

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Labor für experimentelle Gastroenterologie

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Etablierung und Charakterisierung eines neuen humanen, hochdifferenzierten und funktionell-aktiven Tumormodells eines pankreatischen neuroendokrinen Tumors

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Yasmin Behrang
aus Hamburg

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.09.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Jörg Schrader

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Sarah Minner

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Sebastian Krug

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 ARTIKEL: ESTABLISHMENT OF THE FIRST WELL DIFFERENTIATED HUMAN PANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMOR MODEL.....	1
2 EINLEITUNG	13
2.1 NEUROENDOKRINE NEOPLASMIEN	13
2.2 AKTUELLER STAND DER MEDIKAMENTÖSEN THERAPIE PANKREATISCHER NETS ..	13
2.3 PRÄ-KLINISCHE MODELLE ZUR ENTWICKLUNG NEUER THERAPIEN	14
2.4 ETABLIERUNG EINER NEUEN, GUT DIFFERENZIIERTEN ZELLINIE	15
3 ERGEBNISSE	15
3.1 GENERIERUNG UND MORPHOLOGIE DER ZELLINIE	15
3.2 NEUROENDOKRINE DIFFERENZIIERUNG.....	15
3.3 ZELLPROLIFERATION	19
3.4 THERAPIEANSÄTZE.....	20
3.5 THERAPIEANSPRECHEN	23
3.6 XENOGRAFT-TIERMODELL.....	24
4 DISKUSSION:	26
4.1 GRUNDLAGEN UND HINDERNISSE DER AKTUELLEN FORSCHUNG.....	26
4.2 TIERMODELLE	26
4.3 ZELLINIEN	26
4.4 MUTATIONEN	27
4.5 KULTURBEDINGUNGEN	27
4.6 BETAZELL-MODELLE	28
4.7 THERAPEUTIKA	28
4.8 AUSBLICK.....	29
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	30
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	33
6.1 SUMMARY	33

7	LEBENS LAUF	35
8	ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS AN DER PUBLIKATION	36
9	DANKSAGUNG	36
10	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	37

Establishment of the First Well-differentiated Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Model

Daniel Bente^{1,2}, Yasmin Behrang¹, Ludmilla Unrau³, Victoria Weissmann⁴, Gerrit Wolters-Eisfeld⁴, Susanne Burdak-Rothkamm^{5,6}, Felix R. Stahl⁷, Martin Anlauf⁸, Patricia Grabowski⁹, Markus Möbs¹⁰, Jan Dieckhoff¹¹, Bence Sipos¹², Martina Fahl¹, Corinna Eggers¹, Daniel Perez⁴, Maximilian Bockhorn⁴, Jakob R. Izbicki⁴, Ansgar W. Lohse¹, and Jörg Schrader^{1,4}



Abstract

Clinical options for systemic therapy of neuroendocrine tumors (NET) are limited. Development of new drugs requires suitable representative *in vitro* and *in vivo* model systems. So far, the unavailability of a human model with a well-differentiated phenotype and typical growth characteristics has impaired preclinical research in NET. Herein, we establish and characterize a lymph node-derived cell line (NT-3) from a male patient with well-differentiated pancreatic NET. Neuroendocrine differentiation and tumor biology was compared with existing NET cell lines BON and QGP-1. *In vivo* growth was assessed in a xenograft mouse model. The neuroendocrine identity of NT-3 was verified by expression of multiple NET-specific markers, which were highly expressed in NT-3 compared with BON and QGP-1. In addition, NT-3 expressed and secreted insulin. Until now, this well-differentiated phenotype is stable since 58 passages. The

proliferative labeling index, measured by Ki-67, of 14.6% \pm 1.0% in NT-3 is akin to the original tumor (15%–20%), and was lower than in BON (80.6% \pm 3.3%) and QGP-1 (82.6% \pm 1.0%). NT-3 highly expressed somatostatin receptors (SSTRs: 1, 2, 3, and 5). Upon subcutaneous transplantation of NT-3 cells, recipient mice developed tumors with an efficient tumor take rate (94%) and growth rate (139% \pm 13%) by 4 weeks. Importantly, morphology and neuroendocrine marker expression of xenograft tumors resembled the original human tumor.

Implications: High expression of somatostatin receptors and a well-differentiated phenotype as well as a slow growth rate qualify the new cell line as a relevant model to study neuroendocrine tumor biology and to develop new tumor treatments. *Mol Cancer Res*; 16(3); 496–507. ©2018 AACR.

¹I. Medical Department - Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ²Department of Gastroenterology, Helios Klinik Duisburg, Duisburg, Germany. ³Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁴Department of General-, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁵Department of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁶Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁷Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁸Institute of Pathology, Limburg, Germany. ⁹Department of Gastroenterology, Rheumatology and Infectious Diseases, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. ¹⁰Institute of Pathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ¹¹Department for Interventional and Diagnostic Radiology and Nuclear Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ¹²Department of Pathology, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany.

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

D. Bente and Y. Behrang contributed equally to this article.

Corresponding Author: Jörg Schrader, I. Medical Department - Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, Hamburg 20246, Germany. Phone: 4940-7410-53661; Fax: 4940-7410-40272; E-mail: j.schrader@uke.de

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0163

©2018 American Association for Cancer Research.

Introduction

Well-differentiated neuroendocrine tumors (NET) are characterized by the cardinal features of slow tumor growth and potential to secrete functionally active hormones. Because of their mostly indolent behavior, more than 50% of patients are diagnosed with metastatic disease not amenable to curative surgery (1). Despite recent advances in the development of medical treatments, long-term disease control is only achieved in a minority of patients receiving chemotherapy or targeted therapies in patients with pancreatic NET (2–4). Encouraging data on the use of peptide receptor radionuclide therapy show long-term disease stabilization but are limited to NET with high somatostatin receptor (SSTR) expression (5). In contrast, for patients with low receptor status identification of alternative NET cell-specific receptor targets is crucial. However, development and evaluation of novel therapeutic targets and optimization of existing NET therapies has been hampered by limited availability of preclinical models. Currently, there are only a few NET cell lines available (6, 7). Of these, the pancreatic cell lines BON and QGP-1 are the most widely used. Despite expression of some NET markers, BON and QGP-1 do not display a well-differentiated neuroendocrine phenotype. For example, cells do not serve as a model to study radionuclide imaging and therapy, as SSTR expression is very low and

octreotide radionuclide uptake is only minor (8). Furthermore, doubling times of less than 48 hours for BON cells, are too fast to represent a relevant model for slow growing NETs (9). In xenotransplantation models, these cell lines show very rapid tumor growth with early development of tumor necrosis due to poor vascularization (10, 11).

Although the establishment of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines with a well-differentiated phenotype and low proliferation rate would be mandatory to validate new therapeutic targets in preclinical settings, extensive research over the past 25 years has not resulted in generation of such cell lines. Accountable for this failure were undefined optimal growth conditions for NET cells as well as overgrowth by contaminating tumor fibroblasts (12). We here report successful establishment of a new pancreatic NET cell line from a lymph node metastasis of a patient with functional insulinoma. These cells, named NT-3, have now been cultured for more than 3 years and they still display a stable well-differentiated phenotype, including after xenotransplantation. Cell characterization and proliferation analyses hold promise that these cells provide a hitherto unavailable clinically relevant *in vitro* and *in vivo* model of well-differentiated neuroendocrine tumor disease.

Materials and Methods

Cell lines

Authenticated BON and QGP-1 cells were cultured in DMEM/Ham F12 and RPMI, respectively, supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin. Cells regularly tested negative for mycoplasma contamination. The cells were used within 15 passages after authentication (DMSZ).

The new cell line NT-3 was generated from a surgically resected lymph node of a 33-year-old male patient with well-differentiated NET of the pancreas. The patient had stage IV disease and a debulking operation had been performed for a functionally active insulinoma. Histopathology confirmed insulin expression and the Ki-67 was determined to be 15%–20%. The local ethical review board approved the use of human tissue and informed consent from the patient was obtained before surgery. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Tissue culture was started after mincing of the tissue and digestion with collagenase IV (Serva). The ensuing primary mixed cell culture containing tumor and stromal cells was cultivated in RPMI medium supplemented with 10% FCS, penicillin/streptomycin, HEPES, EGF (20 ng/mL), and FGF2 (10 ng/mL; PeproTech). To eliminate fibroblasts, the primary cultures were passaged by sequential trypsinization and cultivation under low-adherent conditions. While fibroblasts attached in all culture conditions, tumor cells preferentially attached to collagen-coated culture plates. Passage numbering of tumor cell culture was started after achieving a pure tumor cell culture and successful cryopreservation. Cells from passage 15–30 have been used for the experiments.

For cell culture experiments under hypoxic conditions, cells were incubated in a nitrogen-supplemented incubator with 0.5% oxygen for up to 24 hours.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from cell cultures and tumor samples using the Nucleo Spin RNA, DNA, and protein purification Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Total

RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and a T3 Thermocycler (Biometra). Prevalidated primers for real-time PCR were purchased from Applied Biosystems (full list in Supplementary Methods). Samples in duplicate were subjected to PCR in a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Values were expressed as (C_t) values normalized to housekeeping gene *GAPDH* using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Immunocytochemistry

NT-3, QGP-1, and BON cells were grown on collagen-coated chamber slides for 48 hours supplemented with or without growth factors (EGF and FGF2) and fixed with 4% paraformaldehyde. Mouse anti-Ki67 (Clone MIB-1, Dako) and mouse anti-Chromogranin-A (Clone DAK-A3, Dako) were used as primary antibodies. Goat anti-mouse Alexa Fluor 555 (Molecular Probes by Life Technologies) was used as secondary antibody. Coverslips were mounted using Vectashield Hard Set with DAPI (Vector Laboratories). Cells were analyzed by fluorescence microscopy using a BioRevo BZ-9000 (Keyence).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously (13). In brief, 20 μ g of protein was separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blocking, membranes were probed with primary and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (full antibody list in Supplementary Methods) and ensuing bands were visualized using an ECL-kit (Pierce).

ELISA

Measurement of VEGF in cell culture supernatants was performed using the R&D Systems VEGF ELISA Development Kit following manufacturer's instructions. VEGF concentrations in cell culture supernatants were normalized to total protein content of the corresponding cell culture to account for different cell numbers of the cell lines.

MTT assay

The MTT assay was carried out under standardized conditions in 96-well plates. After incubation for 24 hours, cells were treated separately with the following therapeutics: octreotide (Sandostatin, Novartis), streptozotocin (Sigma), 5-fluorouracil (5-FU; Sigma), everolimus (LC Laboratories), and sunitinib (LC Laboratories). All therapeutics were replenished once after 48 hours. 120 hours after the first addition of therapeutics, 20 μ L of MTT (5 mg/mL, Fluka Analytical, Sigma) was added to each well and plates were incubated for 2 hours. Using a Tecan infinite F50 spectrophotometer (Tecan), absorbance was measured at 540 nm after solubilization of the formazan dye with DMSO. Results are displayed as mean absorbance relative to controls (untreated or DMSO control as indicated).

Cell counting

Fast growing BON and QGP-1 cells were seeded in 24-well plates with 1×10^4 cells per well, and slower growing NT-3 with 2×10^4 cells per well, diluted in 500- μ L medium supplemented with or without growth factors (EGF and FGF2). BON and QGP-1 cells were counted on days 1, 3, 7, and 10, whereas NT-3 cells were counted on days 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, and 42.

Benten et al.

Soft agar assay

Soft agar assay was performed as described previously (14). In brief, 1×10^5 NT-3 cells were plated in 60-mm Petri dishes between layers of agar mixed with complete growth media. Plates were cultured up to 12 weeks with regular growth media addition. Ensuing colonies were counted by light microscopy.

Insulin measurement

Human insulin content was determined using the ADVIA Centaur Insulin Assay (REF 02230141) and ADVIA Centaur XP analyzer (Siemens Healthcare). This assay is standardized to the first human insulin international reference preparation by the World Health Organization (NIBSC code 66/304). FCS did not contain measurable insulin using this human insulin assay. *In vitro* samples were obtained from supernatants of NT-3 cell cultures after stimulation with 500 $\mu\text{mol/L}$ 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma) for 60 minutes. No additional growth factors were added and untreated cells were used as control. *Ex vivo* data were generated from serum samples of xenograft tumor mice. The manufacturer has not reported cross-reactivity to mouse insulin and we did not detect insulin in serum from untransplanted mice.

Mutational analysis and genotypic fingerprinting

Mutation analysis of hotspot regions in 22 genes that are frequently mutated in cancer as well as genotypic fingerprinting was performed by multiplex-PCR based targeted high-throughput sequencing (HTS) using the Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 and the Ion AmpliSeq Sample ID Panel and subsequent sequencing with the Ion Torrent system (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations (full list of mutational sites investigated in Supplementary Methods). Targeted exome mutational analysis of *MEN1*, *VHL*, *TSC1*, *TSC2*, *DAXX*, *ATRX* was performed after enriching the coding and flanking intronic regions using the Agilent in solution technology according to manufacturer's protocol (Agilent) with some slight modifications and sequencing using the Illumina HiSeq 4000 system (detailed protocol for data analysis, see Supplementary Methods).

Xenograft animal model and MRI

To generate subcutaneous tumors, 2×10^6 NT-3 cells in 0.1-mL RPMI containing 1% FCS were mixed with 0.1-mL extracellular matrix gel (Matrigel) and injected subcutaneously into flanks of NOD/SCID mice (The Jackson Laboratory). Intraportal cell transplantation was performed as described previously (15) using 2×10^6 NT-3 cells in 0.2-mL RPMI with 2% FCS. Animals experiments were approved by the local authorities (LUKE Forschungstierhaltung and Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg, approval number 125/15). MRI measurements (protocol see Supplementary Methods) of xenografted mice were performed on 4-week intervals for volumetric analysis. At the end of experiments, mice were sacrificed under animal welfare guidelines, blood was collected and necropsy was performed. Excised tumors were divided in half and either fixed in formalin for paraffin embedding or snap-frozen and stored at -80°C for molecular analyses.

IHC

Tissue sections from formalin-fixed paraffin-embedded xenograft tumors were dewaxed, blocked with blocking solution

(Dako), and incubated with the following primary antibodies: Chromogranin A, synaptophysin, and Ki-67 (all from Dako). Positive staining was visualized using a corresponding secondary HRP-coupled antibody and the DAB staining system (Dako). Slides were counterstained with hematoxylin (Sigma). Staining of primary human tumor tissue was done as described before using the following primary antibodies: Chromogranin A, Synaptophysin, VMAT1, SSTR2A, SSTR5, Ki-67, and insulin (16).

Statistical analysis

All graphs and statistical analysis have been performed using GraphPad Prism 4 utilizing standard two-tailed unpaired Student *t* test. *P* values <0.05 were considered significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$). Data are presented as mean \pm SEM of at least three replicates.

Results**Generation and morphology of the cell line**

After mechanical dissection and collagenase digestion of the original surgical specimen, cell cultures contained tumor cells in small grape-like clusters as well as various components of stromal cells. Within 8 weeks of sequential trypsinization and serial passaging, contaminating fibroblasts were eliminated and a pure tumor cell culture emerged. These cells were now called NT-3. NT-3 formed islet-like spheres upon culture in nonadherent conditions and small grape-like clusters in adherent conditions on collagen-coated plates after single cell plating (Supplementary Fig. S1A–S1D). Successful cryopreservation and verification of the neuroendocrine phenotype (e.g., chromogranin A and synaptophysin expression) was achieved 5 months after initiating the primary cultures, when enough cells were available for analysis. At this time point, passage numbering was started. Genotypic fingerprinting of 8 unlinked, nonexonic single-nucleotide polymorphisms (SNP) with consistent high minor-allele frequencies in both, DNA derived from the original tumor and from NT-3 cells, confirmed the origin of our cell line.

Currently, NT-3 have been in continuous culture since 42 months and 58 passages. The cells have retained their morphology and well-differentiated neuroendocrine phenotype throughout (Supplementary Fig. S2A). Screening for oncogenic mutations in hotspots of 22 genes by targeted high-throughput parallel sequencing ruled out mutations associated with high-grade neuroendocrine carcinoma (e.g., *ras*, *Smad4*, *EGFR*, and *PIK3CA*) and confirmed the absence of *TP53* mutations (Supplementary Fig. S2B). Targeted sequencing of genetic mutations associated with pNET (i.e., *VHL*, *MEN1*, *TSC1*, *TSC2*, *DAXX*, and *ATRX*) revealed a homozygous missense mutation of *MEN1* (chromosome 11, position 64572018; c.1621A>G; p.T541A), while other mutations in these genes were not found.

Neuroendocrine differentiation

One of the prominent features of NET is their high degree of differentiation and functional activity. The available pancreatic NET cell lines BON and QGP-1 have not been vigorously characterized for their neuroendocrine differentiation status. Therefore, we analyzed expression of neuroendocrine markers and neuroendocrine-related transcription factors in these cells and compared them with our novel NT-3 cell line.

