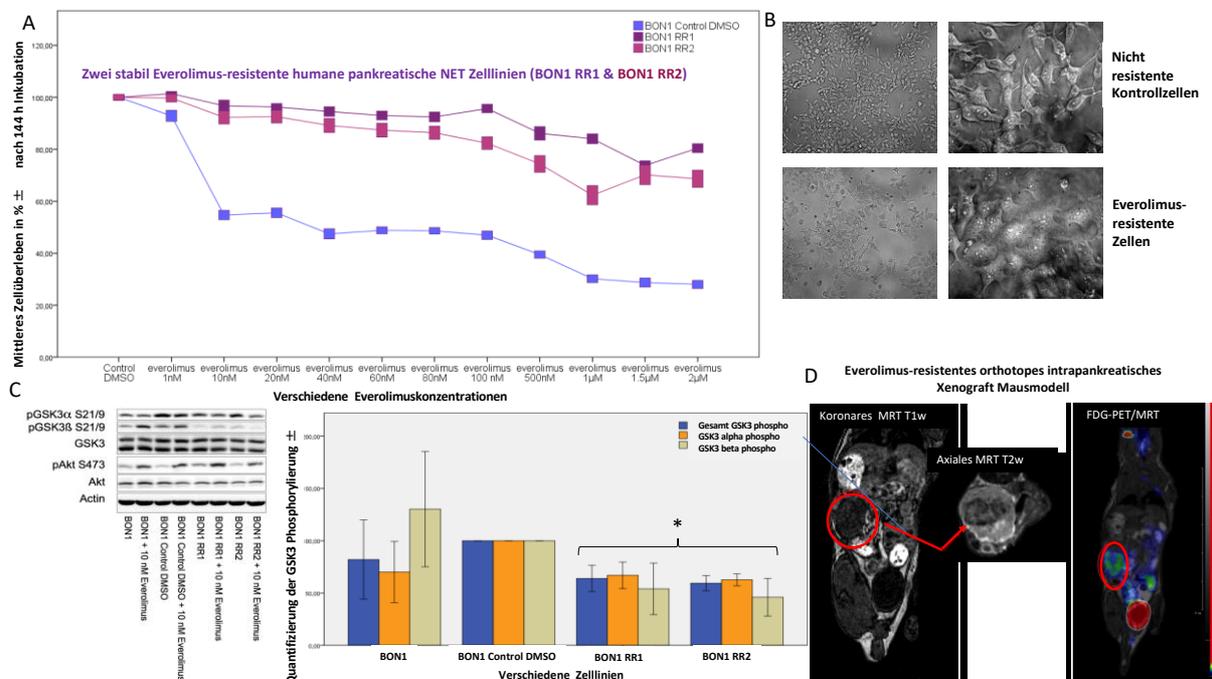


Abb. 10 (19) (A) 153-fach bzw. 74-fach höherer IC50 der Everolimus-resistenten BON1 RR1 bzw. BON1 RR2 Zelllinie, verglichen zur Kontrollzelllinie. (B) Morphologische Unterschiede zwischen den Everolimus-resistenten und den Kontrollzelllinien. (C) Signifikant verminderte GSK3 α / β Phosphorylierung, d. h. GSK3 α / β Überaktivierung, in den BON1 RR1/RR2 Zellen, verglichen zur Kontrollzelllinie (BON1 Control DMSO). (D)

Übertragung der humanen BON1 RR2 Zelllinie auf ein orthotopes intrapankreatisches Xenograft Mausmodell; der intrapankreatische Tumor wird mittels MRT Bildgebung dargestellt (koronare T1w und axiale T2w mit zentraler Nekrose) und speichert FDG im FDG-PET/MRT.

Im Gegensatz zu den anderen Arbeiten (17,18), die bislang die langfristigen Resistenzmechanismen gegenüber Everolimus untersucht hatten, zeigten unsere BON RR1/RR2 Zellen eine stabile Resistenz nach dem Einfrieren, Auftauen und einem behandlungsfreien Intervall von 13 Wochen, sodass sie sich erstmals auch für Tierversuche eignen, in denen die Behandlung erst ab einer bestimmten Tumorgröße begonnen werden soll.

Beide unabhängig voneinander entwickelten resistenten Zelllinien (BON RR1 und RR2) zeigten folgende basale Unterschiede, verglichen mit der nicht resistenten Kontrollzelllinie: Morphologische Veränderungen (Abb. 10B), Zellzyklusarrest mit reduzierter CDK1 (cdc2) Expression, verminderte Autophagie, Überaktivierung von c-met und von GSK3 (Abb.10C). Eine selektive GSK3 Hemmung reduzierte signifikant das BON1 RR1/RR2 Zellüberleben. Eine Resensitivierung der BON1 RR1/RR2 Zellen gegenüber Everolimus konnte durch Kombinationsbehandlung mit dem PI3K α Inhibitor BYL719, der zusätzlich zu einer GSK3 α/β Hemmung führte, in klinisch relevanten Dosen erreicht werden.

