

Zusammenfassung

Paragangliome (PGL) sind chromaffine Zelltumore, zu denen auch die in der adrenalen Medulla auftretenden Phäochromocytome (PHEO) zählen. Eine korrekte Diagnose von PHEO/PGL ist anspruchsvoll, denn die auftretenden Symptome sind nicht eindeutig. Unbehandelte PHEO/PGL können verheerend Folgen haben, da erhöhte Katecholamin-Level zu ausgeprägtem Bluthochdruck, Apoplexie, Herzrhythmusstörungen und Herzinfarkt führen können. Selbst bei korrekter Diagnose bleibt das Risiko der Metastasenbildung. Bis zu 10 % der Patienten haben bereits zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen. Patienten mit Mutationen der Succinat-Dehydrogenase B (*SDHB*) entwickeln zu 50-97 % Metastasen. Behandlungsoptionen sind begrenzt, sobald Metastasen vorhanden sind, und abhängig von der untersuchten Patientengruppe, beträgt die Chance 5 Jahre zu überleben lediglich 35-60 %.

Ziel dieser Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung von aggressiven PHEO/PGL.

Zuerst wurde der Nutzen von Urinpeptiden für die Klassifizierung unterschiedlicher Patientengruppen untersucht. Der Urin von gesunden Kontrollpersonen (Ctr), Patienten mit metastasierenden (*SDHB*-met) und nicht-metastasierenden (offensichtlich benignen, *SDHB*-ben) *SDHB*-mutationsbedingten PHEO/PGL und gesunden *SDHB*-Mutationsträgern (*SDHB*-car) wurde per Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Elektrospray Ionisations time-of-flight Massenspektrometrie analysiert. Auf Basis der Unterschiede in detektierten Peptiden zwischen diesen Gruppen wurden potentiell prädiktive Marker für *SDHB*-Mutationen und solche zur Unterscheidung zwischen Patienten mit benignen und metastasierenden *SDHB*-mutationsvermittelten PHEO/PGL identifiziert.

Klassifikation von *SDHB*-car auf Grundlage von 4 Peptiden war erfolgreich bei einer Fehlerrate von 1,8 %. Korrekte Klassifizierung von *SDHB*-met anhand nur eines Peptids war mit einer Fehlerrate von 3,3 % möglich. Das höchst rangierende Peptid konnte als Fragment von Kollagen Typ III identifiziert werden. *SDHB*-ben Patienten und gesunde Mutationsträger konnten anhand von 3 Peptiden bei einer Fehlerrate von 10,5 % separiert werden. Wenn jedoch ein kombinierter Klassifikations-Algorithmus aus Katecholaminspiegel und den 3 höchst rangierenden

ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION: MOLECULAR BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF AGGRESSIVE
PARAGANGLIOMA

DIPL.-NEUROWISS. STEPHANIE FLIEDNER

Peptiden angewandt wurde, konnte eine korrekte Klassifikation zu 100 % erzielt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass einige wenige Urinpeptide das Potential haben, Individuen mit *SDHB*-Mutationen als solche zu identifizieren und gesunde Mutationsträger von Patienten mit metastasierenden PHEO/PGL zu unterscheiden. Darüber hinaus scheint die Messung von 3 Urinpeptiden der korrekten Diagnose von nicht Katecholamin sezernierenden PHEO/PGL, die bei 10 % der *SDHB*-Patienten auftreten, zuträglich zu sein.

Als Zweites wurden Charakteristika der zellulären Proteinexpression in aggressiven PHEO/PGL evaluiert. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Fehlfunktionen des Energiestoffwechsels gelegt. Es ist bekannt, dass PHEO/PGL, die mit *SDHx* und von-Hippel-Lindau (*VHL*) Genmutation in Zusammenhang stehen, erhöhte Glycolyse und reduzierte oxidative Phosphorylierung (*OXPHOS*) zeigen. Trotzdem ist die Tendenz dieser Tumore zu metastasieren sehr unterschiedlich: Metastasenbildung ist selten in *VHL*-bedingten PHEO/PGL, während *SDHB*-bedingte häufig metastasieren. Differenzielle-2D-Gel-Analyse von ‚mouse PHEO cells‘ (*MPC*) und ihren filialen, aggressiveren ‚mouse tumor tissue‘-Zellen (*MTT*) zeigte Expressionsunterschiede verschiedener Energiestoffwechsel-Proteine, unter anderem einiger Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes. Diese Proteine wurden dann in humanen PHEO/PGL untersucht.