We observed high mRNA expression of chromogranin A (CgA) in NT-3, and, to a lesser extent, in BON but only

low expression in QGP-1 (Fig. 1A). Correspondingly, NT-3, and to a lesser extent, also BON stained positive for CgA on immunofluorescence (Fig. 1B). The neuronal marker synapto-

physin was expressed in all three cell lines confirming their neuroendocrine origin and again NT-3 showed a much higher expression than BON and QGP-1 (Fig. 1A). Another prominent

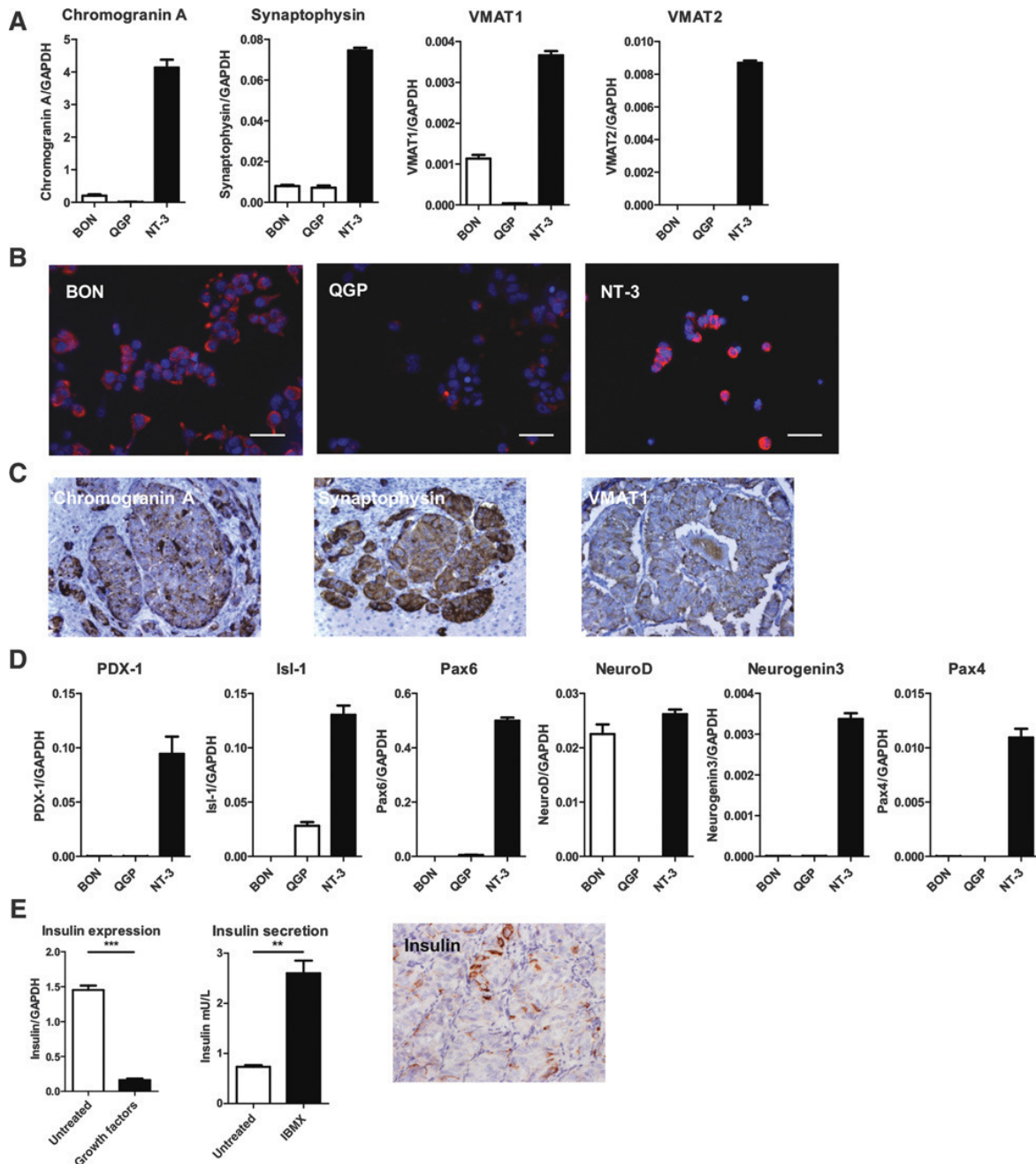


Figure 1.

Neuroendocrine phenotype of NT-3. **A**, Expression analyses of CgA, synaptophysin, and VMAT1 in BON, QGP-1, and NT-3 cells showed a high degree of neuroendocrine differentiation in NT-3 cells. **B**, Strong expression of CgA in NT-3 was confirmed by immunocytochemistry. **C**, Staining of the primary surgical tumor specimen for CgA, synaptophysin, and VMAT1 corresponded to the expression profile of NT-3 cells. **D**, Increased expression of neuroendocrine-related transcription factors PDX-1, neurogenin3, NeuroD, Isl-1, Pax4 and Pax6 supported the well-differentiated phenotype of NT-3 compared with BON and QGP-1. **E**, Expression and IBMX-stimulated release of insulin in NT-3 confirmed functionality. Correspondingly, IHC of the primary human tumor showed insulin expression. Scale bar, 50 μ m.

Benten et al.

feature of neuroendocrine cells is their uptake and processing of monoamines. We detected expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and VMAT2 in NT-3, while QGP-1 expressed neither of them and BON only weakly expressed VMAT1 (Fig. 1A). In addition, all cell lines expressed enzymes required for serotonin biosynthesis (e.g., tryptophan hydroxylase 1 and dopa-decarboxylase) to various extent (Supplementary Fig. S2C). Reassuringly, the original NET tumor of the patient was also positive for CgA, synaptophysin, and VMAT1 (Fig. 1C).

Neuroendocrine cell differentiation in the pancreas during embryonal development is promoted by multiple transcription factors, most of which are still expressed and functionally relevant in adult islet cells (17). We observed high expression of PDX-1, Isl-1, Neurogenin3, NeuroD, Pax4, and Pax6 in NT-3 cells, whereas BON only express NeuroD and QGP-1 only expresses Isl-1 (Fig. 1D). As a marker of functionality,

NT-3 expresses and releases insulin, corresponding to the functional insulinoma of the patient (Fig. 1E). Insulin expression in the original patients' tumor was confirmed by IHC showing moderate staining intensity with some strongly stained tumor cells. Interestingly, insulin expression by NT-3 was modifiable by the omission or addition of the growth factors EGF/FGF-2.

The finding of growth factor-dependent insulin expression prompted us to investigate this effect also for the abovementioned neuroendocrine markers, and we detected profoundly reduced expression upon growth factor supplementation for CgA, synaptophysin, and all neuroendocrine-related transcription factors (Fig. 2A and data not shown). Correspondingly, NT-3 cells showed a reduction in E-cadherin and an increase in vimentin expression when treated with growth factors, suggesting epithelial-to-mesenchymal shifting of their phenotype (Fig. 2B). This was, in part, reflected by the appearance of a

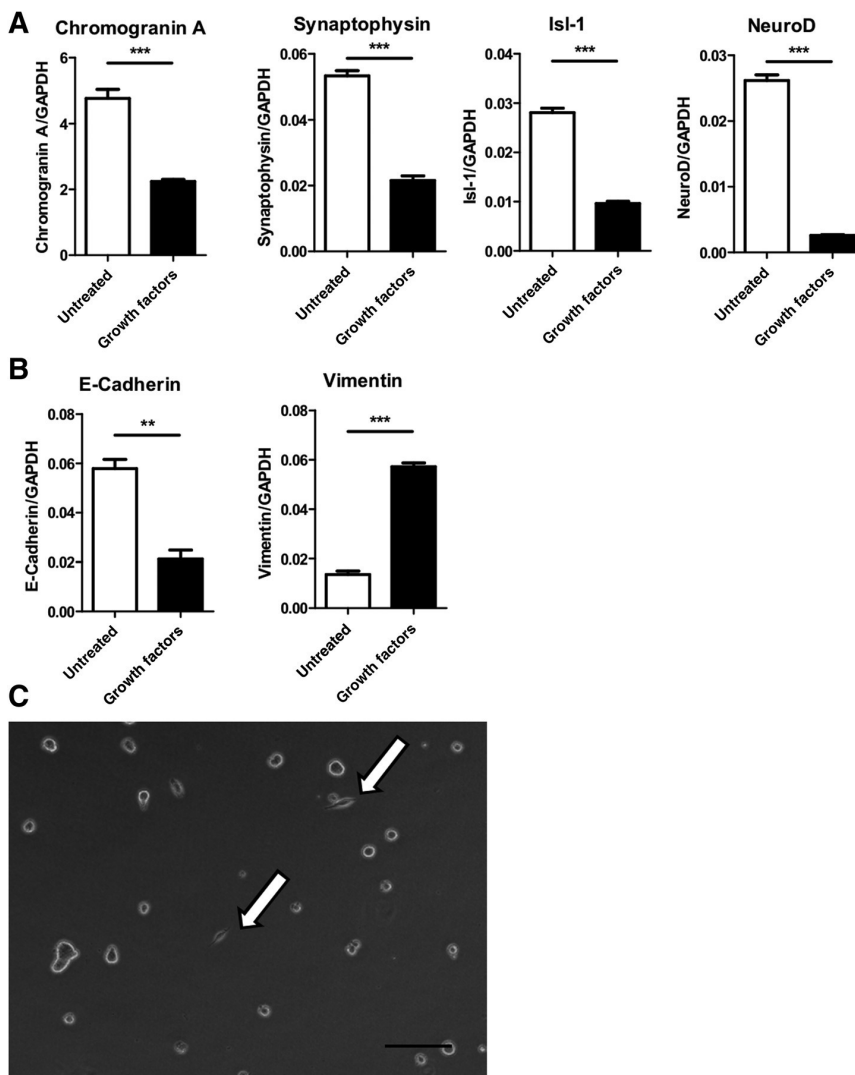


Figure 2.

Plasticity of NT-3 cells. **A**, Supplementation of the cell culture media with growth factors EGF and FGF2 decreased expression of neuroendocrine markers in NT-3 cells. **B**, This was accompanied by downregulation of E-Cadherin and upregulation of vimentin. **C**, These changes are reflected by appearance of a spindle-shaped subpopulation (arrows) in growth factor-supplemented cell cultures. **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$. Scale bar, 100 μm .

small spindle-shaped subpopulation in NT-3 cultures treated with growth factors (Fig. 2C), which completely disappeared after subsequent withdrawal of growth factors. In contrast to this high plasticity of NT-3, QGP-1 showed only minimal changes upon growth factor treatment, whereas BON cell phenotype was completely unaffected by addition or omission of growth factors (data not shown).

Cell proliferation

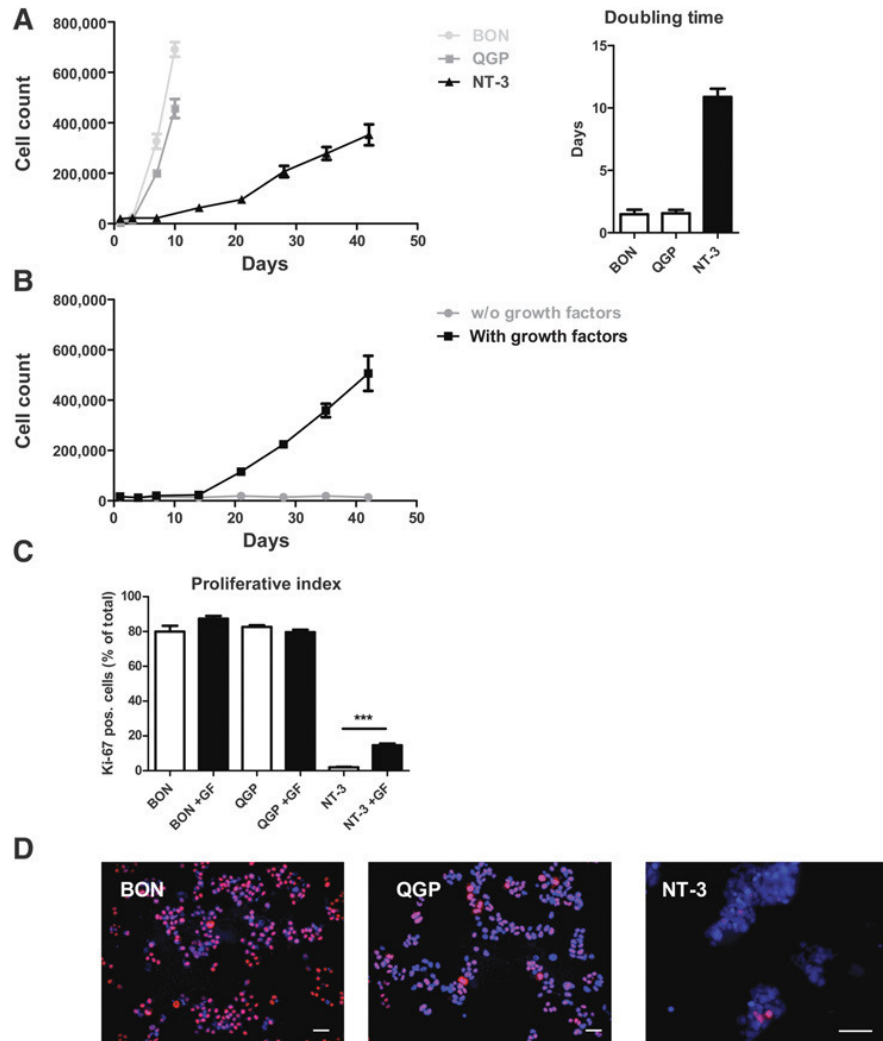
Well-differentiated NETs are characterized by a low proliferation rate and slow tumor growth. Cultured BON and QGP-1 cells had a doubling time of less than two days (BON 1.5 ± 0.4 days, QGP-1 1.6 ± 0.3 days), which was unaffected by addition of growth factors (Fig. 3A; Supplementary Fig. S3A). In contrast, NT-3 grew slowly with a doubling time of 10.9 ± 0.7 days (Fig. 3A). Their growth was dependent on the addition of growth factors, as we did not observe growth of NT-3 cells plated at low cell density without growth factors (Fig. 3B).

Clinical tumor grading of NET is assessed by IHC staining for the nuclear proliferation factor Ki-67. BON and QGP-1 have a Ki-67 labeling index of $80.0\% \pm 3.3\%$ and $82.6\% \pm 1.0\%$ respectively, corresponding to highly proliferative G3 carcinomas. In contrast, nuclear Ki-67 in NT-3 is only $2.0\% \pm 0.2\%$, corresponding to a slowly proliferative G1–G2 tumor. Addition of growth factors slightly increased Ki-67 index in BON by 7%, compared with a profound increase in NT-3 by 325% to an index of $14.6\% \pm 1.1\%$ (Fig. 3C and D), now similar to the patients' original tumor and xenograft tumors (see below). Cellular anchorage-independent growth, which represents a sign of malignancy, was confirmed in NT-3 by soft agar assay. Out of 1×10^5 cells plated in soft agar, 2,200 formed cell clusters of 10–20 cells with a latency of 12 weeks, corresponding to a colony-forming frequency of approximately 2% (Supplementary Fig. S3B).

Therapeutic targets

SSTRs are crucial therapeutic targets for somatostatin analogues and peptide radio receptor therapy in NET treatment.

Figure 3. Proliferation. **A**, Growth curves of tumor cells cultured with growth factor supplementation show a fast growth rate of BON and QGP-1, while NT-3 exhibit a very slow growth over a period of 7 weeks. **B**, NT-3 plated at low density without growth factor addition did not proliferate. **C** and **D**, Staining for Ki-67 was used to calculate proliferative indices in BON, QGP-1, and NT-3 cells with or without growth factor supplementation. Scale bar, 50 μ m.



Benten et al.

NT-3 shows high mRNA expression of SSTR1, SSTR2, SSTR3, and SSTR5, among those, the expression of SSTR-1 is particularly strong. In contrast, BON and QGP-1 express these receptors either only weakly or not at all (Fig. 4A). None

of these cell lines expresses SSTR4. Western blotting confirmed high expression of SSTRs and showed that the most clinically relevant SSTR2 is exclusively expressed in NT-3, while SSTR3 and SSTR5 are also expressed in BON (Fig. 4B).