Somit konnte der PI3K α Inhibitor BYL719 nicht nur eine SSTR2 Re-expression und mögliche Resensitivierung gegenüber der Somatostatinanalogatherapie induzieren (siehe IV.5), sondern auch die stabil resistenten humanen pankreatischen NET Zellen gegenüber Everolimus resensitivieren.

Neben einer Charakterisierung und Überwindung der Everolimusresistenz *in vitro* gelang uns der Transfer der humanen BON1 RR1/RR2 Zellen auf ein orthotopes intrapankreatisches Xenograft Mausmodell (Abb. 10D), an dem gerade aktuell weitere Versuche *in vivo* durchgeführt werden (19).

Die Untersuchungen an diesem Everolimus-resistenten orthotopen Xenograft Mausmodell werden durch die Else Kröner-Fresenius Stiftung seit 7/2019 bis einschließlich 12/2021 gefördert mit einer Summe von 264.870 Euro.

V Literatur

1. Lam AK. Update on Adrenal Tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of Endocrine Tumours. *Endocr Pathol* 2017; 28:213-227
2. Nölting S, Grossman A, Pacak K. Metastatic Pheochromocytoma: Spinning Towards More Promising Treatment Options. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2018;
3. Nölting S, Ullrich M, Pietzsch J, Ziegler CG, Eisenhofer G, Grossman A, Pacak K. Current Management of Pheochromocytoma/Paraganglioma: A Guide for the Practicing Clinician in the Era of Precision Medicine. *Cancers (Basel)* 2019; 11
4. Fassnacht M, Assie G, Baudin E, Eisenhofer G, de la Fouchardiere C, Haak HR, de Krijger R, Porpiglia F, Terzolo M, Berruti A, clinicalguidelines@esmo.org EGCEa. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020;
5. Jimenez C, Subbiah V, Stephen B, Ma J, Milton D, Xu M, Zarifa A, Akhmedzhanov FO, Tsimberidou A, Habra MA, Rodon Anher J, Fu S, Naing A. Phase II Clinical Trial of Pembrolizumab in Patients with Progressive Metastatic Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Cancers (Basel)* 2020; 12
6. Jochmanova I, Pacak K. Genomic Landscape of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Trends Cancer* 2018; 4:6-9
7. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, Lichtenberg TM, Murray BA, Ghayee HK, Else T, Ling S, Jefferys SR, de Cubas AA, Wenz B, Korpershoek E, Amelio AL, Makowski L, Rathmell WK, Gimenez-Roqueplo AP, Giordano TJ, Asa SL, Tischler AS, Cancer Genome Atlas Research N, Pacak K, Nathanson KL, Wilkerson MD. Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell* 2017; 31:181-193
8. Fankhauser M, Bechmann N, Lauseker M, Goncalves J, Favier J, Klink B, William D, Geldon L, Maurer J, Spottl G, Rank P, Knosel T, Orth M, Ziegler CG, Aristizabal Prada ET, Rubinstein G, Fassnacht M, Spitzweg C, Grossman AB, Pacak K, Beuschlein F, Bornstein SR, Eisenhofer G, Auernhammer CJ, Reincke M, Nölting S. Synergistic Highly Potent Targeted Drug Combinations in different Pheochromocytoma Models including Human Tumor Cultures. *Endocrinology* 2019;
9. Auernhammer CJ, Spitzweg C, Angele MK, Boeck S, Grossman A, Nölting S, Ilhan H, Knosel T, Mayerle J, Reincke M, Bartenstein P. Advanced neuroendocrine tumours of the small intestine and pancreas: clinical developments, controversies, and future strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;
10. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K, Rad001 in Advanced Neuroendocrine Tumors TTSg. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364:514-523
11. Nölting S, Garcia E, Alusi G, Giubellino A, Pacak K, Korbonits M, Grossman AB. Combined blockade of signalling pathways shows marked anti-tumour potential in pheochromocytoma cell lines. *Journal of Molecular Endocrinology* 2012; 49:79-96
12. Nölting S, Giubellino A, Tayem Y, Young K, Lauseker M, Bullova P, Schovaneck J, Anver M, Flidner S, Korbonits M, Goke B, Vlotides G, Grossman A, Pacak K. Combination of 13-Cis Retinoic Acid and Lovastatin: Marked Anti-Tumor Potential in Vivo in a Pheochromocytoma Allograft Model in Female Athymic Nude Mice. *Endocrinology* 2014:en20141027
13. Bayley JP, Devilee P. Advances in paraganglioma-pheochromocytoma cell lines and xenografts. *Endocr Relat Cancer* 2020; 27:R433-R450
14. Nölting S, Maurer J, Spottl G, Aristizabal Prada ET, Reuther C, Young K, Korbonits M, Goke B, Grossman A, Auernhammer CJ. Additive Anti-Tumor Effects of Lovastatin and Everolimus In Vitro through Simultaneous Inhibition of Signaling Pathways. *PLoS One* 2015; 10:e0143830
15. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research* 2006; 66:1500-1508