Im Einklang mit einem glykolytischen Phänotyp war die Laktat-Dehydrogenase-Expression in den aggressiven Proben erhöht, mit einem höheren Verhältnis von A- zu B- Untereinheit in *MPC* verglichen mit *MTT* und *SDHB* PHEO/PGL verglichen mit normaler Nebenniere. Das Verhältnis von A- zu B-Untereinheits-Expression erwies sich als ähnlich in *VHL*- und *SDHB*-mutationsbedingten PHEO/PGL, allerdings basierend auf einer verminderten Expression der B-Untereinheit in ersteren verglichen mit normaler Nebenniere, während in letzteren die A-Untereinheit verstärkt exprimiert war.

Entzug von Glukose verringerte die Proliferation von *MTT*, nicht aber *MPC* Zellen. Respirometrie zeigte jedoch keinen Unterschied im Sauerstoffverbrauch von Komplex I und II zwischen den Zelltypen. Allerdings konnte eine vermehrte Produktion der Reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*) an Komplex I festgestellt werden. Untersuchung der *OXPHOS*-Komplex-Aktivität in humanem PHEO/PGL-Gewebe zeigte, dass die Aktivität von Komplex I, II und II+III relativ zum Gehalt an

ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION: MOLECULAR BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF AGGRESSIVE
PARAGANGLIOMA

DIPL.-NEUROWISS. STEPHANIE FLIEDNER

Mitochondrien in *SDHB*- gegenüber *VHL*-mutationsbedingten PHEO/PGL geringer ist. Es konnte jedoch kein Unterschied im ROS-Level festgestellt werden. Die vorgelegten Daten zeigen, dass MTT- und *SDHB*-mutationsbedingte PHEO/PGL im Vergleich zu ihren weniger aggressiven Gegenstücken bestimmte Charakteristika teilen. Es werden mögliche pathogene Mechanismen aggressiver humaner PHEO/PGL in Verbindung mit dem Warburg-Effekt berichtet, die zur Identifikation neuer diagnostischer und prognostischer Marker und potentiellen, neuen Therapieansätzen führen könnten.

Als Drittes wurde eine mögliche Zelloberflächen-Lokalisierung, welche für andere Tumortypen bereits beschrieben wurde, und deren Potential als Ansatzpunkt für die medikamentöse Behandlung untersucht. Ergebnisse konfokaler Mikroskopie zeigten, dass die β Untereinheit der ATP-Synthase auf der Zelloberfläche von MPC und MTT, sowie der primärer Zellen eines *SDHB*-mutationsbedingten PGL zu finden waren, während sie auf der Oberfläche von bovinen primären chromaffinen Zellen praktisch nicht zu detektieren war. Die Oberflächen-Lokalisierung wurde per Immun-Elektronenmikroskopie am Gewebe eines *SDHB*-mutationsbedingten PGL verifiziert. Behandlung von MPC- und MTT-Zellen mit dem ATP-Synthase-Hemmer Resveratrol und mit einem ATP-Synthase β -Antikörper führte zu deutlicher Proliferationsinhibition. Die vorgelegten Daten lassen vermuten, dass PHEO/PGL einen funktionalen ATP-Synthase-Komplex auf der Oberfläche tragen, der Zellüberleben oder Proliferation unterstützt. Daher könnte Zelloberflächen-ATP-Synthase einen neuen Ansatzpunkt für die medikamentöse Behandlung von malignen oder inoperablen PHEO/PGL bieten.