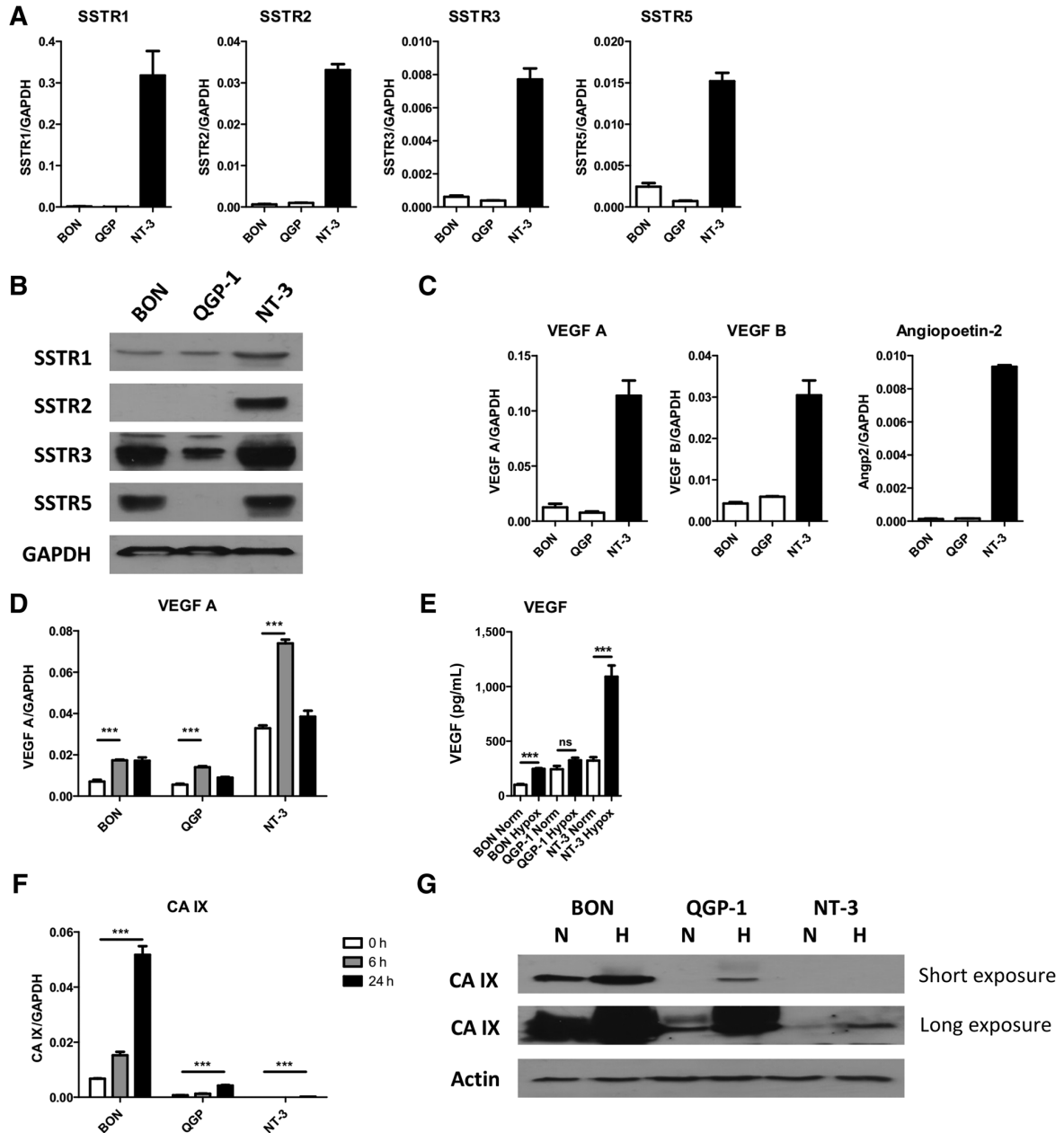


Figure 4. Therapeutic targets in NT-3. **A** and **B**, Western blot and qPCR analysis of SSTR subtypes revealed higher expression of SSTR1 and SSTR2 in NT-3 compared with BON and QGP-1. **C**, Expression of VEGF A, VEGF B and angiopoetin mRNA is at least 3-fold higher in NT-3 cells compared to BON and QGP-1. The expression of VEGF A is further increased after 6 and 24 hours in low oxygen environment (**D**) and VEGF release into the supernatant after 24h of hypoxia was confirmed by ELISA (**E**). Ensuing hypoxic conditions in tumor cells were verified by increase in carboanhydrase IX (CAIX) expression after 6 and 24 hours by qPCR (**F**) and after 24-hour by Western blot analysis (**G**).

Correspondingly, the patient's primary tumor tissue showed positive staining for SSTR2A and SSTR5 on IHC (Supplementary Fig. S4A and S4B).

Another therapeutic target in clinical NET treatment are angiogenic factors. In standard culture conditions, the mRNA expression of VEGF A and B in NT-3 is more than 3-fold higher than in BON and QGP-1 (Fig. 4C). In addition, NT-3 cells also express the proangiogenic growth factor angiopoietin 2 (ANG2) to a higher extent than BON and QGP-1 cells (Fig. 4C). Upon cell transfer into a hypoxic environment (0.5% oxygen), we observed a further increase in VEGF (Fig. 4D), but not in ANG2 expression (not shown). ELISA confirmed secretion of VEGF into cell culture supernatants under hypoxic conditions (Fig. 4E). Establishment of a relevant hypoxic environment was confirmed by upregulation of carboanhydrase IX, a prototypic hypoxia-induced gene target (Fig. 4F–G).

These results demonstrate that the new NT-3 cell line should meet the criteria for a suitable model to study antiproliferative and antiangiogenic treatments.

Treatment response

Current guidelines for the treatment of advanced pancreatic NET recommend somatostatin analogues, chemotherapy with streptozotocin/5-FU, and the targeted therapies everolimus or sunitinib. To evaluate the potential of our new NT-3 cells for

studying upcoming novel therapies, we aimed to establish the efficacy of current treatments compared with QGP-1 cells. Upon treatment with 100 nmol/L octreotide, we observed a significant (-34.8% , $P < 0.001$) reduction in NT-3 cell numbers after a treatment for 5 days (Fig. 5A). In contrast, the low SSTR-expressing QGP-1 cells did not show significant reduction of cell numbers (-4.6% , $P = 0.22$). Treatment of cell cultures with 50 nmol/L everolimus resulted in a 31.5% and 26.2% reduction of NT-3 and QGP cell numbers after 5 days ($P < 0.001$), respectively (Fig. 5B). Increasing the dose up to 500 nmol/L did not further increase treatment response (data not shown). Treatment with sunitinib in doses up to 500 nmol/L did not decrease viability or proliferation in either cell line (data not shown). To evaluate treatment response to standard cytotoxic chemotherapy, we analyzed the dose-dependent effect on cell viability after incubation with streptozotocin and 5-FU. After 5 days, streptozotocin treatment at 1 mmol/L resulted in a viability decrease of $-43.3\% \pm 1.1\%$ in NT-3 ($P < 0.001$) compared with a lesser effect of $-18.9\% \pm 7.5\%$ ($P = 0.10$) in QGP-1 (Fig. 5C). Increasing the dose to 10 mmol/L substantiated the difference in susceptibility toward streptozotocin. In contrast, both cell lines responded well to 5-FU; treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ for 5 days resulted in decreased viability of $-30.1\% \pm 8.8\%$ ($P = 0.014$) in NT-3 compared with $-49.7\% \pm 6.0\%$ in QGP-1 ($P = 0.0002$; Fig. 5D).

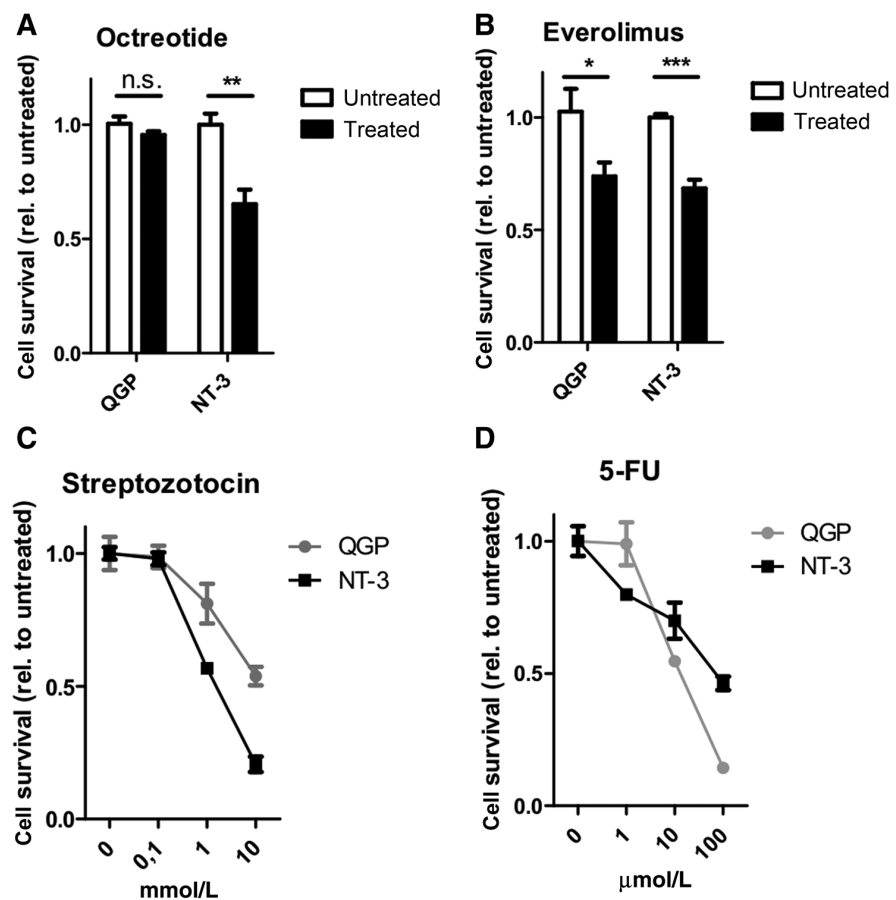


Figure 5.

Treatment response in NT-3 compared with QGP-1. Treatment efficacy of various treatments was assessed in NT-3 and QGP-1 cells after 5 days of treatment by MTT assay. Octreotide at 100 nmol/L (A) compromised NT-3 viability, whereas everolimus at 50 nmol/L was equally effective in NT-3 and QGP-1 (B). Addition of genotoxic chemotherapeutics STZ (C) and 5-FU (D) showed a stronger effect for streptozotocin in NT-3 than QGP-1 cells at all tested doses, but similar responses for 5-FU in both cell lines.

Benten et al.

Xenograft animal model

On the basis of our previous experience with BON and QGP-1 xenografts (11), we transplanted 2×10^6 NT-3 tumor cells into the flanks of NOD/SCID mice and we achieved a tumor take rate of 94% (15/16). NT-3 tumor growth *in vivo* was very slow, with the first palpable nodes detected approximately 6 weeks after cell transplantation. Because of the small tumor size during the first 12 weeks, traditional caliper measurements were unreliable and we employed serial MRI of subcutaneous tumor nodules to monitor their growth (Fig. 6A). The tumors were akin to human neuroendocrine tumors on MRI imaging, with a strong enhancement in T2-weighted sequences (Fig. 6A). Median NT-3 tumor growth rate (as measured by tumor volume) was $+139\% \pm 13\%$ per 4 weeks (Fig. 6B). The proliferative index corresponded well to the proliferative index of the original tumor (15%–20% Ki-67 labeling rate; focally up to 25%). mRNA expression profiles of neuroendocrine markers in subcutaneous tumors were in line with expression profiles of NT-3 cells *in vitro* (Fig. 6C). In contrast to our previous xenograft experiments with BON and QGP-1 cells (11), we did not detect any necrotic areas within the tumor, while macroscopic appearance of NT-3 tumors showed high vascularization (Fig. 6D). We detected high mRNA expression of human CgA, synaptophysin, and the somatostatin receptors SST1, 2, 3, and 5. In addition, serum analyses of tumor-bearing mice after 16 weeks demonstrated detectable levels of human insulin (median 118 mU/L, range 6–412 mU/L), and insulin expression in xenograft tumor cells was verified by IHC (Fig. 6E). These results confirmed the functional well-differentiated phenotype of the tumor xenograft.

Histology of dissected xenograft tumors at the end of animal experiments recapitulated the insular and nesting growth pattern of the original patient's tumor with highly abundant stroma (Fig. 6F). Positive staining for CgA and synaptophysin confirmed the neuroendocrine identity of xenografts. Also, IHC for human cytokeratins revealed CK18 and CK19 expression in both the original tumor and in NT-3 xenografts (Supplementary Fig. S5). Although not being a focus of this study, initial pilot experiments using intraportal injection of NT-3 cells led to development of small liver tumors in one out of three transplanted mice. These were also rich in stroma tissue and were positive for CgA, indicating that our new cell line will also be suitable for future experiments on orthotopic NET liver metastases (Supplementary Fig. S6).

Discussion

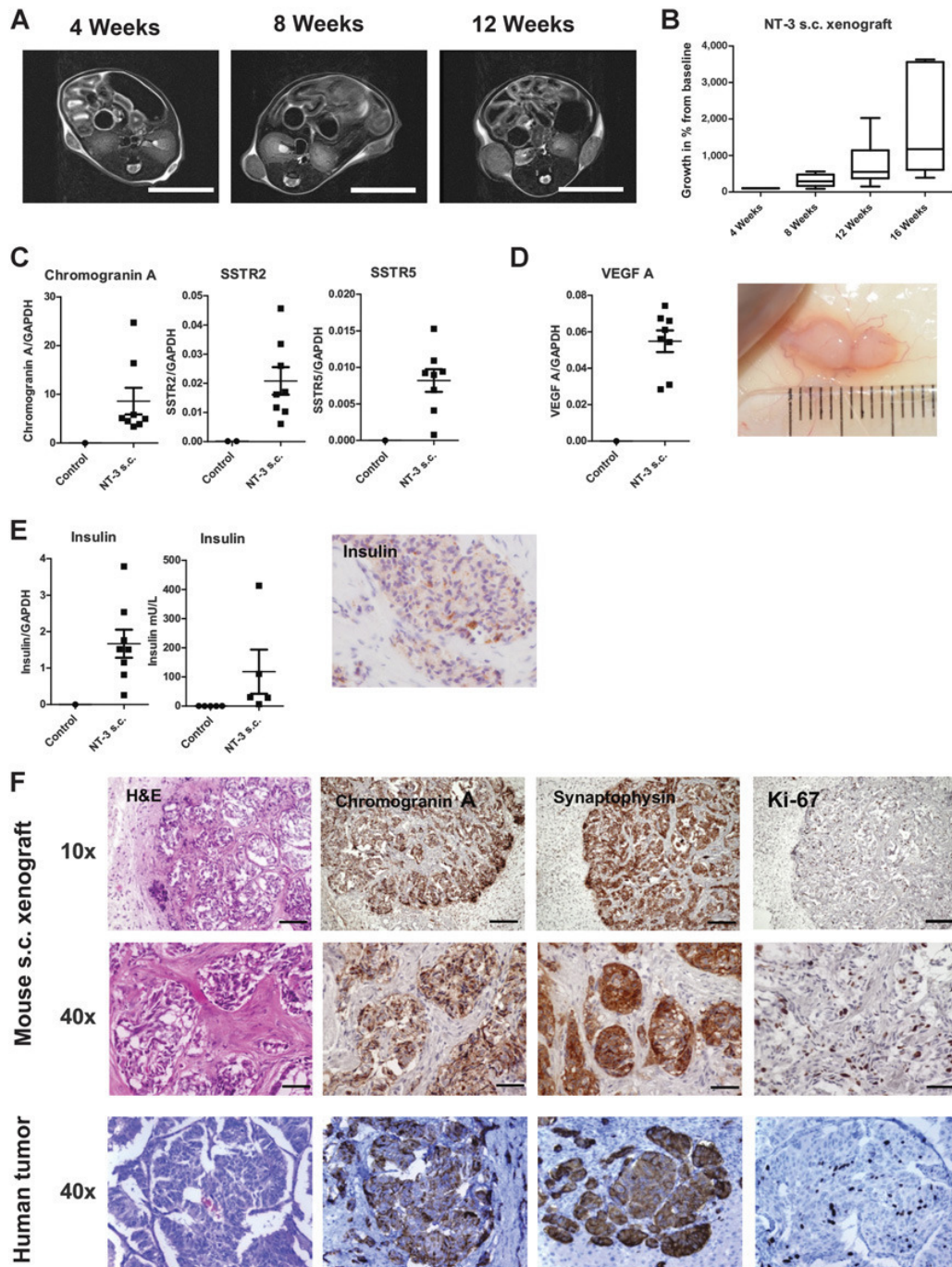
In vitro and *in vivo* evaluation of future therapies in preclinical models remains the mainstay of successful development of novel treatments ultimately improving patient care in cancer patients (18, 19). The use of cell lines has recently been challenged by the announcement of the National Cancer Institute (NCI) to abandon their NCI-60 panel of cell lines and to encourage the use of patient-derived xenografts. Nevertheless the NCI still recommends the use of well-characterized novel primary cell cultures to explore future therapeutic options, and our novel cell line and the corresponding xenograft model fulfill these criteria.

So far, testing of potentially new targets in neuroendocrine tumor disease has been impaired by the lack of suitable preclinical models. The available genetic NET models display either a rapid and short-term fatal disease course, that is, Rip1-Tag2 mice (20),

or a very benign course without frequent development of disseminated tumor disease, such as β -cell-specific *MEN1* knockout mice (21). Likewise, the reported xenograft models of QGP-1 and BON cells show extremely rapid tumor growth with development of large necrotic areas and severe tumor disease in mice within a few weeks (10, 11). Hence, there is great need for a suitable and clinically relevant *in vivo* tumor model to assess future therapies in NET disease. The here reported novel pancreatic neuroendocrine tumor cell line NT-3 closely resembles the patient's original tumor: it has a well-differentiated phenotype, is functionally active, and has a slow growth rate *in vitro* and *in vivo*, thereby recapitulating the cardinal features of neuroendocrine tumors and providing a hitherto unavailable relevant preclinical neuroendocrine tumor model.