16. Zitzmann K, Ruden J, Brand S, Goke B, Lichtl J, Spottl G, Auernhammer CJ. Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Letters* 2010; 295:100-109
17. Passacantilli I, Capurso G, Archibugi L, Calabretta S, Caldarola S, Loreni F, Delle Fave G, Sette C. Combined therapy with RAD001 e BEZ235 overcomes resistance of PET immortalized cell lines to mTOR inhibition. *Oncotarget* 2014; 5:5381-5391
18. Vandamme T, Beyens M, de Beeck KO, Dogan F, van Koetsveld PM, Pauwels P, Mortier G, Vangestel C, de Herder W, Van Camp G, Peeters M, Hofland LJ. Long-term acquired everolimus resistance in pancreatic neuroendocrine tumours can be overcome with novel PI3K-AKT-mTOR inhibitors. *Br J Cancer* 2016; 114:650-658
19. Aristizabal Prada ET, Spoettl G, Maurer J, Lauseker M, Koziolok E, Schrader J, Grossman AB, Pacak K, Beuschlein F, Auernhammer CJ, Nölting S. The role of GSK3 and its reversal with GSK3 antagonism in everolimus resistance. *Endocr Relat Cancer* 2018;
20. Nölting S, Rentsch J, Freitag H, Detjen K, Briest F, Mobs M, Weissmann V, Siegmund B, Auernhammer CJ, Aristizabal Prada ET, Lauseker M, Grossman A, Exner S, Fischer C, Grotzinger C, Schrader J, Grabowski P, group GN-Zs. The selective PI3Kalpha inhibitor BYL719 as a novel therapeutic option for neuroendocrine tumors: Results from multiple cell line models. *PLoS One* 2017; 12:e0182852
21. Aristizabal Prada ET, Weis C, Orth M, Lauseker M, Spoettl G, Maurer J, Grabowski P, Grossman A, Auernhammer CJ, Nölting S. GSK3alpha/beta: A Novel Therapeutic Target for Neuroendocrine Tumors? *Neuroendocrinology* 2017;

VI Originalpublikationen, die für diese Arbeit verwendet wurden

1. **Nölting S**, Garcia E, Alusi G, Giubellino A, Pacak K, Korbonits M, Grossman AB. Combined blockade of signalling pathways shows marked anti-tumour potential in pheochromocytoma cell lines. *Journal of Molecular Endocrinology* 2012;
2. **Nölting S**, Giubellino A, Tayem Y, Young K, Lauseker M, Bullova P, Schovaneck J, Anver M, Fliedner S, Korbonits M, Goke B, Vlotides G, Grossman A, Pacak K. Combination of 13-Cis Retinoic Acid and Lovastatin: Marked Anti-Tumor Potential in Vivo in a Pheochromocytoma Allograft Model in Female Athymic Nude Mice. *Endocrinology* 2014;
3. **Nölting S**, Maurer J, Spottl G, Aristizabal Prada ET, Reuther C, Young K, Korbonits M, Goke B, Grossman A, Auernhammer CJ. Additive Anti-Tumor Effects of Lovastatin and Everolimus In Vitro through Simultaneous Inhibition of Signaling Pathways. *PLoS One* 2015;
4. **Nölting S**, Rentsch J, Freitag H, Detjen K, Briest F, Mobs M, Weissmann V, Siegmund B, Auernhammer CJ, Aristizabal Prada ET, Lauseker M, Grossman A, Exner S, Fischer C, Grotzinger C, Schrader J, Grabowski P, group GN-Zs. The selective PI3Kalpha inhibitor BYL719 as a novel therapeutic option for neuroendocrine tumors: Results from multiple cell line models. *PLoS One* 2017;
5. Aristizabal Prada ET, Weis C, Orth M, Lauseker M, Spoettl G, Maurer J, Grabowski P, Grossman A, Auernhammer CJ, **Nölting S**. GSK3alpha/beta: A Novel Therapeutic Target for Neuroendocrine Tumors? *Neuroendocrinology* 2017;
6. Aristizabal Prada ET, Spoettl G, Maurer J, Lauseker M, Koziolok E, Schrader J, Grossman AB, Pacak K, Beuschlein F, Auernhammer CJ, **Nölting S**. The role of GSK3 and its reversal with GSK3 antagonism in everolimus resistance. *Endocr Relat Cancer* 2018;
7. Fankhauser M, Bechmann N, Lauseker M, Goncalves J, Favier J, Klink B, William D, Gieldon L, Maurer J, Spottl G, Rank P, Knosel T, Orth M, Ziegler CG, Aristizabal Prada ET, Rubinstein G, Fassnacht M, Spitzweg C, Grossman AB, Pacak K, Beuschlein F, Bornstein SR, Eisenhofer G, Auernhammer CJ, Reincke M, **Nölting S**. Synergistic Highly Potent Targeted Drug Combinations in different Pheochromocytoma Models including Human Tumor Cultures. *Endocrinology* 2019;