Currently, only few NET cell lines are available. Of these, the neuroendocrine cell lines derived from small intestinal NETs (KRJ-1, GOT1, P-SIS) probably display a well-differentiated phenotype. Because of their limited availability, a thorough characterization of their biology and validation as a relevant NET model *in vivo* is still pending. From a clinical point of view, treatment of pancreatic NET is more challenging and associated with a worse prognosis than small intestinal NETs. The two available pancreatic neuroendocrine cell lines BON and QGP-1 have so far been widely used as a *bona fide* NET model. Documented fast growth rates of these tumor cells have put their usefulness as NET models into question. Our detailed characterization of BON and QGP-1 further substantiates such concerns as expression of neuroendocrine markers in these cell lines was low. Given that both cell lines have been in use for more than 25 years, it appears likely that the cells have acquired a more malignant phenotype in culture. Although the currently detected doubling times of 36 and 38 hours for BON and QGP-1 cells, respectively, are higher than the originally reported doubling times of 60 hours (BON) (22) and 84 hours (QGP-1; ref. 23), these cells proliferate much faster, even in their early passage numbers, compared with NT-3 with a doubling time of more than 240 hours under growth factor-stimulated conditions. The recent discovery of mutations in *RAS* and *TP53* genes in BON and QGP-1 added to these concerns as well-differentiated NET rarely harbor such mutations (24–26). In contrast, our new NT-3 cell line does not harbor mutations in *RAS* or *TP53* genes thereby resembling the nonmutated status of well-differentiated NET for these oncogenes. It is open to speculation, whether potentially effective new therapeutics for NET patients have been dismissed or development has been prematurely stopped due to failure in BON and QGP-1 cells.

We found a missense mutation in the *MEN1* gene in NT-3 cells. This mutation is listed as a known SNP (rs2959656) with a minor allele frequency between 6% and 16% in different populations. Although the SNP has been described in sporadic insulinoma, parathyroid adenoma, and hemangioblastoma (27), the pathogenic role of this variant is controversial due to the high frequency in the general population. Targeted sequence analysis of "classical" pNET-associated genes, that is, *VHL*, *MEN1*, *TSC1*, *TSC2*, *DAXX*, and *ATRX* did not reveal any further mutations, which is in line with findings from Jiao and colleagues reporting mutations in either of these genes in only 68% of patients with sporadic pancreatic NETs (26). The lack of such mutations in NT-3 offers exciting new opportunities for future analyses as targeted knockdown will help to establish the role of either of the above-mentioned genes with regard to tumor progression and therapeutic response of pNETs. Furthermore, detailed genetic and

**Figure 6.**

Xenograft tumor model. Subcutaneous tumors in NT-3 transplanted NOD/SCID mice were first detected by MRI (A). Growth curves were calculated from serial imaging of tumors over 16 weeks (B). Expression profiles of tumor xenografts resembled the well-differentiated phenotype of NT-3 cells *in vitro* (C). Normal murine liver tissue of control mice (no xenograft) served as negative controls. Xenograft tumors were highly vascularized and correspondingly expressed high levels of human VEGF A (D). Analysis of human insulin content in mouse serum 16 weeks after transplantation of tumor cells confirmed the functionally active phenotype of NT-3 *in vivo*. Correspondingly, IHC showed insulin expression in xenografts (E). Histology of dissected xenograft tumors confirmed neuroendocrine identity and displayed a morphology and proliferation rate akin to the original human tumor (F). Scale bar, 1 cm for MRI images and 200 μm (10 \times) and 50 μm (40 \times) for microscopic images.

Benten et al.

proteomic analyses could identify yet unknown mechanism for the development and progression of pNETs.

One of the main obstacles in obtaining primary NET cultures is the unsolved question of optimal growth conditions for these cells (12). We here report an essential role for the supplementation of growth factors EGF and FGF-2 to establish proliferating cell cultures. Earlier studies in BON and QGP-1 cells also found a growth stimulatory role for EGF, FGF-2, TGF- α , and IGF-1 (28–30). Recently, a c-MET stimulating antibody has been identified to promote primary NET cell growth *in vivo* (31). As expression of these growth factors apart from IGF-1 and TGF- α is generally low in NET cells, the tumor microenvironment most likely contributes these growth stimulatory factors (28, 32, 33). Indeed, our NT-3 xenograft model of NT-3 supports this hypothesis as NT-3 cells, surrounded *in vivo* by abundant stroma, show a proliferation rate comparable with the *in vitro* growth rate with growth factor stimulation. For further exploration of such interesting new aspects in NET tumor biology, we have conserved tumor-associated fibroblasts from the original patient's tumor, as recently recommended by the NCI for novel primary tumor cell cultures, to study the interaction of NET cells with their microenvironment.

The documented insulin expression and secretion of NT-3 cells warrants evaluation as a potential model for human pancreatic beta cells. Until now, no such human model exists and most basic diabetes research has been performed in a rat insulinoma cell line (INS1E), with obvious limitations such as differences in protein expression and functional status between human and rodent islet cells (34, 35). The only human cell line derived from an insulinoma (called CM) has already lost insulin expression and secretion during *in vitro* culture (36). Recently, a genetically engineered human beta cell line has been presented, but still needs to prove easy access, handling, and a stable phenotype for basic research (37, 38).

Well-differentiated pancreatic NETs are currently treated with somatostatin analogues or STZ/5-FU, and these substances are also effective for growth reduction in our NT-3 cells *in vitro*. Indeed, it has been shown that STZ is particularly potent in SSTR-positive NET (39), pointing toward an increased susceptibility in tumors with a well-preserved neuroendocrine phenotype due to a hitherto undiscovered mechanism. In contrast, 5-FU, which is a general cytotoxic chemotherapeutic agent and therefore also active against dedifferentiated tumors, is also effective in QGP-1. Everolimus was similarly effective in both, NT-3 and QGP-1, as the mTOR pathway is activated in well- and less differentiated tumors (40).

Two of the most effective treatments for patients with NET (e.g., somatostatin analogues and peptide radionuclide therapy) are dependent on expression of SSTRs, in particular, SSTR2 and SSTR5, on the tumor cell surface (41). Until now, improvements in SSTR targeting have been impaired by the lack of suitable and widely available preclinical models. Our novel NT-3-derived animal model has the potential to overcome these limitations as we observed high expression of SSTRs *in vitro* and in xenograft tumors. Recently, clinical pilot studies were initiated to inves-

tigate combinations of radionuclide SSTR-targeted therapies and chemotherapies in NET (42). Making well-differentiated patient-derived cells with relevant SSTR expression, that is, our NT-3 model, widely accessible to translational researchers will aid such attempts in providing a platform to optimize timing and dosing of therapies. Assessing the effect of cotherapeutics on SSTR expression in NT-3 will help choosing effective drug combinations. As a substantial fraction of NET tumors, especially pancreatic NET, do not express sufficient levels of SSTR2 and SSTR5, these patients are currently not amenable to effective treatments. As NET cells do not only express SSTR, but also many other neuroendocrine-specific cell surface receptors (e.g., for incretin hormones like GIP and GLP-1), searching for and evaluating such receptors as therapeutic targets might stimulate development of novel therapies (43).

In summary, we have successfully established a well-differentiated and slow growing pancreatic NET cell line. NT-3 cells and the corresponding xenograft animal model will overcome current limitations in developing and testing novel therapies for this difficult to treat disease.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

D. Benten reports receiving commercial research support as research funding. J. Schrader reports receiving a commercial research grant from Novartis and has received speakers bureau honoraria from Novartis and IPSEN. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: D. Benten, J.R. Izbicki, A.W. Lohse, J. Schrader
Development of methodology: D. Benten, D. Perez, J. Schrader
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): D. Benten, Y. Behrang, L. Unrau, V. Weissmann, G. Wolters-Eisfeld, S. Burdak-Rothkamm, F.R. Stahl, M. Anlauf, P. Grabowski, M. Möbs, J. Dieckhoff, B. Sipos, C. Eggers, D. Perez, M. Bockhorn, J. Schrader
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): D. Benten, Y. Behrang, L. Unrau, G. Wolters-Eisfeld, S. Burdak-Rothkamm, M. Anlauf, B. Sipos, M. Bockhorn, A.W. Lohse, J. Schrader
Writing, review, and/or revision of the manuscript: D. Benten, Y. Behrang, M. Möbs, B. Sipos, M. Bockhorn, A.W. Lohse, J. Schrader
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Dieckhoff, M. Fahl, M. Bockhorn, J.R. Izbicki, A.W. Lohse
Study supervision: D. Benten, J.R. Izbicki, A.W. Lohse, J. Schrader

Acknowledgments

This work was funded by Forschungsförderungsfond Medizin of University Medical Center Hamburg-Eppendorf (to J. Schrader) and a research grant from the Theranostic Research Network Bad Berka (to J. Schrader). D. Benten and L. Unrau received grant support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 841, project C7). G. Wolters-Eisfeld received grant support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (WO 1967/2-1).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 26, 2017; revised August 28, 2017; accepted December 20, 2017; published OnlineFirst January 12, 2018.

References

1. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008;9:61–72.
2. Clewemar Antonodimitrakis P, Sundin A, Wassberg C, Granberg D, Skogseid B, Eriksson B. Streptozocin and 5-fluorouracil for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors: efficacy,

- prognostic factors and toxicity. *Neuroendocrinology* 2016;103:345–53.
3. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. RAD001 in advanced neuroendocrine tumors, third trial (RADIANT-3) study group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:514–23.
 4. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:501–13.
 5. Sabet A, Biersack HJ, Ezziddin S. Advances in peptide receptor radionuclide therapy. *Semin Nucl Med* 2016;46:40–6.
 6. Grozinsky-Glasberg S, Shimon I, Rubinfeld H. The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2012;96:173–87.
 7. Babu V, Paul N, Yu R. Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* 2013;42:912–23.
 8. Taelman V, Radojewski P, Marincek N, Ben-Shlomo A, Grotzky A, Orlariu C, et al. Up-regulation of key molecules for targeted imaging and therapy. *J Nucl Med* 2016;57:1805–1810.
 9. Leu FP, Nandi M, Niu C. The effect of transforming growth factor beta on human neuroendocrine tumor BON cell proliferation and differentiation is mediated through somatostatin signaling. *Mol Cancer Res* 2008;6:1029–42.
 10. Evers BM, Hurlbut SC, Tyring SK, Townsend CM Jr, Uchida T, Thompson JC. Novel therapy for the treatment of human carcinoid. *Ann Surg* 1991;213:411–6.
 11. Fraedrich K, Schrader J, Itrich H, Keller G, Gontarewicz A, Matzat V, et al. Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model. *Clin Cancer Res* 2012;18:4621–32.
 12. Lundqvist M, Oberg K. In vitro culture of neuroendocrine tumors of the pancreas and gut. *Acta Oncol* 1989;28:335–9.
 13. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011;53:1192–205.
 14. Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, et al. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003;124:432–44.
 15. Bente D, Follenzi A, Bhargava KK, Kumaran V, Palestro CJ, Gupta S. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. *Hepatology* 2005;42:140–8.
 16. Krieg A, Mersch S, Boeck I, Dizdar L, Weihe E, Hilal Z, et al. New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One* 2014;9:e88713.
 17. van der Meulen T, Huising MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol* 2015;54:R103–17.
 18. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603–7.
 19. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell* 2015;163:39–53.
 20. Fendrich V, Lopez CL, Manoharan J, Maschuw K, Wichmann S, Baier A, et al. Enalapril and ASS inhibit tumor growth in a transgenic mouse model of islet cell tumors. *Endocr Relat Cancer* 2014;21:813–24.
 21. Jiang X, Cao Y, Li F, Su Y, Li Y, Peng Y, et al. Targeting β -catenin signaling for therapeutic intervention in MEN1-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Nat Commun* 2014;5:5809.
 22. Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Haber BE, Beauchamp RD, Rajaraman S, et al. Differential effects of sodium butyrate and hexamethylene bisacetamide on growth and secretion of cultured human endocrine tumor cells. *Arch Surg* 1991;126:467–72.
 23. Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K, Abe M. Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gan* 1980;71:596–601.
 24. Boora GK, Kanwar R, Kulkarni AA, Pleticha J, Ames M, Schroth G, et al. Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines. *Cancer Genet* 2015;208:374–81.
 25. Vandamme T, Peeters M, Dogan F, Pauwels P, Van Assche E, Beyens M, et al. Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *J Mol Endocrinol* 2015;54:137–47.
 26. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011;331:1199–203.
 27. Jyotsna VP, Malik E, Birla S, Sharma A. Novel MEN 1 gene findings in rare sporadic insulinoma—a case control study. *BMC Endocr Disord* 2015;15:44.
 28. Townsend CM Jr, Ishizuka J, Thompson JC. Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncol* 1993;32:125–30.
 29. Siddique ZL, Drozdov I, Floch J, Gustafsson BI, Stunes K, Pfragner R, et al. KRJ-1 and BON cell lines: defining an appropriate enterochromaffin cell neuroendocrine tumor model. *Neuroendocrinology* 2009;89:458–70.
 30. Di Florio A, Sancho V, Moreno P, Delle Fave G, Jensen RT. Gastrointestinal hormones stimulate growth of Foregut Neuroendocrine Tumors by transactivating the EGF receptor. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:573–82.
 31. Krampitz GW, George BM, Willingham SB, Volkmer JP, Weiskopf K, Jahchan N, et al. Identification of tumorigenic cells and therapeutic targets in pancreatic neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:4464–9.
 32. Chaudhry A, Funa K, Oberg K. Expression of growth factor peptides and their receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Acta Oncol* 1993;32:107–14.
 33. Briest F, Grabowski P. PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics* 2014;4:336–65.
 34. MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Kendrick M, Thonpho A, et al. Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *J Biol Chem* 2011;286:18383–96.
 35. Martens GA. Species-related differences in the proteome of rat and human pancreatic beta cells. *J Diabetes Res* 2015;2015:549818.
 36. Gragnoli C. The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies. *J Cell Physiol* 2008;216:569–70.
 37. Scharfmann R, Pechberty S, Hazhouz Y, von Bülow M, Bricout-Neveu E, Grenier-Godard M, et al. Development of a conditionally immortalized human pancreatic β cell line. *J Clin Invest* 2014;124:2087–98.
 38. Benazra M, Lecomte MJ, Colace C, Müller A, Machado C, Pechberty S, et al. A human beta cell line with drug inducible excision of immortalizing transgenes. *Mol Metab* 2015;4:916–25.
 39. Krug S, Boch M, Daniel H, Nimphius W, Müller D, Michl P, et al. Streptozocin-based chemotherapy in patients with advanced neuroendocrine neoplasms—predictive and prognostic markers for treatment stratification. *PLoS One* 2015;10:e0143822.
 40. Shida T, Kishimoto T, Furuya M, Nikaido T, Koda K, Takano S, et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:889–93.
 41. Oberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 2010;139:742–53.
 42. Claringbold PG, Turner JH. Pancreatic neuroendocrine tumor control: durable objective response to combination 177Lu-octreotate-capicitabine-temozolomide radiopeptide chemotherapy. *Neuroendocrinology* 2016;103:432–9.
 43. Reubi JC, Waser B. Triple-peptide receptor targeting in vitro allows detection of all tested gut and bronchial NETs. *J Nucl Med* 2015;56:613–5.

2 Einleitung

2.1 Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) umfassen eine heterogene Familie relativ seltener Tumore, welche aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems hervorgehen und sich innerhalb des Verdauungs- und Respirationstraktes entwickeln, jedoch ebenso in anderen Organen, wie z.B. der Leber, den Nieren oder den Ovarien, vorgefunden werden können [1].

Trotz ihrer biologischen und klinischen Heterogenität repräsentieren die NEN eine Tumoreinheit, da sie entscheidende Gemeinsamkeiten haben: die morphologische Ähnlichkeit, die Produktion von biogenen Aminen und Peptidhormonen, sowie die Expression der neuroendokrinen Zellmarker Chromogranin A (CgA) und Synaptophysin [2].

Die Einteilung neuroendokriner Neoplasien erfolgt entsprechend der neuen WHO-Klassifikation dichotom anhand ihres Differenzierungsgrades in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (NET) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC). Basierend auf ihre proliferative Aktivität erfolgt bei NETs eine weitere Dreiteilung in Grad 1-Tumore (G1: <2 Mitosen/10 Hauptgesichtfelder bzw. high power fields (HPF), Ki-67 Index <2%), Grad 2-Tumore (G2: 2-20 Mitosen/10 HPF, Ki-67 Index 3-20%) und Grad 3-Tumore (G3: >20 Mitosen/10 HPD, Ki-67 Index >20%) [3].

Die große Mehrheit der NEN sind hochdifferenziert [1] und zeichnen sich durch ihr langsames Wachstum, sowie ihr Potenzial zur Sekretion funktionell aktiver Hormone aus. Hormon-aktive Tumore kommen am häufigsten im Dünndarm und im Pankreas vor. Neuroendokrine Tumore des Dünndarmes können ein Karzinoid-Syndrom hervorrufen. Vom Tumor freigesetzte bioaktive Substanzen, wie z.B. Serotonin und Tachykinine, manifestieren sich klinisch jedoch erst bei Anschluss an den systemischen Kreislauf nach hepatischer Metastasierung. Das Karzinoid-Syndrom ist charakterisiert durch eine Trias bestehend aus Flushing, Diarrhoe und abdominellen Schmerzen [4]. Im Gegensatz dazu wird die klinische Symptomatik von Pankreas-NEN unabhängig von der Metastasierung des Tumors sichtbar, da vom Tumor freigesetzte pankreatische Hormone nicht durch hepatische Metabolisierung inaktiviert werden. Das häufigste Hormonsyndrom bei Pankreas-NEN ist das Insulinom. Symptome eines aktiven Insulinoms sind die einer Hypoglykämie: Sehstörungen, Kopfschmerzen, Zittern, Schwitzen und Schwäche. Ein langfristiges Symptom ist die Gewichtszunahme [5].

2.2 Aktueller Stand der medikamentösen Therapie pankreatischer NETs

Bei nicht resektablen pankreatischen NETs richtet sich die Wahl der Therapie nach der Proliferationsrate und der Tumorlast. Handelt es sich um einen gut differenzierten, langsam wachsenden NET (Ki-67 <10%) mit niedriger bis mittlerer hepatischer Tumorlast, der somatostatinrezeptor-positiv ist, kommen Somatostatinanaloga zum Einsatz. Hierbei werden hohe Stabilitätsraten (50-60%), jedoch geringe Remissionsraten (<10%) beschrieben.

Bei hochproliferativen NETs (Ki-67 >10%) mit hoher hepatischer Tumorlast wird die Chemotherapie als Erstlinientherapie empfohlen. Die Kombination von Streptozotocin (STZ) und 5-Fluoruracil (5-FU) bildet hierbei den Standard. Eine Aussage über die Überlegenheit der Kombination mit dem Angiogeneseinhibitor Bevacizumab gegenüber der reinen Chemotherapie lässt sich ohne komparative Studie noch nicht treffen. Alternativ bietet sich als orales Chemotherapieschema die Kombination von Capecitabin und Temozolamid an. Everolimus oder Sunitinib

kommen in der Zweitlinientherapie bei progredienten nicht-resektablen pankreatischen NETs zum Einsatz [6]. Seit kurzem ist zudem die Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie (PRRT) mit ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE bei NETs zugelassen. Sie wird bei pankreatischen G1/G2-NETs nach Versagen einer medikamentösen Therapie bei hohem SSTR-Besatz angewendet [7].

In Zeiten der Präzisionsmedizin wird in der Therapiewahl zukünftig das Augenmerk zunehmend auch auf den Mutationsstatus des Tumors gerichtet, um Patienten eine „maßgeschneiderte“ Therapie anbieten zu können. So deuten Forschungsergebnisse bspw. darauf hin, dass pankreatische NETs mit multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1)-Mutation besonders gut auf die Kombinationstherapie mit FAK (focal adhesion kinase)- und mTOR-Inhibitoren [8], sowie auf β -catenin-Inhibitoren ansprechen [9]. Bei Tumoren mit ATRX- oder DAXX-Mutation konnte eine Sensitivität gegenüber einer ATR-Inhibition nachgewiesen werden [10]. Zudem scheint die Genetik-basierte Immunchemotherapie zukunftsweisend zu sein: Die Identifizierung spezifischer somatischer Mutationen in einem ausgewählten Tumor würde die Anwendung personalisierter Impfprotokolle erlauben. Die tumorspezifischen Mutationen bilden ideale therapeutische Zielstrukturen, da gesundes Gewebe diese nicht exprimiert und mittels Impfung rekrutierte T-Zellen somit nur bösartige Zellen erkennen und angreifen [11, 12].

Als neue Zielstruktur wird zudem RBP2 (retinoblastoma binding protein 2) gehandelt: dessen Expressionslevel in NETs ist außergewöhnlich hoch und neue Forschungsarbeiten zeigen, dass die Modulation von RBP2 *in vitro* und *in vivo* die Tumorgenese beeinflusst [13].

Zudem konnte gezeigt werden, dass Notch-Signalwege eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese von NETs spielen, sodass die in Entwicklung stehenden modulierenden oder inhibitorischen Medikamente in der Behandlung von NETs zur Anwendung kommen könnten [14].

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die Kombination von Somatostatinrezeptoragonisten und Valproinsäure (VPA). *In vitro*- und *in vivo*-Versuche legten nahe, dass VPA die Expression von SSTR2 in NETs stimuliert. Die daraus resultierende höhere SSTR2-Dichte förderte die Medikamentenaufnahme in die Tumorzellen, wodurch sich die therapeutische Potenz der Somatostatinrezeptoragonisten deutlich steigerte [15].

2.3 Prä-klinische Modelle zur Entwicklung neuer Therapien

Die Optimierung bestehender, sowie die Entwicklung und Evaluation neuer therapeutischer Zielstrukturen, ist aufgrund der unzureichenden Verfügbarkeit präklinischer Modelle beeinträchtigt.

Derzeit stehen nur wenige NET-Zelllinien zur Disposition [1,16]. Von diesen sind die pankreatischen Zelllinien BON und QGP-1 die meistuntersuchten. Obwohl sie einige NET-Zellmarker exprimieren, stellen BON und QGP-1 keinen repräsentativen, hochdifferenzierten neuroendokrinen Phänotyp dar. Als Grund hierfür sei z.B. genannt, dass diese Zelllinien nicht als Modell für die Erforschung einer Radionuklid-Bildgebung und -Therapie herangezogen werden können, da die SSTR-Expression zu niedrig und die Octreotid-Radionuklidaufnahme nur geringfügig ist [17].

Darüber hinaus beträgt die Verdopplungszeit der rasant wachsenden BON-Zellen weniger als 48 Stunden, womit sie keine realistischen Vertreter eines langsam wachsenden NET-Modells darstellen [18]. In Xenograftmodellen zeigen beide Zelllinien aufgrund des raschen Tumorstadiums, bei gleichzeitig insuffizienter Vaskularisierung, eine frühzeitige Tumornekrose.

2.4 Etablierung einer neuen, gut differenzierten Zelllinie

Obwohl die Etablierung pankreatischer neuroendokriner Tumorzelllinien mit einem gut differenzierten Phänotyp und einer niedrigen Proliferationsrate unabdingbar ist für die Validierung neuer therapeutischer Zielstrukturen in der präklinischen Forschung, hat die intensive Forschung der letzten 25 Jahre keine neue Generation solcher Zelllinien hervorgebracht. undefinierte optimale Wachstumsbedingungen für NET-Zellen und Überwucherung durch kontaminierende Tumorfibroblasten sind wahrscheinlich für diese Schwierigkeiten verantwortlich zu machen [19].

Diese Arbeit berichtet von der erfolgreichen Etablierung einer neuen pankreatischen NET-Zelllinie, hervorgegangen aus der Lymphknotenmetastase eines Patienten mit funktionell aktivem Insulinom. Diese Zellen, genannt NT-3, sind nun schon seit über 4 Jahren in Kultur und zeichnen sich nach wie vor durch einen stabilen, gut differenzierten Phänotyp aus, der auch nach Xenotransplantation erhalten bleibt. Die Charakterisierung und Proliferationsanalysen dieser Zellen deuten stark darauf hin, dass diese Zelllinie ein bis dato nicht verfügbares, klinisch relevantes *in vitro*- und *in vivo*-Modell eines gut differenzierten und langsam wachsenden neuroendokrinen Tumors darstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Morphologie der Zelllinie

Im Anschluss an die mechanische Dissektion und Kollagenaseverdau der ursprünglichen chirurgischen Gewebeprobe, enthielten die Zellkulturen neben Tumorzellen auch diverse Komponenten stromaler Zellen. Nach acht Wochen sequenzieller Trypsinierung und fortlaufender Passagierung konnten kontaminierende Fibroblasten eliminiert und eine reine Tumorzellkultur gewonnen werden, welche den Namen NT-3 erhielt.

Fünf Monate nach Erzeugung der primären Zellkultur waren genug Zellen vorhanden für die Durchführung einer erfolgreichen Kryokonservierung und zur Bestätigung des neuroendokrinen Phänotyps (u.A. Chromogranin A- und Synaptophysin-Expression). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Zählung der Passagen begonnen.

Die Bestätigung des Ursprungs unserer neuen Zelllinie wurde durch Bestimmung des genetischen Fingerabdrucks mehrerer Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP = single-nucleotide polymorphism) aus der € des Spendertumors und der NT-3-Zellen erzielt.

Momentan sind die NT-3-Zellen seit 42 Monaten in Kultur und bei Passage 58 angelangt. Die Zellen haben dabei ihre Morphologie und ihren neuroendokrinen Phänotyp beibehalten.

3.2 Neuroendokrine Differenzierung

Die charakteristischen Merkmale neuroendokriner Tumore sind ihr hoher Differenzierungsgrad und ihre funktionelle Aktivität. Die vorhandenen pankreatischen NET-Zelllinien BON und QGP-1 zeichnen sich nicht durch einen beispielhaften neuroendokrinen Differenzierungsstatus aus. Um beide Zelllinien und unsere neue NT-3-Zelllinie miteinander zu vergleichen, wurde eine Analyse der Expression von neuroendokrinen Zellmarkern und weiteren zugehörigen Transkriptionsfaktoren durchgeführt.

Dabei konnte bei den NT-3-Zellen eine hohe mRNA Expression von CgA beobachtet werden, wohingegen BON-Zellen eine mäßige und QGP-1-Zellen eine niedrige Expression aufwiesen (Abb. 1A). Dementsprechend zeigte sich in der

Immunfluoreszenzfärbung für CgA eine stark positive Färbung der NT-3 Zellen und eine weniger intensive positive Färbung der BON-Zellen (Abb. 1B).

Den neuroendokrinen Ursprung bestätigend, wurde der neuronale Zellmarker Synaptophysin von allen drei Zelllinien exprimiert, wobei NT-3-Zellen abermals eine deutlich höhere Expression als BON und QGP-1 zeigten.

Ein weiteres typisches Merkmal neuroendokriner Zellen ist die Aufnahme und die Prozessierung von Monoaminen. In NT-3-Zellen konnte die Expression der vesikulären Monoamintransporter 1 und 2 (VMAT 1, VMAT 2) nachgewiesen werden, wogegen QGP-Zellen keine der beiden Transporter exprimierten und BON nur den VMAT1 in geringem Maße.

Auch das NT3-Ursprungstumorgewebe des Patienten zeigte eine positiv-Färbung für CgA, Synaptophysin und VMAT1 (Abb. 1C).

Alle drei Zelllinien exprimierten – in unterschiedlichem Ausmaß – Enzyme der Serotonin-Biosynthese (z.B. Tryptophanhydroxylase 1, Dopa-Hydroxylase) (Suppl. Abb. S2C).

Die neuroendokrine Zelldifferenzierung im Pankreas während der embryonalen Entwicklung wird von mehreren Transkriptionsfaktoren gesteuert, von denen viele auch in adulten Inselzellen exprimiert werden und funktionell relevant sind. In NT-3-Zellen konnte eine hohe Expression von PDX-1, Isl-1, Neurogenin3, NeuroD, Pax4 und Pax 6 beobachtet werden, wohingegen BON-Zellen nur NeuroD und QGP-1-Zellen nur Isl-1 exprimierten.

Als Zeichen ihrer Funktionalität und in Übereinstimmung mit dem funktionellen Insulinom des Patienten wird von den NT-3-Zellen Insulin exprimiert und freigesetzt (Abb. 1E).

Interessanterweise zeigte sich eine variierende Insulinexpression der NT-3-Zellen in Abhängigkeit von der Zugabe oder dem Weglassen der Wachstumsfaktoren EGF (endothelial growth factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor 2): Die Wachstumsfaktorsupplementierung führte zum Abfall der Insulinexpression.

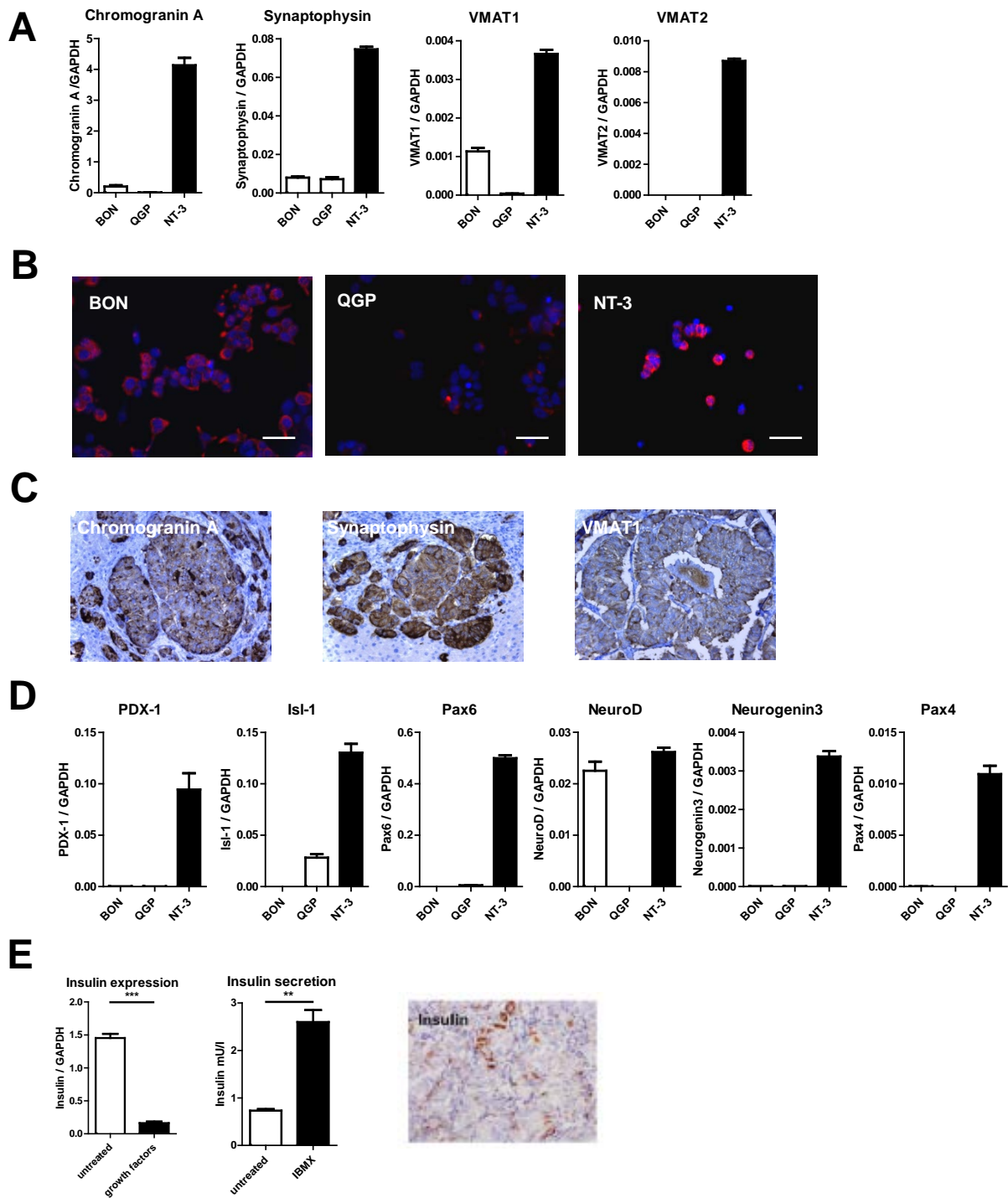
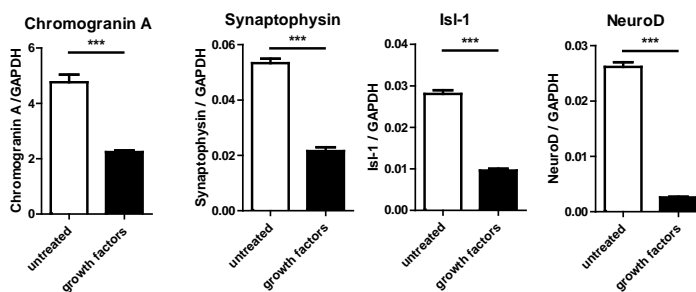


Abbildung 1: Neuroendokriner Phänotyp von NT-3. **A**, Expressionsanalysen von CgA, Synaptophysin und VMAT1 in BON-, QGP-1- und NT-3-Zellen zeigten einen hohen neuroendokrinen Differenzierungsgrad in NT-3-Zellen. **B**, Immunocytochemische Bestätigung der hohen CgA-Expression in NT-3-Zellen. **C**, Färbungen des Primärtumors zur Detektion von CgA, Synaptophysin und VMAT1 entsprechen dem Expressionsprofil der NT-3-Zellen. **D**, Erhöhte Expression neuroendokriner Transkriptionsfaktoren (PDX-1, Isl-1, Pax6, NeuroD, Neurogenin3 und Pax4) untermauert den gut differenzierten Phänotyp der NT-3-Zellen im Vergleich zu BON und QGP-1. **E**, Expression und IBMX-stimulierte Freisetzung von Insulin bestätigten die funktionelle Aktivität der NT-3-Zellen. Passend hierzu zeigte die des Primärtumors seine Insulinexpression.

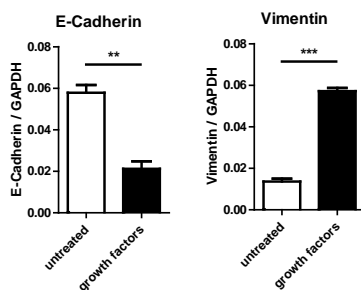
Diese Entdeckung regte die weitere Erforschung dieses Effekts in Bezug auf andere neuroendokrine Marker an. Dabei konnten wir unter Zugabe von Wachstumsfaktoren eine stark reduzierte Expression von CgA, Synaptophysin und allen neuroendokrinen assoziierten Transkriptionsfaktoren feststellen (Abb. 2A und nicht dargestellte Daten).

Dazu passend, zeigten die mit Wachstumsfaktoren behandelten NT-3-Zellen eine Senkung der E-cadherin-Expression und eine Zunahme der Vimentin-Expression, was auf eine epithelial-mesenchymale Transition ihres Phänotyps hinweist (Abb. 2B). Dieses Phänomen wurde widerspiegelt durch das Auftreten kleiner spindelförmiger Subpopulationen in NT-3-Kulturen mit Wachstumsfaktorsupplementierung (Abb. 2C). Nach Abbruch der Wachstumsfaktorsupplementierung verschwanden diese vollständig. Im Gegensatz zu dieser Plastizität der NT-3-Zellen zeigten QGP-1 nur geringe, und BON gar keine Veränderungen des Phänotyps in Abhängigkeit von der Zugabe von Wachstumsfaktoren (nicht dargestellt).

A



B



C

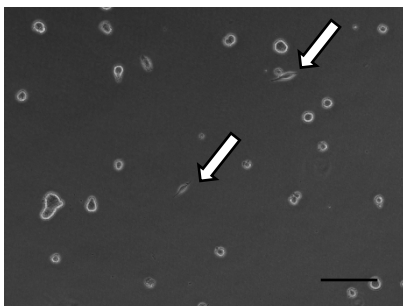


Abbildung 2: Plastizität der NT-3-Zellen. **A**, Zugabe von Wachstumsfaktoren EGF und FGF2 zum Zellkulturmedium verringerte die Expression neuroendokriner Marker in NT-3-Zellen. **B**, Verstärkte Expression von Vimentin und verringerte Expression von E-Cadherin unter o.g. Bedingungen. **C**, Widerspiegelung dieser Veränderungen durch Auftreten spindelartiger Subpopulationen in wachstumsfaktorsupplementierten Zellkulturen.

3.3 Zellproliferation

Gut differenzierte NETs zeichnen sich durch eine niedrige Proliferationsrate und ein langsames Tumorwachstum aus. In Kultur zeigten BON- und QGP-1-Zellen eine Verdopplungszeit von weniger als zwei Tagen (BON $1,5 \pm 0,4$ Tage, QGP-1 $1,6 \pm 0,3$ Tage), unbeeinflusst durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren (Abb. 3A, Suppl. Abb. S3A).

Im Gegensatz dazu wuchsen die NT-3-Zellen langsam, mit einer Verdopplungszeit von $10,9 \pm 0,7$ Tagen (Abb. 3A). In diesem Fall war das Wachstum abhängig von Wachstumsfaktoren, denn ohne deren Zugabe konnte keine Vermehrung dünn ausplattierter NT-3-Zellen beobachtet werden (Fig. 3B).

Das Grading von NETs erfolgt auf der Grundlage der immunhistochemischen Färbung des nukleären Proliferationsfaktors Ki-67. BON und QGP-1 haben einen Ki-67-Index von $80,0 \pm 3,3\%$ bzw. $82,6 \pm 1,0\%$, was einem hochproliferativem G3-Karzinom entspricht. Im Gegensatz dazu wies NT-3 einen Ki-67-Index von nur $2,0\% \pm 0,2\%$ auf, entsprechend einem langsam proliferierenden G1-G2-Tumor. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren war bei BON eine leichte Steigerung des Ki-67-Index um 7% festzustellen. Im Vergleich dazu zeigte NT-3 einen immensen Anstieg um 630% auf einen Ki-67-Index von $14,6\% \pm 1,1\%$ (Abb. 3C und 3D), nun dem Ursprungstumor des Patienten und den Xenograft-Tumoren entsprechend (s.u.).

Ein Wachstum der NT-3-Zellen, unabhängig von der Zelladhäsion an der extrazellulären Matrix, als Zeichen der Malignität und der Metastasierungsfähigkeit, wurde durch einen Soft Agar Assay nachgewiesen. Von 1×10^5 im Soft Agar ausplattierten Zellen, formten 2200 Zellen mit einer Latenz von 12 Wochen Cluster bestehend aus 10-20 Zellen, was einer Koloniebildungsfrequenz von ca. 2% entspricht (Suppl. Abb. S3B).

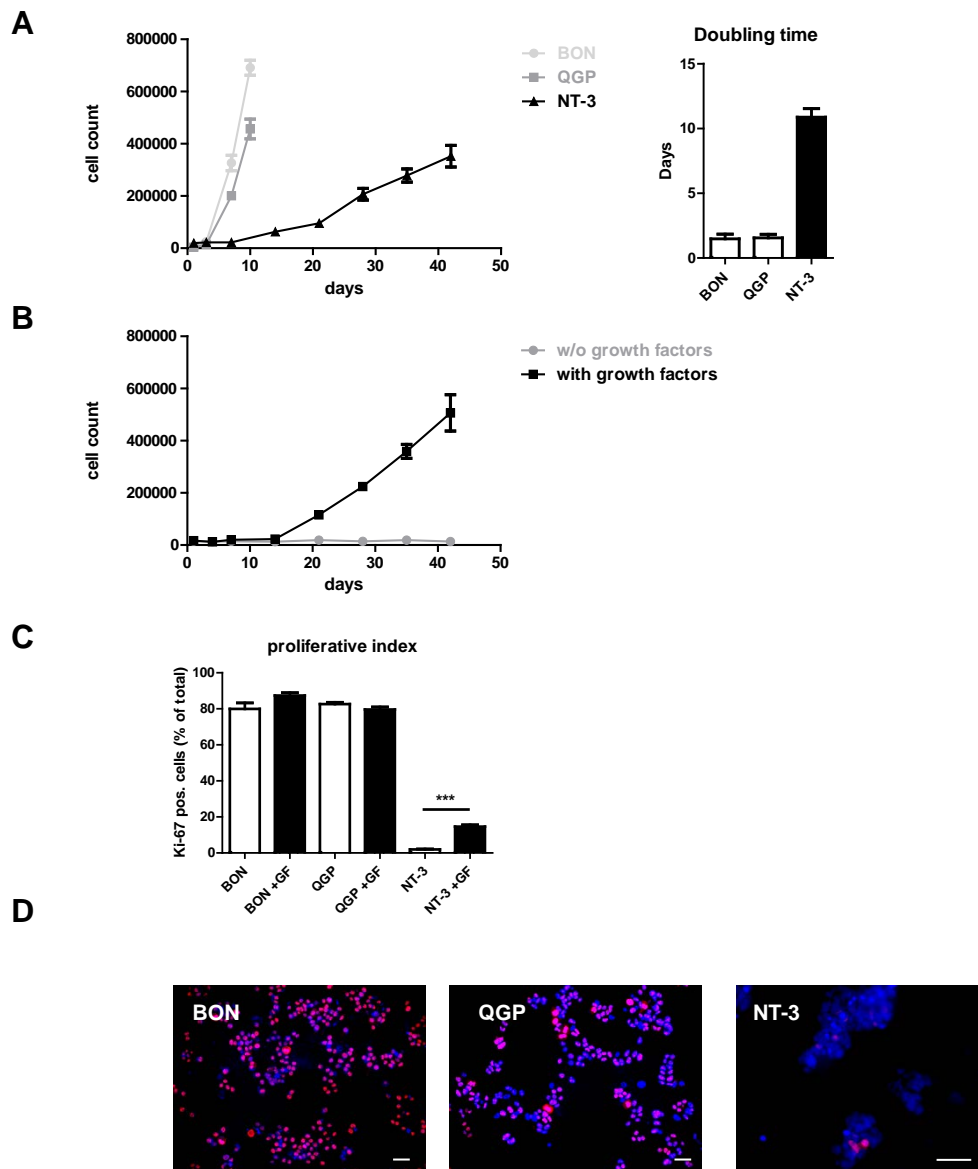


Abbildung 3: Zellproliferation. **A**, Die Wachstumskurven der Tumorzellen in wachstumsfaktorsupplementierter Kultur zeigen eine steile Wachstumsrate von BON und QGP1, wohingegen NT-3 ein langsames Wachstum über den Verlauf von 7 Wochen zeigt. **B**, Keine Proliferation von NT-3 bei Weglassen von Wachstumsfaktoren. **C** und **D**, Ki-67-Färbungen zur Berechnung der Proliferationsindizes von BON, QGP-1 und NT-3 mit und ohne Wachstumsfaktorsupplementierung.

3.4 Therapieansätze

Somatostatinrezeptoren (SSTRs) sind essentielle therapeutische Zielstrukturen für Somatostatinanaloga, sowie für die Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie im Rahmen der Behandlung von NETs.

NT-3-Zellen weisen eine starke mRNA-Expression von SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR5 auf, wobei die Expression von SSTR1 besonders ausgeprägt ist. Im Kontrast dazu zeigen BON- und QGP-1 nur eine schwache oder gar keine Expression dieser Rezeptoren (Abb. 4A). Keine der drei Zelllinien exprimiert SSTR4. Im Western Blot konnte die hohe SSTR-Expression bestätigt werden und es zeigte sich zudem, dass der klinisch relevanteste SSTR2 ausschließlich von NT-3 exprimiert wird, während SSTR3 und SSTR5 auch von BON exprimiert werden (Abb. 4B).

Passend dazu, zeigte sich beim Primärtumor des Patienten eine Positivfärbung für SSTR2A und SSTR5 in der Immunhistochemie (Supp. Abb. S4A und S4B).

Einen weiteren Ansatzpunkt in der Behandlung von NETs bilden die Angiogenesefaktoren. Unter Standard-Kulturbedingungen war die VEGF-A- und VEGF-B-Expression in NT-3 dreifach höher als in BON und QGP-1 (Abb. 4C). Darüber hinaus exprimieren NT-3-Zellen auch den proangiogenetischen Wachstumsfaktor Angiopoietin 2 (ANG2) in höherem Maße als BON- und QGP-1-Zellen (Abb. 4C).

Wurden die Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (0,5% Sauerstoff), so konnte ein Anstieg in der VEGF-Expression festgestellt werden (Abb. 4D), die ANG2-Expression blieb jedoch unverändert (nicht dargestellt). ELISA-Testungen der Zellkulturüberstände bestätigten die VEGF-Sekretion unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 4E). Die Schaffung eines relevanten hypoxischen Milieus konnte durch die hochregulierte Expression von Carboanhydrase IX, einem Hypoxie-induziertem Gen, bestätigt werden (Abb. 4F und 4G).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die neue Zelllinie NT-3 die Kriterien eines Modells erfüllt, das zur Erforschung SSTR-basierter antiproliferativer und VEGF-basierter anti-angiogenetischer Behandlungen bestens geeignet ist.

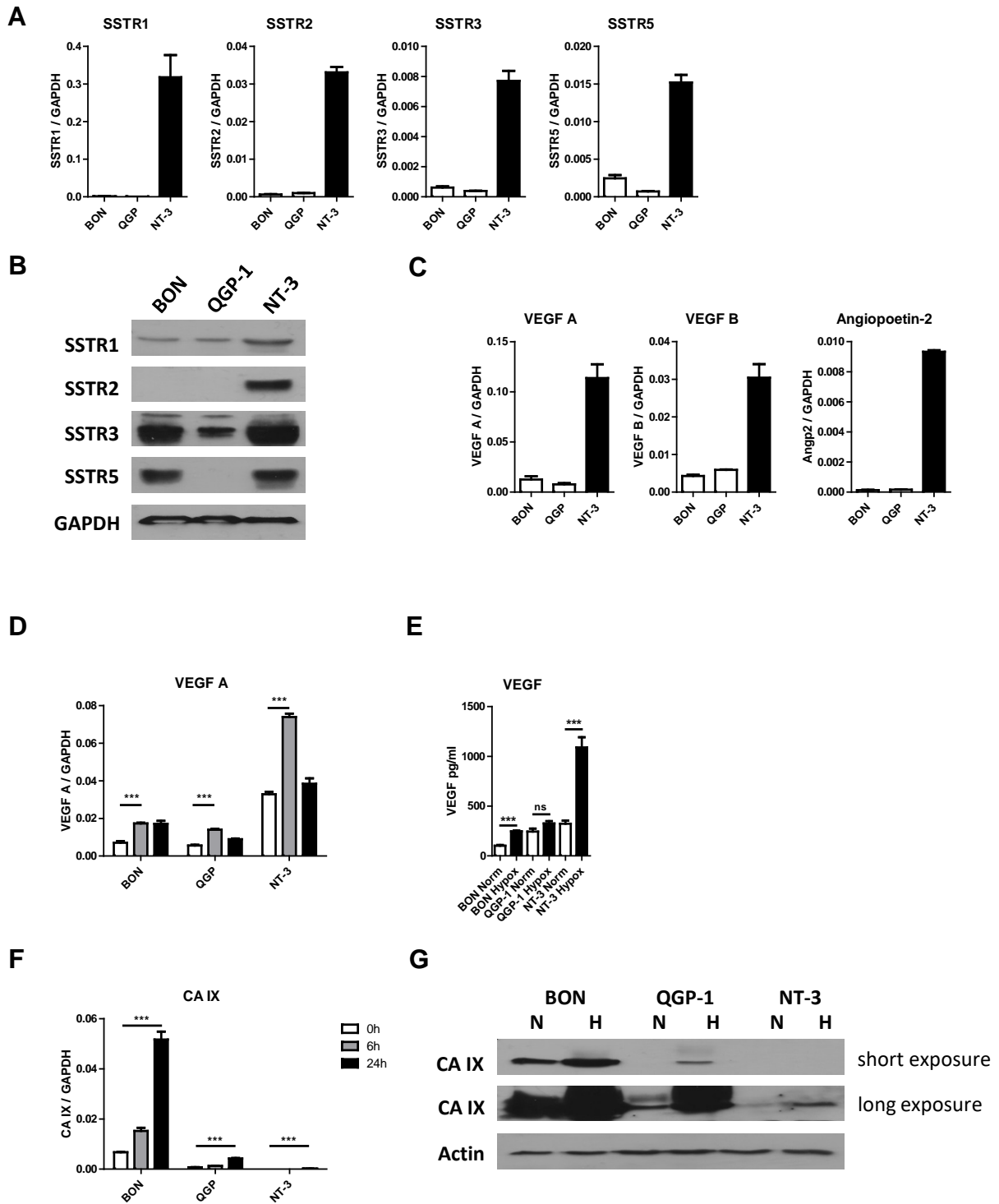


Abbildung 4: Therapeutische Zielstrukturen von NT-3. A und B, Western Blot und qPCR-Analysen von SSTR-Subtypen zeigen eine höhere Expression von SSTR1 und SSTR2 bei NT-3, verglichen zu BON und QGP-1. C, mRNA-Expression von VEGF A, VEGF B und Angiopoetin ist in NT-3-Zellen mind. Dreimal höher als in BON- und QGP-1-Zellen. Weitere Zunahme der VEGF A-Expression unter hypoxischen Bedingungen nach 6 und 24 Stunden (D) und Bestätigung der VEGF-Freisetzung durch ELISA des Zellkulturüberstands €. Als Marker der hypoxischen Kulturbedingungen konnte eine Steigerung der Carboanhydrase IX (CAIX)-Expression in den Tumorzellen nach 6 und 24 Stunden in der qPCR (F) und nach 24 Stunden im Western Blot (G) festgestellt werden.

3.5 Therapieansprechen

Die aktuellen Leitlinien sprechen bei fortgeschrittenen pankreatischen NETs die Empfehlung für eine Behandlung mit Somatostatinanaloga, Chemotherapie mit Streptozotocin/5-FU und zielgerichteten Therapien mit Everolimus und Sunitinib aus. Um das Potenzial unserer neuen NT-3-Zellen in Anbetracht von Studien zukünftiger Therapiemöglichkeiten zu evaluieren, untersuchten wir die Wirksamkeit aktueller Therapien im direkten Vergleich zu QGP-1-Zellen. Unter fünftägiger Behandlung mit 100nmol/L Octreotid beobachteten wir eine signifikante (-34,8%, $P < 0,001$) Reduktion der NT-3-Zellen (Abb. 5A). Im Gegensatz dazu zeigten QGP-1-Zellen, welche nur in geringem Maße SSTRs exprimieren, keine signifikante Zellzahlreduktion (-4,6%, $P = 0,22$). Eine fünftägige Behandlung der Zellen mit 50nmol/L Everolimus resultierte in eine Minderung der Zellzahl um 31,5% bei NT-3 und um 26,2% bei QGP-1 ($P < 0.001$) (Abb. 5B). Die Behandlung mit Sunitinib in Dosen bis zu 500nmol/L beeinträchtigte weder das Überleben, noch die Proliferation keiner der beiden Zelllinien. Zur Beurteilung des Therapieansprechens auf eine standardmäßige zytotoxische Chemotherapie, analysierten wir die dosisabhängige Wirkung von Streptozotocin und 5-FU auf die Zellviabilität. Eine fünftägige Behandlung mit 1 mmol/L Streptozotocin resultierte in einen Abfall der Zellviabilität um $-43,3\% \pm 1,1\%$ bei NT-3 ($P < 0,001$), im Vergleich zum niedrigeren Abfall um nur $-18,9\% \pm 7,5\%$ ($P = 0.10$) bei QGP-1 (Abb. 5C). Eine Behandlung mit 5-FU war bei beiden Zelllinien wirksam: Bei Verabreichung von 10 $\mu\text{mol/L}$ über fünf Tage zeigte sich eine Abnahme der Zellviabilität um $-30,1\% \pm 8,8\%$ ($P = 0,014$) bei NT-3 und um $-49,7\% \pm 6,0\%$ ($P = 0,0002$) bei QGP-1 (Abb. 5D).

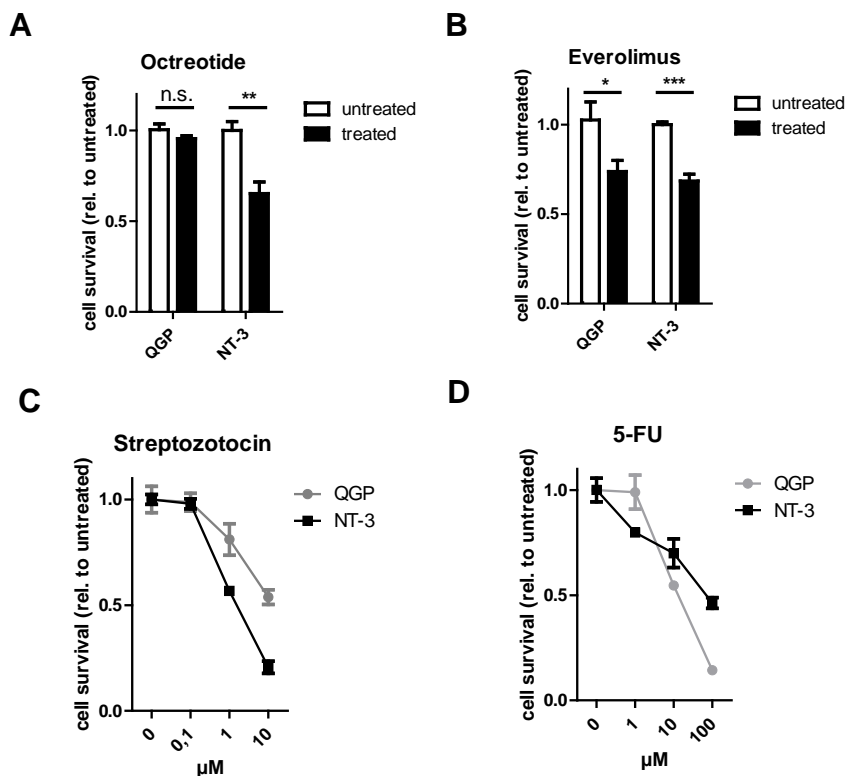


Abbildung 5: Therapieansprechen von NT-3 im Vergleich zu QGP-1. Die Wirksamkeit verschiedener Therapien wurde nach fünf Behandlungstagen mittels MTT-Assay erfasst. 100nmol/L Octreotid (A) zeigte eine gute Wirksamkeit bei NT-3. 50nmol/L Everolimus (B) zeigte eine ähnlich gute Wirksamkeit bei beiden Zelllinien. Die Zugabe der genotoxischen Chemotherapeutika STZ (C) und 5-FU (D) zeigte einen stärkeren Effekt von STZ bei NT-3 als bei QGP-1 in allen getesteten Dosierungen und ähnliches Therapieansprechen für 5-FU bei beiden Zelllinien.

3.6 Xenograft-Tiermodell

Auf der Basis vorausgegangener Erfahrungen mit BON- und QGP-1-Xenografts [20], wurden NOD/SCID Mäusen jeweils 2×10^6 NT-3-Tumorzellen in die Flanken transplantiert. Damit erreichten wir eine Tumorentstehung in 94% der Tiere. Aufgrund des langsamen NT-3-Tumorwachstums *in vivo*, waren entstandene Knoten erst ca. sechs Wochen nach Zelltransplantation tastbar. Wegen des geringen Tumolvolumens während der ersten zwölf Wochen, wurden Serien-MRTs zum Monitoring des Tumorwachstums herangezogen (Abb. 6A). Die Xenograft-Tumoren waren menschlichen NETs MRT-morphologisch ähnlich und zeigten ein starkes Enhancement in den T2-gewichteten Sequenzen (Abb. 6A). Die mediane Tumorwachstumsrate betrug $+139\% \pm 13\%$ alle vier Wochen (Abb. 6B). Dieser Proliferationsindex korrespondiert mit dem des Ursprungstumors (Ki-67-Index: 15-20%). Die mRNA-Expressionsprofile für neuroendokrine Marker in den subkutanen Tumoren entsprachen den Expressionsprofilen von NT-3-Zellen *in vitro*. Im Gegensatz zu früheren Xenograft-Versuchen mit BON und QGP-1, waren bei den NT-3-Xenografttumoren makroskopisch keine nekrotischen Areale vorzufinden, wohl aber eine ausgeprägte Vaskularisation (Abb. 6D). Zudem konnte eine hohe mRNA-Expression von humanem CgA, Synaptophysin und den Somatostatinrezeptoren SSTR1, 2, 3 und 5 nachgewiesen werden. Darüber hinaus erlangten wir aus Serumanalysen tumortragender Mäuse den Nachweis menschlichen Insulins 16 Wochen post-Transplantation (Median 118 mU/L, Variationsbreite 6-412 mU/L). Die Immunhistochemie belegte die Insulinexpression der Xenograft-Tumorzellen (Abb. 6E). Diese Ergebnisse bestätigten den funktionellen, gut differenzierten Phänotyp des Xenografttumors.

Die Histologie des am Ende des Tierversuches präparierten Xenografttumors spiegelte das inselartige und stromareiche Wachstumsmuster des Patiententumors wider (Abb. 6F). Positive CgA- und Synaptophysin-Färbungen bestätigten den neuroendokrinen Typus des Xenografts. Zudem konnte in der Immunhistochemie sowohl im Ursprungstumor, als auch im NT-3-Xenograft, die Expression der humanen Zytokeratine CK12 und CK19 nachgewiesen werden (Supp. Abb. S5). Wenngleich nicht im Fokus dieser Studie stehend, haben erste Versuche zur intraportalen Injektion von NT-3-Zellen die Entwicklung kleiner Lebertumoren in einer von drei Mäusen bewirkt. Auch diese waren stromareich und positiv in der CgA-Färbung, was darauf hindeutet, dass unsere neue Zelllinie auch für Versuche zu orthotopen NET-Lebermetastasen geeignet ist (Supp. Abb. S6).

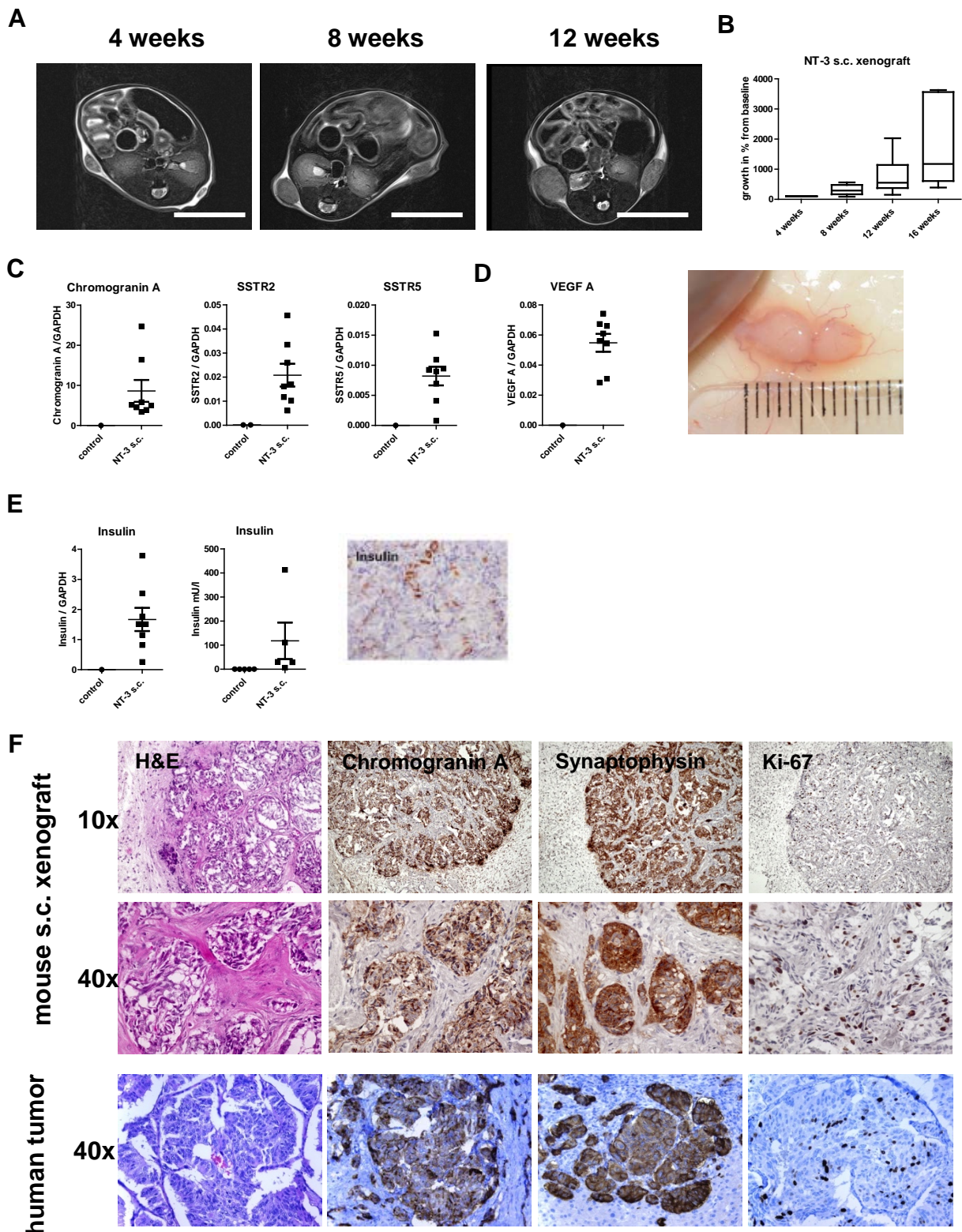


Abbildung 6: Xenograft-Tumormodell. Detektion von subkutanen Tumoren in NT-3-transplantierten NOD/SCID-Mäusen im MRT (A). Berechnung von Wachstumskurven anhand von Serienbildung der Tumore über 16 Wochen (B). Die Expressionsprofile der Tumor-Xenografts glichen dem gut differenzierten Phänotyp der NT-3-Zellen *in vitro* (C). Als negativ-Kontrolle diente gesundes Mäuselebergewebe. Starke Vaskularisierung und entsprechend hohe Expression von humanem VEGF A in Xenograft-Tumoren (D). Analysen des Insulingehalts im Mäuseserum 16 Wochen post-Tumorzelltransplantation bestätigten einen funktionell aktiven Phänotyp der NT-3-Zellen *in vivo*. Dementsprechend zeigte die € die Insulinexpression im Xenograft €. Die Histologie des Xenograft-Tumors bestätigte dessen neuroendokrine Identität und zeigte eine dem humanen Primärtumor ähnliche Morphologie und Proliferationsrate (F).

4 Diskussion:

4.1 Grundlagen und Hindernisse der aktuellen Forschung

Präklinische Modelle zur *in vitro*- und *in vivo*-Evaluation künftiger Therapeutika bilden nach wie vor das Hauptstandbein für die erfolgreiche Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten zur Verbesserung der Versorgung von Krebspatienten [21, 22]. Das National Cancer Institute in den USA (NCI) empfiehlt die Verwendung patientenbasierter Xenografts, sowie gut charakterisierter, neuer Primärzellkulturen – unsere neue Zelllinie NT-3 und das daraus hervorgehende Xenograftmodell entsprechen diesem Profil.

Bisher kam die Forschung an neuroendokrinen Tumoren nur hinkend voran, da es an geeigneten präklinischen Modellen zur Untersuchung potentieller neuer Zielstrukturen mangelte.

4.2 Tiermodelle

Die verfügbaren genetischen NET-Modelle verfehlen das Ziel durch entweder rasantem und zügig letalem Krankheitsverlauf (Rip1-Tag2-Mäuse, [23]), oder durch einen hochbenignen Verlauf ohne Entwicklung eines disseminierten Tumorleidens (MEN1 Knockout-Mäuse, [24]). Ebenso verhält es sich mit Xenograftmodellen der QGP-1- und BON-Zellen, welche durch ihr extrem rapides Tumorwachstum innerhalb weniger Wochen immense Geschwülste mit großen nekrotischen Arealen in den Mäusen verursachen [20, 25]. Somit besteht immer noch der dringende Bedarf eines geeigneten und klinisch relevanten *in vivo* Tumormodells. Die hier beschriebene neue Zelllinie NT-3 weist eine starke Ähnlichkeit zum Ursprungstumor des Patienten auf: Sie verfügt über einen gut differenzierten Phänotyp, ist funktionell aktiv, hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine langsame Wachstumsrate und vereint somit alle Schlüssel-Eigenschaften eines neuroendokrinen Tumors. Demnach stellt die Zelllinie NT-3 ein bis dato nicht verfügbar gewesenes, wegweisendes präklinisches neuroendokrines Tumormodell dar.

4.3 Zelllinien

Von den wenigen vorhandenen NET Zelllinien, sind jene, die aus intestinalen NETs hervorgegangen sind (KRJ-1, GOT1, P-ST5), nur eingeschränkt verfügbar, sodass eine ausführliche Charakterisierung und Validation als relevantes NET-Modell noch ausstehen.

Zusätzlich wurde die neuroendokrine Identität der KRJ-1 Zellen kürzlich in Frage gestellt [26].

Der Gebrauch der zwei etablierten pankreatischen neuroendokrinen Zelllinien QGP-1 und BON ist zwar weitverbreitet, allerdings stellt ihr dokumentiertes schnelles Wachstum ihre Eignung als NET-Modelle in Frage. Die bei unserer detaillierten Charakterisierung von BON und QGP-1 ermittelte niedrige Expression neuroendokriner Marker verstärkt die Zweifel. Angesichts der langjährigen Verwendung beider Zelllinien seit mehr als 25 Jahren ist es sehr wahrscheinlich, dass die Malignität der Zellen in Kultur zugenommen hat. Wurde damals eine Verdopplungszeit von 60 Stunden (BON) bzw. 84 Stunden (QGP-1) beschrieben, so konnten wir nun Verdopplungszeiten von 36 und 38 Stunden für BON- und QGP-1-Zellen feststellen. Aber selbst die Proliferationsraten der frühen Passagen übersteigen bei weitem die Wachstumsgeschwindigkeit der NT-3-Zellen, die sich unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren erst nach 240 Stunden verdoppeln. Es sei dahingestellt, ob potentiell wirksame neue Therapeutika für NET-Patienten,

aufgrund von Versagen in Versuchen mit BON und QGP, abgelehnt oder in der Entwicklung vorzeitig eingestellt worden sind.

4.4 Mutationen

Weitere Bedenken kamen nach jüngsten Entdeckungen von Mutationen in RAS- und TP53-Genen in BON und QGP-1 auf, da solche Mutationen bei gut differenzierten NETs kaum vorkommen [27-29]. Die NT-3-Zelllinie weist diese Mutationen nicht auf. Auf der Suche nach Mutationen in den NT-3-Zellen, fanden wir eine missense-Mutation im MEN1-Gen, welche bei sporadischen Insulinomen, Nebenschilddrüsenadenomen und Hämangioblastomen beschrieben wurde [30]. Die gezielte Analyse der klassischen pNET-assoziierten Gene VHL, MEN1, TSC1, TSC2, DAXX und ATRX gab keine weiteren Mutationen zu erkennen. Das Fehlen dieser Mutationen in NT-3 birgt eine große Chance für zukünftige knockout-Analysen zur Bestimmung der Rollen jedes einzelnen der genannten Gene in Bezug auf Tumorprogression und Therapieansprechen von pNETs.

4.5 Kulturbedingungen

Ein bislang ungelöstes Rätsel bei der Etablierung neuer NET-Primärkulturen ist das der optimalen Wachstumsbedingungen für die in Kultur befindlichen Zellen. In unseren Versuchen gelang es uns, die Supplementierung der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 als Schlüsselement für die Proliferation der Zellkulturen zu identifizieren. Da die Expression dieser Wachstumsfaktoren in NET-Zellen generell niedrig ist, kann davon ausgegangen werden, dass sie von der Mikroumgebung des Tumors (tumor microenvironment, TME) freigesetzt werden [31, 32, 33]. Unser NT-3-Xenograftmodell bekräftigt diese Hypothese, da die Proliferationsrate der Stromaumgebenen NT-3-Zellen *in vivo* der Proliferationsrate der *in vitro* unter Wachstumsfaktorsupplementierung wachsenden NT-3-Zellen glich.

Das Verstehen der komplexen Interaktionen, die zwischen den Tumorzellen und den zellulären Komponenten ihrer Mikroumgebung stattfinden, und der an ihrer Wechselwirkung beteiligten molekularen Mediatoren, spielt eine bedeutende Rolle in der Findung neuer therapeutischer Zielstrukturen.

Das TME setzt sich zusammen aus der extrazellulären Matrix, Stromazellen, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen. All diese Komponenten wirken sich auf das Tumorwachstum, das Tumorverhalten und das Therapieansprechen aus, denn sie beeinflussen epigenetische Regulationsmechanismen, die Invasions- und Metastasefähigkeit, sowie die Induktion lokaler und systemischer Immunsuppression. Vergleichende Proteom-Analysen gesunder pankreatischer Inselzellen und Rip1-Tag2-Insulinomzellen zeigten eine veränderte Expression von 35 Proteinen der Extrazellulärmatrix, u.a. die Hochregulation von Fibrinogenen und Kininogenen, welche assoziiert sind mit Mikrovaskularisierung und Angiogenesestimulation [34].

Im Rip1-Tag2-Modell konnte zudem eine Heparanase-Überexpression nachgewiesen werden. Heparanasen sind endo- β -Glucuronidasen, welche Glykoproteinketten der Extrazellulärmatrix aufspalten, was in einer Auflockerung der Matrix und der Freisetzung proangiogenetischer Faktoren und Wachstumsfaktoren resultiert [35].

Zahlreiche Studien konnten zudem die Überexpression von MMP2 in GEP-NETs belegen [36, 37], und auch Serum- sowie Urinuntersuchungen von NET-Patienten legten eine Erhöhung der Messwerte dieses Enzyms dar [38, 39]. In einem pNET-Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass MMP9 eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese spielt.

In der Forschung zeigten sich Indizien dafür, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten das NET-Wachstum *in vitro* und *in vivo* stimulieren [40, 41], wobei niedrig differenzierte Neoplasien in ihrem Wachstum weniger abhängig von der Unterstützung durch die Stromazellen sind. Ein Vergleich zwischen den Sekretomen von NET-assoziierten Fibroblasten und normalen menschlichen Fibroblasten zeigte, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten aktiv IL-6, VEGF und Monocyten-Chemolockstoff Protein 1 (MCP-1) sezernieren, weshalb diesen Cytokine möglicherweise eine wichtige Rolle in der Induktion der NET-Proliferation zugeschrieben werden kann [42].

Im Gegensatz zu anderen epithelialen Neoplasien, ist die intratumorale mikrovaskuläre Dichte von pNETs höher bei low-grade als bei high-grade-Tumoren. Als Erklärung für dieses „neuroendokrine Paradoxon“ gibt es eine Hypothese, die besagt, dass gut differenzierte NET-Zellen die Fähigkeit zur Ausbildung vaskulärer Netzwerke ihrer Vorläuferzellen beibehalten haben, wohingegen die Angiogenese schlecht differenzierter NETs, aufgrund der Hypoxie unter rapider Zellproliferation, durch einen angiogenetischen Switch angetrieben wird [43].

Da wir, entsprechend der Empfehlung des NCI, Tumor-assoziierte Fibroblasten des Ursprungstumors konservierten, bietet sich die Möglichkeit, die Interaktion zwischen NET-Zellen und ihrer Mikroumgebung in weiteren Studien tiefergehend zu untersuchen.

4.6 Betazell-Modelle

Die nachgewiesene Insulinexpression und –sekretion der NT-3-Zellen macht sie zu einem potenziellen Modell für humane pankreatische Betazellen. Bisher wurde die Diabetesforschung, mangels eines humanen Modells, an einer Ratteninsulinom-Zelllinie durchgeführt (INS1E). Dies ist jedoch aufgrund von elementaren Unterschieden zwischen Mensch und Nagetier, wie z.B. in der Proteinexpression, problembehaftet [44,45]. Die einzige humane Zelllinie CM, die aus einem Insulinom hervorging, hat ihre Fähigkeit zur Insulinexpression und –sekretion während der *in vitro*-Kultivierung verloren [46]. Kürzlich wurde eine genetisch veränderte humane Betazelllinie vorgestellt, bei der allerdings die Verfügbarkeit, die Handhabung und ein stabiler Phänotyp für die Eignung zu Forschungszwecken noch nachzuweisen sind [47,48].

4.7 Therapeutika

Zurzeit erfolgt die Behandlung gut differenzierter pankreatischer NETs mit Somatostatinanaloga oder mit STZ/5-FU. Diese Substanzen bewirkten auch bei den NT-3-Zellen eine Wachstumshemmung *in vitro*. Für STZ konnte eine erhöhte Empfänglichkeit bei Tumoren mit hohem neuroendokrinen Differenzierungsgrad nachgewiesen werden, da es sich bei der Bekämpfung SSTR-positiver NETs besonders wirksam zeigte [49]. 5-FU, ein allgemein zytotoxisches Chemotherapeutikum, ist auch gegen entdifferenzierte Tumoren wirksam, sodass es auch auf QGP-1 hemmend wirkte. Everolimus, ein Inhibitor des mTOR-Signalwegs, welcher sowohl bei Tumoren mit hoher, als auch mit niedriger Expression neuroendokriner Marker aktiviert ist, zeigte sich dementsprechend bei NT-3 und QGP-1 ähnlich wirksam [50].

Zwei der effektivsten Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit NET – Somatostatinanaloga und Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie – sind abhängig von der Expression von SSTRs, insbesondere SSTR2 und 5, auf der Tumorzelloberfläche [51]. Bisher behinderte der Mangel an geeigneten präklinischen

Modellen eine Weiterentwicklung des SSTR-Targeting, doch unser neues NT-3-basierte Tiermodell hat das Potenzial, diese Lücke zu schließen, da eine hohe Expression von SSTRs *in vitro*, sowie in den Xenografttumoren dargelegt werden konnte.

4.8 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass wir erfolgreich eine gut differenzierte und langsam proliferierende pankreatische NET-Zelllinie etablieren konnten. Die NT-3-Zellen und das entsprechende Xenograft-Tiermodell können einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung und Testung neuer Therapien für diese schwierig zu behandelnde Erkrankung leisten.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Grozinsky-Glasberg et al. : The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2012;96(3):173-87.
- [2] Krieg et al. New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One* 2014; 9:e88713.
- [3] Choe et al.: What Is New in the 2017 World Health Organization Classification and 8th American Joint Committee on Cancer Staging System for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms?. *Korean journal of radiology* 2019;20(1): 5–17.
- [4] Modlin et al.: Current Status of Gastrointestinal Carcinoids. *Gastroenterology* 2014;128(6), 1717-1751
- [5] Okabayashi et al.: Diagnosis and management of insulinoma. *World journal of gastroenterology* (2013;19(6):829-37
- [6] Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V. (DGVS): S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. AWMF-Reg. 021-27
- [7] Gabriel: Radiopeptidtherapie – der „Mustang“ in der Therapie von neuroendokrinen Tumoren des gastroentero-pankreatischen Systems? *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel* 2018;11(3):81-85
- [8] Francois et al.: Targeting focal adhesion kinase and resistance to mTOR inhibition in pancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 2015;107(8):djv123
- [9] Jiang et al.: Targeting β -catenin signaling for therapeutic intervention in MEN1-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature Communications* 2014; (5):5809.
- [10] Flynn et al.: Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science* 2015;347(6219):273-7
- [11] Brown et al.: Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome research* 2014;24(5): 743-50
- [12] Kreiter et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015;520(7549):692-6
- [13] Maggi et al.: Novel targets in the treatment of neuroendocrine tumors: RBP2. *International Journal of Endocrine Oncology* 2017;4(1): 31–41
- [14] Carter et al.: Signaling pathways as specific pharmacologic targets for neuroendocrine tumor therapy: RET, PI3K, MEK, growth factors, and Notch. *Neuroendocrinology* 2013;97(1): 57-66
- [15] Sun et al.: Valproic acid induces NET cell growth arrest and enhances tumor suppression of the receptor-targeted peptide-drug conjugate via activating somatostatin receptor type II. *Journal of drug targeting* 2016;24(2):169-77
- [16] Babu et al.: Animal models and cell lines of pancreatic neuro- endocrine tumors. *Pancreas* 2013;42:912–23.
- [17] Taelman et al.: Up-regulation of key molecules for targeted imaging and therapy. *The Journal of Nuclear Medicine* 2016;57:1805–1810.
- [18] Leu et al.: The effect of transforming growth factor beta on human neuroendocrine tumor BON cell proliferation and differentiation is mediated through somatostatin signaling. *Molecular Cancer Research*

- 2008;6:1029–42.
- [19] Lundqvist et al.: In vitro culture of neuroendocrine tumors of the pancreas and gut. *Acta Oncologica* 1989;28:335–9
- [20] Fraedrich et al.: Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model. *Clinical Cancer Research* 2012;18: 4621–32.
- [21] Barretina et al.: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603–7.
- [22] Day et al.: Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell* 2015;163:39–53
- [23] Fendrich et al.: Enalapril and ASS inhibit tumor growth in a transgenic mouse model of islet cell tumors. *Endocrine-Related Cancer* 2014;21: 813–24.
- [24] Jiang et al.: Targeting b-catenin signaling for therapeutic intervention in MEN1-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature Communications* 2014;5:5809.
- [25] Evers et al.: Novel therapy for the treatment of human carcinoid. *Annals of Surgery* 1991;213:411–6.
- [26] Hofving, Tobias et al. “The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines.” *Endocrine-related cancer* 2018;25(3): 367-380.
- [27] Boora et al.: Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines. *Cancer Genetics* 2015;208:374–81.
- [28] Vandamme et al.: Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *Journal of Molecular Endocrinology* 2015;54:137–47.
- [29] Jiao et al.: DAXX/ ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011;331:1199–203.
- [30] Jyotsna et al.: Novel MEN 1 gene findings in rare sporadic insulinoma—a case control study. *BMC Endocrine Disorders* 2015; 15:44.
- [31] Townsend et al.: Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncologica* 1993;32:125–30.
- [32] Chaudhry et al.: Expression of growth factor peptides and their receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Acta Oncologica* 1993;32:107–14.
- [33] Briest et al.: PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics* 2014;4:336–65.
- [34] Naba et al.: Quantitative proteomic profiling of the extracellular matrix of pancreatic islets during the angiogenic switch and insulinoma progression. *Scientific Reports* 2017;7(1):40495.
- [35] Bonnans et al.: Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014;15(12):786–801.
- [36] Volland et al.: Correlation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase expression in ileal carcinoids, lymph nodes and liver metastasis with prognosis and survival. *Neuroendocrinology*. 2009;89(1):66–78.
- [37] Er et al.: Expression of IMP3 as a marker for predicting poor outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Oncology Letters*

- 2017;13(4):2391–6.
- [38] Blicharz-Dorniak et al.: Is determination of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors serum concentrations useful in patients with gastroenteropancreatic and bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms? *Endokrynologia Polska* 2012;63(6):470–6.
- [39] Roy et al.: Urinary TIMP-1 and MMP-2 levels detect the presence of pancreatic malignancies. *British Journal of Cancer* 2014;111(9):1772–9.
- [40] Dumortier et al.: Site-specific epithelial-mesenchymal interactions in digestive neuroendocrine tumors. An experimental in vivo and in vitro study. *The American Journal of Pathology* 2000;156(2):671–83.
- [41] Cives et al.: Cancer-associated-fibroblasts in neuroendocrine neoplasms: a role in cancer progression. *Neuroendocrinology* 2014;99:231.
- [42] Bowden et al.: Understanding the role of the carcinoid associated fibroblast in neuroendocrine tumors microenvironment. *Cancer Research* 2014;74(19):168.
- [43] Scoazec et al.: Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications. *Neuroendocrinology*. 2013;97(1):45–56.
- [44] MacDonald et al.: Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose- stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286: 18383–96.
- [45] Martens: Species-related differences in the proteome of rat and human pancreatic beta cells. *Journal of Diabetes Research* 2015;2015:549818.
- [46] Gragnoli: The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies. *Journal of Cell Physiology* 2008;216:569–70.
- [47] Scharfmann et al.: Development of a conditionally immortalized human pancreatic b cell line. *Journal of Clinical Investigation* 2014;124:2087–98.
- [48] Benazra et al.: A human beta cell line with drug inducible excision of immortalizing transgenes. *Molecular Metabolism* 2015;4:916–25.
- [49] Krug et al.: Streptozocin-based chemotherapy in patients with advanced neuroendo- crine neoplasms—predictive and prognostic markers for treatment □tratify- cation. *PloS One* 2015;10:e0143822.
- [50] Shida et al.: Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:889–93.
- [51] Oberg et al.: Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 2010;139:742–53.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die neu etablierte pankreatische NET-Zelllinie NT-3 zu charakterisieren und ihr Verhalten im direkten Vergleich zu bestehenden Zelllinien (QGP-1 und BON), unter Behandlung mit Therapeutika und im Xenograft-Tiermodell zu untersuchen. Dies geschah mit der Fragestellung, ob es sich um ein repräsentatives, gut differenziertes neuroendokrines Tumormodell handelt, als Grundlage für eine zielgerichtete und aussagekräftige Forschung an dieser Tumorentität.

Bisher war die präklinische Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten durch das Fehlen eines Modells, das diese Kriterien erfüllt, eingeschränkt.

Die neuroendokrine Identität von NT-3 wurde durch den Nachweis der Expression multipler NET-spezifischer Marker bestätigt. NT-3 exprimierte diese in erheblich höherem Maße als BON und QGP-1.

Als Zeichen der funktionellen Aktivität konnten wir bei NT-3 die Expression und Sekretion von Insulin nachweisen, entsprechend dem klinischen Insulinom beim Patienten, aus dessen Lymphknotenmetastase unsere neue Zelllinie hervorgegangen ist.

Der gut differenzierte Phänotyp der NT-3-Zellen ist über nunmehr 58 Passagen stabil geblieben. Der Ki-67-Index, als Maß für die Proliferationsrate von Zellen, wurde bei $14,6\% \pm 1,0\%$ in den NT-3-Zellen gemessen. Dies harmoniert mit dem Wert des Ursprungstumors (15-20%) und ist deutlich niedriger als die Werte von BON ($80,6\% \pm 3,3\%$) und QGP-1 ($82,6\% \pm 1,0\%$).

Zudem zeigte NT-3 eine hohe Expression von Somatostatinrezeptoren (SSTR1, 2, 3, und 5), welche die Zielstrukturen einiger bewährter Therapeutika in der Behandlung von NETs bilden.

Das Verhalten von NT-3 *in vivo* wurde anhand eines Xenograft-Mausmodells untersucht. Nach subkutaner Transplantation von NT-3-Zellen entstanden in 94% der Fälle Tumore mit einer Wachstumsrate von $139\% \pm 13\%$ innerhalb von vier Wochen. Die Morphologie und die Expression neuroendokriner Marker des Xenografttumors entsprachen dem humanen Ursprungstumor.

NT-3 qualifiziert sich durch diese herausragenden Eigenschaften als relevantes NET-Modell für die weitere Erforschung der neuroendokrinen Tumorbilogie und für die Entwicklung neuer Therapien.

6.1 Summary

The aim of this project was to characterize the newly established pancreatic NET cell line NT-3 and to study its behavior in direct comparison to the existing cell lines (QGP-1 and BON), upon treatment with therapeutics and as a xenograft animal model. This is to evaluate if NT-3 provides a representative, well-differentiated neuroendocrine tumor model for targeted and significant research on this tumor entity.

Research on new therapies for pancreatic neuroendocrine tumors (pNET) has been hampered by the absence of a clinically relevant tumor model system.

The neuroendocrine identity of NT-3 was verified by the expression of multiple NET-specific markers, which were highly expressed in NT-3 compared with BON and QGP-1.

As a sign of functional activity, we were able to detect the expression and secretion of insulin in NT-3, corresponding to the clinical insulinoma of the patient providing the tumor that NT-3 was derived from.

Until now, this well-differentiated phenotype is stable since 58 passages.

The proliferative labeling index Ki-67 of $14.6\% \pm 1.0\%$ in NT-3 is akin to the original tumor (15%–20%) and was lower than in BON ($80.6\% \pm 3.3\%$) and QGP-1 ($82.6\% \pm 1.0\%$). Moreover, NT-3 showed high expression of somatostatin receptors (SSTRs: 1, 2, 3, and 5), which are targets of therapeutics successfully used in the treatment of pancreatic NETs. *In vivo* growth was assessed in a xenograft mouse model. Upon subcutaneous transplantation of NT-3 cells, recipient mice developed tumors with an efficient tumor take rate (94%) and growth rate ($139\% \pm 13\%$) by 4 weeks. Morphology and neuroendocrine marker expression of xenograft tumors resembled the original human tumor. These outstanding characteristics qualify NT-3 as a relevant model to study neuroendocrine tumor biology and to develop new NET treatments.

7 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

8 Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Der Eigenanteil der Publikation umfasst die hier benannten Arbeiten zur Charakterisierung der neuen Zelllinie NT-3, sowie der bereits etablierten Zelllinien BON und QGP-1. Dies beinhaltet die Zellkultur mit und ohne Wachstumsfaktorsupplementierung und unter hypoxischen Bedingungen. Ich führte die Zellzählungsversuche und den Soft-Agar-Assay aus.

Ferner wurden von mir durchgeführt die RNA-Isolation aus den Zellkulturen und die Transkription in cDNA, sowie die damit erfolgten Expressionsbestimmungen mittels quantitativer real-time PCR. Außerdem wurden von mir die immunhistochemischen Versuche und die dazugehörige fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Chromogranin-A Expression und der Ki-67 Aktivität durchgeführt. Zudem führte ich die Western-Blot Analysen zur Bestimmung der Expression der SSTR-Subtypen und von CAIX bei hypoxischer Inkubation durch.

Darüber hinaus führte ich die MTT-Assays zur Analyse des Therapieansprechens verschiedener medikamentöser Therapien aus.

Die nicht von mir erarbeiteten Anteile der Publikation umfassen die Mutationsanalysen, die Insulinmessungen und die VEGF-Konzentrationsmessungen mittels ELISA, sowie die weiterführenden Versuche zum Xenograft-Tiermodell.

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Schrader für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit im Labor für experimentelle Gastroenterologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchführen zu können. Ich bin zudem sehr dankbar seine intensive wissenschaftliche und methodische Betreuung während meiner Arbeit. Martina Fahl und Corinna Eggers danke ich für die praktische Unterstützung und Einarbeitung in die Laborarbeiten. Vielen Dank für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: