

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Lehrstuhl Endokrinologie/Diabetologie: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

**Targeted Metabolomics mit Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie zur Untersuchung von Stoffwechseleränderungen bei Phäochromozytomen und Paragangliomen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Juliane Elisabeth März

aus Würzburg

**Würzburg, Februar 2022**

**Referent:** Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias Kroiss

**Korreferentin:** Prof. Dr. rer. nat. Svenja Meierjohann

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2022**

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Phäochromozytome und Paragangliome	6
1.1.1	Epidemiologie und Dignität	6
1.1.2	Genetik	7
1.1.3	Klinische Symptomatik	8
1.1.4	Diagnostik und Therapie	8
1.2	Metabolomics	11
1.2.1	Definition	12
1.2.2	Technische Aspekte	13
1.3	Aktuelle Studienlage: Metabolomische Veränderungen bei Patient*innen mit PPGL	15
1.4	Fragestellungen dieser Arbeit	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Auswahlkriterien des Patient*innenkollektivs	20
2.1.1	PPGL-Gruppe	21
2.1.2	Kontrollgruppe	22
2.2	Randbedingungen der Blutentnahme und Probenaufbewahrung	22
2.3	Messung der Metanephrine im Plasma und der Katecholamine im Urin	23
2.4	Messung des Metabolitenprofils: Targeted Metabolomics	23
2.4.1	AbsoluteIDQ®-p180 Kit	23
2.4.2	Messanordnung der Proben	25
2.4.3	Probenvorbereitung und Probenmessung	25
2.4.4	Material	26
2.3	Statistische Auswertung	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Patientenkollektiv	29

3.2	Metabolomische Veränderungen bei Patient*innen mit Phäochromozytom oder Paragangliom	32
3.3.1	Metabolitenprofil PPGL vs. Kontrollgruppe	32
3.3.2	Histidin, Threonin, LysoPC a C28:0 und die Summe der Hexosen als signifikant veränderte Metabolite bei Patient*innen mit PPGL	34
3.3.3	Korrelationen zwischen Plasma-Metanephrinen, Urin-Katecholaminen und Plasma-Metaboliten	35
3.4	Geschlechtsspezifische metabolomische Veränderungen und deren Korrelationen mit Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen	38
3.4.1	Frauen	38
3.4.2	Männer	40
3.5	Phänotypspezifische metabolomische Veränderungen	42
3.5.1	Kohortenkollektiv	42
3.5.2	Adrenerger Phänotyp	43
3.5.3	Noradrenerger Phänotyp	44
3.6	Hauptkomponentenanalysen	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	PPGL und Veränderungen der Glukosehomöostase	47
4.2	Verringerte Lysophosphatidycholinkonzentrationen als Hinweis auf ein tumoröses Geschehen	48
4.3	Vermindertes Threonin und Histidin als Hinweis auf Hypoxie-induzierte Tumorgenese	49
4.4	Korrelation mit Katecholaminen und Metanephrinen	50
4.5	Metabolitenprofil als Hinweis auf erhöhtes kardiovaskuläres Risiko	51
4.5.1	Hyperglykämie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen bei PPGL	51
4.5.2	Verminderte Lysophosphatidylcholin-Konzentration als Hinweis auf ein kardiovaskuläres Risikoprofil	52
4.5.3	Proinflammatorische Wirkung durch verminderte Histidin-Konzentration	53

4.6	Limitationen der Studie	53
4.7	Ausblick	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>
<b>Anhang</b>		
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>IV</b>	<b>Danksagung</b>	

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Phäochromozytome und Paragangliome

Phäochromozytome und Paragangliome (PPGL) sind Katecholamin-produzierende, neuroendokrine Tumore des chromaffinen Gewebes (1). Entsteht ein solcher Tumor aus Zellen des Nebennierenmarks, wird er als Phäochromozytom (PCC) bezeichnet. Mit einem Anteil von 80-85% stellen diese die größte Gruppe innerhalb der PPGL dar (2, 3). Ein Paragangliom (PGL) beschreibt hingegen eine extra-adrenale Tumormanifestation, die von den paravertebralen sympathischen Ganglien ausgeht. Histologisch sind Phäochromozytome und Paragangliome kaum voneinander unterscheidbar. Sie zeigen in Zellballen angeordnete Tumorzellen, die von sogenannten Sustentakularzellen und einem kapillären Netzwerk umgeben sind (4).

Tumore aus parasymphathischen Gewebe im Kopf- und Nackenbereich werden ebenfalls als Paragangliome bezeichnet, diese zeigen jedoch meist keine Hormonaktivität und werden in dieser Arbeit nicht betrachtet (3).

### 1.1.1 Epidemiologie und Dignität

Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene Tumore. Bei Patient\*innen mit Hypertonie wird die Prävalenz in der Literatur mit 0.2-0.6 % angegeben (5-7). Eine relativ hohe Prävalenz in Autopsie-Studien (0.05-0.1 %) legt jedoch nahe, dass die tatsächliche Krankheitshäufigkeit in der Gesamtpopulation höher ist und viele PPGL zu Lebzeiten unentdeckt bleiben (8-10).

Malignität ist bei PPGL definiert durch das Vorliegen von Metastasen in Geweben, in denen normalerweise keine chromaffinen Zellen vorkommen, wie beispielsweise Knochen und Lymphknoten. Die Malignitätsbestimmung am histopathologischen Präparat des Primärtumors ist nicht möglich. Betrachtet man die Dignität der Phäochromozytome und Paragangliome, ist mit 85-90 % die große Mehrheit der Tumore gutartig. Das Vorliegen spezifischer Risikofaktoren kann die Rate maligner Phäochromozytome und Paragangliome jedoch auf 30-40 % steigern. Hierzu zählen ein junges Manifestationsalter, eine Tumorgöße über 5 cm, Mutationen im Succinat-Dehydrogenase B (SDHB)-Gen, eine multifokale Lokalisation, extra-adrenale Tumore sowie ein dopaminerges Phänotyp (1, 11, 12).

### 1.1.2 Genetik

Insbesondere Fortschritte der molekulargenetischen Forschung legen eine Anpassung der traditionellen 10er Regel nahe. Diese besagt, dass 10 % der Tumore bilateral und 10 % extra-adrenal lokalisiert sind, 10 % der PPGL maligne und 10 % hereditären Ursprungs sind (2, 13). So kann beispielsweise bei der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ II (MEN II) sowie bei dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) die Rate der bilateralen Tumore über 10 % liegen (14-16). Ferner ist besonders eine Keimbahnmutation in dem SDHB-Gen und anderen für die Untereinheiten der Succinatdehydrogenase codierenden Genen (SDHx) mit einem deutlich erhöhten Risiko für Malignität assoziiert (17-19).

Weiterhin weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass deutlich mehr Neoplasien als bisher angenommen Prädispositionssyndromen zuzuordnen sind. Die aktuelle Studienlage geht davon aus, dass bei 30-40 % der Patient\*innen mit PPGL eine Keimbahnmutation in einem der bekannten Suszeptibilitätsgenen nachweisbar ist. Bei den restlichen 60 % der Phäochromozytome und Paragangliome handelt es sich vermutlich um sporadische Fälle, von denen mindestens ein Drittel eine somatische Mutation aufweist (14, 15, 20).

Insgesamt sind Mutationen in mehr als 20 Genen bekannt, welche basierend auf der Aktivierung verschiedener Signalwege in drei Cluster unterteilt werden können. Cluster 1 umfasst Genmutationen, die eine zelluläre Hypoxie nachahmen. Hierzu zählen unter anderem Mutationen der Succinat-Dehydrogenase-Untereinheiten (SDHx), der Fumarat-Hydratase (FH), der Malat-Dehydrogenase 2 (MDH2) und der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1). Diese münden letztendlich in einer Aktivierung des (Pseudo-) Hypoxie-Signalweges und der Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ), wobei insbesondere die Isoformen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  bedeutsam sind. HIF- $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei der Regulierung der Zelladaptation an eine mangelnde Sauerstoffversorgung beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der Tumorgenese einnimmt. Es kommt zur Induktion von Zielgenen und Aktivierung von Signalwegen, die mit Angiogenese, Hämatopoese, Glykolyse und Zellproliferation assoziiert sind (20-22) .

Tumore des Clusters 2 zeigen Mutationen in Rearranged-during-Transfection (RET), Neurofibromin 1 (NF1), H-RAS- und K-RAS- Protoonkogenen, Transmembran-Protein 127 (TMEM127) und Myc-assoziiertes Faktor X (MAX). Diese führen zur Aktivierung verschiedener Kinase-Signalwege, welche Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und

Angiogenese regulieren. Weiterhin führt die Aktivierung dieser Signalwege zu einer Stabilisierung von HIF- $\alpha$ , welches die Verbindung zu Cluster 1 darstellt (11, 20, 21, 23). Cluster 3 umfasst das Cold shock domain-containing E1 (CSDE1) Gen sowie das Mastermind-like transcriptional coactivator 3 (MAML3) Fusionsgen. Diese nehmen Einfluss auf den Wnt-Signalweg und begünstigen somit Tumorpheriferation, Invasion und Metastasierung (24).

### **1.1.3 Klinische Symptomatik**

Die klinischen Manifestationen bei Patient\*innen mit Phäochromozytomen oder Paragangliomen sind meist durch die im Überschuss produzierten Katecholamine bedingt und können eine Vielzahl anderer Erkrankungen imitieren (2, 25). Aufgrund der starken Variabilität der Symptomatik wird das Phäochromozytom daher auch als „the great mimic“ bezeichnet (26, 27). Die klinischen Zeichen und Symptome bei Patient\*innen mit PPGL sind bekannt, trotzdem wird die Diagnosestellung häufig durch deren geringe Spezifität erschwert. Zu den Leitsymptomen zählt die Hypertonie, die sich als Dauerhypertonie oder als paroxysmaler Bluthochdruck manifestieren kann. Typischerweise kommt es zu anfallsartigen Episoden, die Minuten bis Stunden anhalten. Es gibt jedoch auch Patient\*innen mit PPGL, die keine erhöhten Blutdruckwerte aufweisen (28-30). Weiterhin gehören zu den häufigsten Symptomen Kopfschmerz, Tachykardie und Palpitationen, Schwitzen sowie Blässe. Seltener können Übelkeit, Fieber, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Hitzewallungen oder Angstzustände auftreten (2, 28, 30). Es ist jedoch auch eine klinische Präsentation mit nur leichten oder keinen Symptomen möglich (31).

Eine große Gefahr sind akute, durch schlagartige Freisetzung von Katecholaminen ausgelöste Krisen. Diese können Kardiomyopathien, ein Lungenödem, eine Enzephalopathie sowie weitere Organschäden und Dysfunktionen zur Folge haben und stellen einen endokrinologischen Notfall dar (32-36). Solche Krisen können idiopathisch entstehen oder durch vielfältige Faktoren wie mechanische Manipulation, beispielsweise im Rahmen einer Operation, Medikamenteneinnahme oder emotionalen Stress ausgelöst werden und bis zum Tod der Patient\*innen führen (37, 38).

### **1.1.4 Diagnostik und Therapie**

Aufgrund der variablen und unspezifischen Symptomatik ist die Diagnosestellung eines PPGL auch heute noch eine Herausforderung im klinischen Alltag. Bei Verdacht auf ein

PPGL (Tabelle 1) sollte zuerst der biochemische Nachweis des Katecholaminexzesses angestrebt werden (39). Dieser erfolgt bevorzugt durch die Bestimmung der Katecholaminabbauprodukte Metanephrin (MN) und Normetanephrin (NMN) im Plasma oder im 24-Stunden-Sammelurin, wobei aktuelle Erkenntnisse eine bessere diagnostische Leistung der Testung im Plasma andeuten (40). Beide Testmöglichkeiten sind jedoch der direkten Messung der Katecholamine Adrenalin (EPI) und Noradrenalin (NE) sowie der Quantifizierung der Vanillinmandelsäure überlegen. Dieser Vorteil ist durch die kontinuierliche Freisetzung der Metanephrine bedingt, welche der pulsatilen Ausschüttung der Katecholamine gegenübersteht. Weiterhin bleiben Normetanephrin und Metanephrin durch die Erregung des sympatho-adrenalen Systems weitgehend unbeeinflusst (41-43). Bei einem negativen Testergebnis lässt sich ein PPGL somit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen (44).

**Tabelle 1: Indikationen für biochemische Testung auf Phäochromozytome/ Paragangliome (PPGL)**

nach (11)

---

Anzeichen oder Symptome eines Katecholaminexzesses, insbesondere bei anfallsartigem Auftreten
Unerwartete Blutdruckreaktion auf Medikamente, Operationen oder Narkose
Unerklärte Blutdruckvariabilität
Inzidentalom, auch bei normotensiven Patient*innen
Behandlungsresistente Hypertonie
Vorherige Behandlung eines PPGL
Hereditäres Risiko für PPGL
Merkmale eines PPGL assoziierten hereditären Syndrom

---

Trotz der hohen diagnostischen Sicherheit durch biochemische Testung wird die Diagnose eines PPGL aufgrund fehlender Berücksichtigung der Erkrankung in der Differentialdiagnose mit einem durchschnittlichen Verzug von drei Jahren gestellt (11). Um schwere Verläufe und Komplikationen zu verhindern, ist jedoch eine frühzeitige Diagnostik unabdingbar.

Da die Metanephrin- und insbesondere die Normetanephrinkonzentration durch externe Faktoren beeinflusst werden können, stellen falsch-positive Ergebnisse eine diagnostische Herausforderung dar. So können Koffein, Nikotin, körperliche Anstrengung sowie bestimmte Medikamente, insbesondere Phenoxybenzamin, trizyklische Antidepressiva

und  $\beta$ -Blocker die gemessenen Metanephrin- und Normetanephrinkonzentrationen verfälschen. Auch die Körperlage beeinflusst die biochemischen Laborparameter (45-47). Daher wird die Blutentnahme nach mindestens 20-minütiger liegender und ruhender Position empfohlen (39). Bei uneindeutigen Ergebnissen kann die Spezifität durch einen Suppressionstest mit Clonidin erhöht werden (46). Eine hohe Plasmakonzentration von Methoxytyramin (MTY), ein Abbauprodukt von Dopamin (DA), kann ein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für maligne und extra-adrenale Tumore sein (48).

Weiterhin ermöglicht das biochemische Profil Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Mutation bei hereditären PPGL-Syndromen. Mutationen des Clusters 1 sind mit einem noradrenergen Phänotyp verbunden. Tumore mit einer VHL-Mutation führen dabei meist zu einer isolierten Erhöhung der NMN-Werte. SDHx-Mutationen weisen meist eine zusätzlich gesteigerte Produktion von MTY auf. Mutationen des Clusters 2 sind dahingegen durch einen adrenergen Phänotyp charakterisiert (20, 49).

Bei biochemischem Nachweis eines PPGL sollte eine Bildgebung angeschlossen werden. Hierbei ist die Computertomografie (CT) das Mittel der Wahl (50-52). Eine Magnetresonanztomografie (MRT) wird bei metastasiertem PPGL, einer Lokalisation im Nacken oder an der Schädelbasis, postoperativen Clips, einer Kontrastmittelallergie und bei Patient\*innen, bei denen generell eine geringe Strahlenbelastung angezeigt ist, empfohlen (39, 53). In Kombination mit einer funktionellen Bildgebung kann neben der Lokalisation des Primärtumors der Ausschluss von Metastasen erfolgen. Ein  $^{18}\text{F}$ -FDA PET/CT ist für diesen Zweck aktuell das sensitivste Verfahren (54-56). Falls diese Methode nicht verfügbar ist, wird die  $^{123}\text{I}$ -MIBG Szintigraphie oder ein  $^{18}\text{F}$ -DOPA PET/(CT) empfohlen (39). Bei bekannter Metastasierung sollte die bildgebende Diagnostik in Abhängigkeit des genetischen Status gewählt werden (57).

Eine genetische Diagnostik sollte grundsätzlich bei allen Patient\*innen mit PPGL in Erwägung gezogen werden. Insbesondere ist sie bei Risikopatient\*innen mit positiver Familienanamnese, metastasierten PPGL, PPGL-assoziierten Syndromen oder bekannten Mutationen in PPGL-assoziierten Genen angezeigt. Es wurde aufgrund der Genotyp-Phänotyp-Beziehung vorgeschlagen, die Sequenz der untersuchten Gene an der Klinik, der Lokalisation und dem katecholaminergen Phänotyp zu orientieren (39). Mit der Verfügbarkeit von Panel-Next Generation Sequencing-Technologie rückt dies jedoch in den Hintergrund (58).

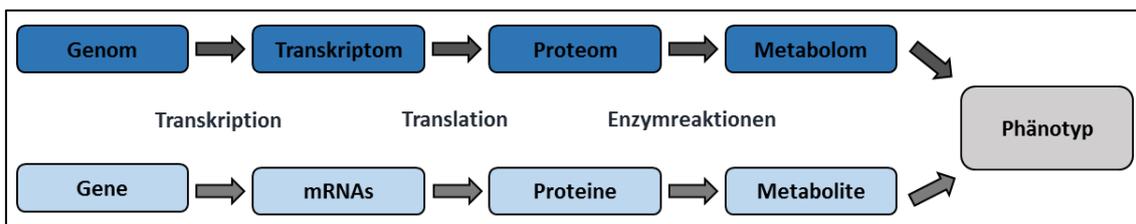
Bei der Therapie von PPGL steht die operative Resektion des Tumors im Vordergrund, wobei laparoskopische Verfahren bevorzugt werden (59-62). Da intraoperative Manipulationen zu einem lebensgefährlichen Katecholaminexzess führen können, ist die präoperative Blockade der adrenergen Rezeptoren ein zentraler Bestandteil des perioperativen Managements (2, 63, 64). Häufig genutzte Medikamente sind hierbei Phenoxybenzamin als nicht-selektiver  $\alpha$ -Rezeptorblocker sowie Doxazosin, ein selektiver  $\alpha_1$ -Rezeptorblocker (65, 66).

Postoperativ sollte ein engmaschiges Monitoring sowie ein Follow-Up mit Messung der Metanephrinwerten erfolgen. Ebenfalls wird eine lebenslängliche, jährliche biochemische Kontrolle empfohlen (39). Das Risiko eines Rezidivs nach einer erfolgreichen Operation liegt bei circa 5 % innerhalb von fünf Jahren. Der Großteil der Patient\*innen kann jedoch durch die operative Tumorentfernung langfristig geheilt werden (67).

## 1.2 Metabolomics

Ein Metabolit ist ein Zwischen- oder Endprodukt des Stoffwechsels und tritt als Substrat oder Produkt von Enzymen auf. Die Metabolite spiegeln die finale Reaktion eines biologischen Systems auf genetische und umweltbedingte Veränderungen wider (68). Im Gegensatz zu Proteinen und Genen werden Metabolite nicht durch epigenetische Regulationen und post-translationale Modifikationen beeinflusst und sind somit direkt mit der biochemischen Aktivität assoziiert (69).

Der Begriff Metabolom wird analog zu den Begriffen Genom, Transkriptom und Proteom verwendet (Abbildung 1) und beschreibt die Gesamtheit aller Metabolite einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus (70).



**Abbildung 1: Der Weg vom Genotyp zum Phänotyp**  
nach (71)

Die genaue Anzahl der Metabolite des menschlichen Stoffwechsels ist noch nicht bekannt. Die Erforschung des Metaboloms gewinnt jedoch zunehmend an Bedeutung und führt zu einem Anstieg der Anzahl beschriebener Metabolite. Die vierte Version (2018) der Human Metabolome Database umfasst 114 100 Metabolite. Dies entspricht einer Verdreifachung der Gesamtanzahl der bekannten Metabolite innerhalb von fünf Jahren (72).

### 1.2.1 Definition

Die Metabolomik (engl.: Metabolomics) beschreibt die Identifizierung und Quantifizierung des Metaboloms und somit die Analyse der Metaboliten eines Organismus (68). Dies ermöglicht es, den Einfluss genetischer Variationen, Therapien, der Ernährung oder Erkrankungen auf die Stoffwechsellage zu betrachten und die resultierenden Effekte dieser Einflüsse auf den Phänotyp darzustellen (73, 74).

Grundsätzlich lassen sich zwei Ansätze bei metabolomischen Untersuchungen unterscheiden: Untargeted Metabolomics und Targeted Metabolomics. Bei Untargeted Metabolomics wird die Gesamtheit der analytisch und methodisch erfassbaren Metabolite in einer Probe detektiert, mit dem Ziel, diese anschließend zu identifizieren und zumindest relativ zu quantifizieren. Die große Datenmenge, die hierbei generiert wird, sowie die Zuordnung detektierter, aber bisher unbekannter Analyte stellen Herausforderungen dieses Ansatzes dar. Methodisch ist der Ansatz „Untargeted Metabolomics“ in der Regel semiquantitativ ausgelegt. Targeted Metabolomics beschreibt hingegen die Messung und Quantifizierung vordefinierter Metabolite, die bereits chemisch charakterisiert und beschrieben sind. Hierdurch wird die Zuordnung der detektierten Metabolite und mögliche Rückschlüsse auf biochemische Stoffwechselforgänge erleichtert (75, 76). Zudem erleichtert die Begrenzung auf eine bestimmte Auswahl an Metaboliten die Entwicklung quantitativer Methoden. Besonders bei der Betrachtung von ausgesuchten Stoffwechselwegen bietet dieser Ansatz Vorteile gegenüber Untargeted Metabolomics (77).

Ein wichtiges Ziel der Metabolomik ist die Identifikation solcher Metabolite, die eine Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Personen ermöglichen (73). Da besonders Tumorerkrankungen zu tumorspezifischen Veränderungen im metabolischen Phänotyp des Organismus führen, erhofft man sich durch die Entwicklung von Metabolitenprofilen und Metabolitensignaturen („metabolic profiling“), gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Ansätzen, Fortschritte in der Diagnostik, der Therapie und der Kontrolle des Therapieerfolges (74).

## 1.2.2 Technische Aspekte

Die bedeutendsten Messmethoden für metabolomische Studien sind die Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance, NMR) und die Massenspektrometrie (MS). Beide ermöglichen die Identifikation und Quantifizierung von Metaboliten in einer Probe, wobei sie hierbei unterschiedliche Schwächen und Stärken aufweisen. Eine ganzheitliche Betrachtung des Metaboloms ist daher mit einer einzelnen Methode kaum möglich und erfordert die ergänzende Kombination mehrerer Verfahren (73, 78).

### NMR-Spektroskopie

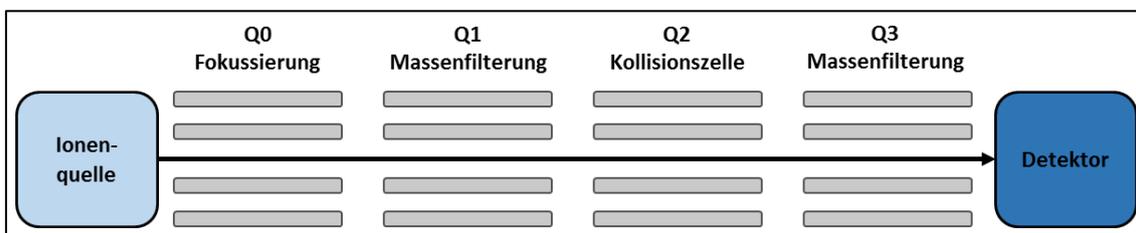
Die Kernspinresonanzspektroskopie nutzt das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz zur Analyse von Molekülzusammensetzungen und -strukturen. Sie basiert auf dem Verhalten des Kernspins innerhalb eines starken äußeren Magnetfeldes und den daraus resultierenden Energiedifferenzen (79). Wichtige Atomkerne für die Kernspinresonanzspektroskopie sind  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$ . Aufgrund der höheren Sensitivität und des häufigen Vorkommens von  $^1\text{H}$  in organischen Stoffen ist die  $^1\text{H}$ -NMR die meist genutzte Methode im Bereich Metabolomics (80). Die gute Reproduzierbarkeit, die minimalen Anforderungen an die Probenvorbereitung und die quantitativen Fähigkeiten sind Vorteile der NMR-Spektroskopie, die in metabolomischen Studien genutzt werden. Besonders die Fähigkeit der Analyse von metabolischen Vorgängen in lebenden Zellen und Gewebe ist ein Alleinstellungsmerkmal dieser Methode. Allerdings können die gemessenen Daten durch pH, Temperatur, Konzentrationen und Ladungszustände leicht beeinflusst werden. Des Weiteren ist die Sensitivität im Vergleich zu massenspektrometrischen Verfahren geringer (80, 81).

### Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen basieren auf der Bestimmung des Verhältnisses von Masse und Ladung ( $m/q$ ) geladener Teilchen anhand deren Verhalten in einem elektromagnetischen Feld. Zunächst werden die Moleküle der Probe ionisiert und mithilfe eines elektromagnetischen Felds beschleunigt. Anschließend werden sie nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt und letztendlich mithilfe eines Detektors registriert.

Um die Spezifität des Messsystems zu erhöhen, können zwei oder mehr Massenanalytoren gekoppelt werden. Ein solches System wird als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet. Durch eine zwischengeschaltete Kollisionszelle wird eine Fragmentierung der Analyten induziert. Das Masse-Ladungsverhältnis der Fragmente ist entsprechend charakteristisch für den jeweiligen Analyten. Somit kann dieses Verfahren zur

Charakterisierung von Substanzen mit gleicher Molekülmasse (isobare Substanzen) genutzt werden. Eine gängige Konfiguration dieses Prinzips stellen Triple-Quadrupol-Massenspektrometer dar, deren schematischer Aufbau in Abbildung 2 dargestellt ist (82). Ein Quadrupol besteht aus vier parallelen Stabelektroden, an denen eine Kombination aus Gleich- und Wechselspannung angelegt ist. Hierdurch können nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis den Quadrupol passieren. Die den Analyt beinhaltende Flüssigkeit wird zunächst ionisiert und in der Quelle durch starkes Erhitzen entfernt. Anschließend wird der Ionenstrahl in Quadrupol 0 (Q0) fokussiert und durchtritt anschließend zwei Quadrupole zur Massenfilterung (Q1 und Q3). Diesen zwischengeschaltet befindet sich eine Kollisionszelle (Q2), in der die Ionen auf ein inertes Gas treffen und in kleinere Fragmente zerfallen (83).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers**

Der Ionenstrahl trifft auf hintereinander geschaltene Quadrupole (Q), welche aus vier parallel angeordneten Stabelektroden bestehen. Durch eine angelegte Kombination aus Gleich- und Wechselspannung können nur Ionen mit bestimmten Masse-Ladungsverhältnis passieren. In Q0 wird der Ionenstrahl fokussiert und durchtritt Q1 und Q3 zur Massenfilterung. Zwischengeschaltet befindet sich Q2, in welchem die Ionen durch Auftreffen auf ein inertes Gas in kleinere Fragmente zerfallen

Um eine weitere Separation der Metabolite und gegebenenfalls die Entfernung störender Matrixbestandteile zu erreichen, wird die Massenspektrometrie oft mit einem chromatographischen Verfahren wie der Flüssigchromatographie (engl.: liquid chromatography; LC) oder Gaschromatographie (engl.: gas chromatography; GC) gekoppelt (84, 85). Hierdurch wird die Komplexität des in das Massenspektrometer eintretenden Substanzgemisches reduziert und zugleich werden die einzelnen Metabolite konzentriert. Die Chromatographie-gekoppelten MS-Verfahren (LC-MS/ GC-MS) besitzen dadurch eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Menge an benötigtem Probenmaterial im Bereich von Mikrolitern und die hohe Flexibilität des

verwendbaren Biomaterials wie beispielsweise Blut, Urin, Speichel, Zellmedien oder Gewebe (73). Neben Konzentration, Gewicht und der chemischen Struktur der Probe haben Matrix-Interferenzen Einfluss auf die detektierte Signalstärke. Für eine verlässliche Quantifikation der Metabolite ist daher die Verwendung stabiler, Isotopen-markierter interner Standards nötig (86).

### **1.3 Aktuelle Studienlage: Metabolomische Veränderungen bei Patient\*innen mit PPGL**

Es ist bekannt, dass Katecholamine direkte Auswirkungen auf den Energiehaushalt des Körpers haben. Dies spielt insbesondere bei der physiologischen Reaktion des Körpers auf Stress („Fight and Flight“-Reaktion) eine besondere Rolle. Die gesteigerte Glykolyse sowie die vermehrte Bereitstellung von Glukose durch gesteigerte Glykogenolyse und Gluconeogenese führen zu einer hyperglykämischen und hyperlaktatämischen Stoffwechsellage der Patient\*innen (87-89). Weiterhin kommt es zu einem verstärkten Abbau von Triglyzeriden sowie einer gesteigerten Ketonkörpersynthese und Fettsäurenproduktion (90).

Neben den systemischen Auswirkungen von PPGL haben sich neuere Studien im Bereich Targeted und Untargeted Metabolomics vor allem mit den Auswirkungen des Genotyps auf das tumoreigene Metabolom befasst. Insbesondere für die Klassifikation von SDHx-assoziierten PPGL scheint hierbei Succinat als diagnostischer Marker bedeutsam zu sein. So zeigte die Analyse des Metabolitenprofils in Tumorgewebe mithilfe einer High-Resolution-Magic-Angle-Spinning (HR-MAS) NMR-Spektroskopie bei Patient\*innen mit SDHx-assoziierten PPGL eine höhere Abundanz von Succinat im Vergleich zu nicht-SDHx-assoziierten PPGL sowie zu sporadisch auftretenden PPGL. Die Succinatkonzentration erlaubte in dieser Studie eine Unterscheidung zwischen SDHx vs. nicht-SDHx sowie zwischen SDHx vs. sporadische PPGL mit einer 100%igen Sensitivität und Spezifität (91). Rao et al. (92) konnten ebenfalls zeigen, dass tumoreigene Metabolite die Zuordnung von PPGL zu verschiedenen Genotypen erlauben. Basierend auf der Analyse mittels NMR-Spektroskopie erfolgte die Unterscheidung vor allem auf erhöhter Succinatkonzentration sowie erniedrigtem ATP/ADP/AMP bei PPGL mit SDH-Mutation und hohen Adrenalin-Werten bei RET-mutierten-Tumoren. Hohe Laktatlevel unterscheiden VHL-Tumore von RET-Tumoren. Weiterhin konnten Richter et al. (93) zeigen, dass die Charakterisierung von Tumorgewebe mittels einer auf LC-MS/MS basierten Analyse

von Metaboliten des Citratzyklus als Anhaltspunkt für die Identifikation zugrunde liegender Mutationen dienen kann. Ein hohes Succinat zu Fumarat Verhältnis erwies sich auch hier als Indikator für eine SDHx-Mutation. Unterschiedliche Konzentrationen von Citrat, Isocitrat und Cis-Aconiat ermöglichten eine weitere Unterteilung der Tumore und spiegelten die Cluster-Bildung von PPGL gemäß des Transkriptionsprofils wider. So wiesen PPGL mit Mutationen in VHL, FH und IDHx niedrige Konzentrationen dieser Metabolite auf. Hingegen waren Tumore mit Mutationen im Kinasesignalweg (RET, NF1, TMEM127) durch höhere Konzentrationen von Citrat, Isocitrat und cis-Aconitat gekennzeichnet.

Mit der Studie von Wallace et al. (94) wurde unlängst die Metabolitensignatur von Patient\*innen mit PPGL als Diagnostikwerkzeug zur Identifikation beziehungsweise zum Ausschluss von SDHx-Mutationen beschrieben. In Kombination mit einer immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich ein Vorteil gegenüber der Anwendung nur einer der beiden Methoden. Gemessen wurden hierfür sieben Metabolite des Citratzyklus mittels LC-MS/MS.

Im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie verglichen Erlic et al. (95) mittels Targeted Metabolomics das intraindividuelle Metabolitenprofil im Plasma bei 56 Patient\*innen mit PPGL vor und nach der operativen Tumorentfernung. Postoperativ wiesen insgesamt sieben Metabolite signifikante Unterschiede auf, darunter Histidin, Kreatinin, die vier Glycerophospholipide Phosphatidylcholin diacyl (PC aa) C42:0, Phosphatidylcholin acyl-alkyl (PC ae) C42:5, PC ae 44:5 und PC ae C44:6 sowie die Summe der Hexosen (Tabelle 2). Die Betrachtung der Patient\*innen im Alter  $\geq 45$  Jahren identifizierte eine postoperative Erhöhung der Tyrosin- und PC ae C34:2 Konzentrationen. PPGL mit einem noradrenergem Phänotyp zeigten ausgeprägtere Veränderungen als solche mit einem adrenergem Phänotyp. Die Subgruppenanalysen nach Geschlecht erbrachten keine signifikanten Unterschiede. Ein schwacher, aber signifikanter Zusammenhang mit der Konzentration der Gesamtkatecholamine im Urin fand sich bei acht der 15 Metabolite.

In Bezug auf diese Studie untersuchten Bliziotis et al. (96) ebenfalls das intraindividuelle Metabolitenprofil im Plasma bei 36 Patient\*innen mit PPGL mit jeweils einer prä- und postoperativen Messung. Im Gegensatz zu Erlic et al. wählten sie einen Untargeted NMR Metabolomic Ansatz, womit 30 Metabolite identifiziert wurden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Erlic et al. zeigte sich in der Gesamtgruppe postoperativ eine signifikante Verminderung der Glukosekonzentration sowie eine Erhöhung der Histidinkonzentration. Weiterhin fiel bei Tyrosin und Ornithin eine signifikante

postoperative Konzentrationserhöhung auf, welche bei Erlic et al. in der Gesamtgruppe nicht auftrat, jedoch in der Subgruppenanalyse der PPGL mit noradrenergem Phänotyp ebenfalls erhöht war. Insgesamt wiesen die Ergebnisse der Studie auf eine Beeinflussung der Ketonkörper- und Glukosestoffwechselwege bei Patient\*innen mit PPGL hin.

**Tabelle 2: Intraindividuelle Unterschiede im Metabolitenprofil prä- vs. postoperativ und deren Korrelation mit den Gesamtkatecholaminen im Urin**  
nach (95)

Metabolite	post-OP	Gruppe				Korrelation mit Urin GK	
		Gesamt	NA	BMI <25 kg/m <sup>2</sup>	Alter ≥ 45	r <sub>s</sub>	p
<b>Aminosäuren/ biogene Amine</b>							
Kreatinin	↑	X	X			<b>-0.229</b>	<b>0.03</b>
Histidin	↑	X		X		<b>-0.294</b>	<b>&lt;0.01</b>
Ornithin	↑		X			-0.132	0.20
Sarcosin	↑		X			<b>-0.21</b>	<b>0.05</b>
Tyrosin	↑		X		X	<b>-0.218</b>	<b>0.04</b>
<b>Glycerophospholipide</b>							
PC aa C38:1	↑		X			0.143	0.17
PC aa C42:0	↓	X	X			<b>0.296</b>	<b>&lt;0.01</b>
PC ae C34:2	↑				X	0.005	0.96
PC ae C40:2	↓		X			0.184	0.08
PC ae C42:5	↓	X	X			<b>0.270</b>	<b>0.01</b>
PC ae C44:5	↓	X				<b>0.214</b>	<b>0.04</b>
PC ae C44:6	↓	X				0.195	0.06
<b>Sphingolipide</b>							
SM C24:1	↓		X			0.17	0.10
SM C26:1	↓		X			0.145	0.16
<b>Monosaccharide</b>							
Hexose	↓	X				<b>0.422</b>	<b>&lt;0.01</b>

Pfeile geben eine erhöhte (↑) und eine verminderte (↓) Konzentration der Metabolite postoperativ an. Signifikante Korrelationen (r<sub>s</sub>, nach Spearman) (p ≤ 0.05) zwischen dem Metabolit und den Gesamtkatecholaminen im Urin sind schwarz hervorgehoben.

Die Benennung der Lipide („Cx:y“) erfolgt durch den zugehörigen Kurznamen sowie die Nennung der Gesamtlänge der Seitenketten („x“) und Anzahl der Doppelbindungen („y“).

aa=diacyl; ae=acyl-alkyl; BMI=Body Mass Index; C=carbon; F=Frauen; GK=Gesamtkatecholamine; NA=noradrenerger Phänotyp; PC=Phosphatidylcholin; SM=Sphingomyelin

## 1.4 Fragestellungen dieser Arbeit

Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene Tumore, die bei rechtzeitiger Diagnosestellung potenziell heilbar sind. Wird ein solcher Tumor jedoch nicht rechtzeitig erkannt, kann es zu lebensbedrohlichen Folgen kommen. Welche Auswirkungen der tumorcharakteristische Katecholaminexzess auf die Stoffwechsellage der Patient\*innen hat, ist noch weitgehend unbekannt. Mit der Untersuchung intraindividuelle Unterschiede vor und nach operativer Tumorentfernung konnten bereits signifikante Veränderungen des Metabolitenprofils im Plasma von Patient\*innen mit PPGL gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, das Verständnis für die metabolischen Effekte dieser seltenen Tumore zu erweitern und den Stellenwert metabolomischer Analysen für diagnostische Möglichkeiten zu erkunden.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Analyse der interindividuellen Unterschiede des Metabolitenprofils mithilfe eines LC-MS/MS-basierten Targeted Metabolomic-Ansatzes bei Patient\*innen mit Phäochromozytom oder Paragangliom im Vergleich zu Kontrollen, bei denen ein PPGL ausgeschlossen wurde.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht (97).

Folgende Fragen sollen hierbei beantwortet werden:

- Welche Metabolite sind bei Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu Kontrollen, bei denen ein PPGL ausgeschlossen wurde, signifikant verändert?
- Bestehen Korrelationen zwischen signifikant veränderten Metaboliten und Katecholaminwerten?
- Bestehen geschlechtsspezifische Veränderungen im Metabolitenprofil bei Patient\*innen mit PPGL?
- Bestehen phänotypspezifische Veränderungen im Metabolitenprofil bei Patient\*innen mit PPGL?
- Bestehen Hinweise auf eine diagnostische Wertigkeit des Metabolitenprofils?

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Auswahlkriterien des Patient\*innenkollektivs

Die in diese Studie eingeschlossenen Patient\*innen und Kontrollen wurden im Rahmen der Prospective Monoamine-Producing Tumor (PMT)-Studie rekrutiert. Die PMT-Studie ist eine internationale, multizentrische Studie mit dem Ziel, neue diagnostische Biomarker für PPGL und gastroenteropankreatische Tumore zu identifizieren. Studienzentren sind das Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus an der Technischen Universität Dresden, die Medizinische Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, das Universitätsklinikum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg sowie die Radboud University in Nijmegen, Niederlande, und das Institute of Cardiology in Warschau, Polen.

Die untersuchte Stichprobe der vorliegenden Arbeit stammt ausschließlich aus dem Studienzentrum Würzburg.

Die Rekrutierung und Charakterisierung erfolgte nach dem PMT-Protokoll, das von Eisenhofer G. et al. (40) bereits im Detail beschrieben wurde. Kurz zusammengefasst wurden Personen mit bestehendem Verdacht auf ein PPGL in die PMT-Studie aufgenommen, wenn sie mindestens ein Einschlusskriterium erfüllten und kein Ausschlusskriterium vorlag (Tabelle 3 und 4). Zunächst erfolgte die Bestimmung der Metanephrin- und Normetanephrinkonzentrationen im Plasma und im 24h-Sammelurin. Waren diese Werte unauffällig, ist ein PPGL mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen und es wurde eine Follow-Up-Untersuchung zur Kontrolle im Verlauf angestrebt. Bei unklaren Befunden wurde zusätzlich ein Clonidin-Suppressionstest und die Messung des Plasma-Chromogranin A sowie der fraktionierten Metanephrine im Urin über Nacht durchgeführt. Nur Patient\*innen mit biochemisch gesicherten PPGL wurden anschließend mit weiteren Untersuchungen genauer charakterisiert. Hierzu zählte die Vervollständigung des biochemischen Profils, eine Bildgebung und Echokardiographie, 24h-Blutdruckmessung, miRNA-Profil und eine genetische Testung. Nach chirurgischer Tumorentfernung wurden zusätzlich die pathologischen Daten und operativen Besonderheiten erfasst. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg beraten (104/11), es bestanden keine Einwände gegen das Forschungsvorhaben. Die schriftliche Einverständniserklärung der teilnehmenden Personen liegt vor.

**Tabelle 3: Einschlusskriterien für die Teilnahme an der PMT-Studie**

nach (40)

---

**Einschlusskriterien**

---

1. Klinische Zeichen und Symptome eines Katecholaminexzesses
  2. Hereditäres Risiko für ein PPGL  
(positive Familienanamnese, bekannte genetische Mutation)
  3. Inzidentalom
  4. Bekanntes, reseziertes PPGL in der Anamnese
- 

Einschlusskriterien gelten für Frauen und Männer jeden Alters, sowie für Kinder über fünf Jahren. Mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein.

PMT-Studie= Prospektive Monoamin-Produzierende Tumore-Studie; PPGL= Phäochromozytome und Paragangliome

**Tabelle 4: Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der PMT-Studie oder Teilen der Studie**

nach (40)

---

**Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie**

---

1. Eingeschränkte mentale Leistungs- oder Urteilsfähigkeit
  2. Dauermedikation, die Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann  
(z.B. trizyklische Antidepressiva, L-Dopa)
- 

**Ausschlusskriterien für die Teilnahme an Teilen der Studie**

---

1. Klaustrophobie, Metallimplantate (Schrittmacher, künstliche Gelenke etc.)
  2. Schwangerschaft
- 

Bei Klaustrophobie oder Metallimplantaten war eine Magnetresonanztomografie (MRT)-Untersuchung nicht möglich. Bei Schwangerschaft war der Einsatz einer MIBG-Szintigrafie, Positronen-Emissions-Tomografie (PET)-Untersuchung und Computertomografie (CT) nicht sowie der Einsatz einer MRT-Untersuchung nur eingeschränkt möglich.

PMT-Studie= Prospektive Monoamin-Produzierende Tumore-Studie

### **2.1.1 PPGL-Gruppe**

In die PPGL-Gruppe wurden 36 Patient\*innen mit biochemisch gesichertem Phäochromozytom oder Paragangliom eingeschlossen, die zu dem Zeitpunkt an der PMT-Studie

teilnahmen und am Universitätsklinikum Würzburg angebunden waren. Es wurden sowohl maligne als auch benigne, adrenale und extraadrenale PPGLs eingeschlossen. Voraussetzung für die Auswahl der in dieser Arbeit betrachteten Plasmaproben war das Vorhandensein eines PPGL zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Malignität ist in dieser Arbeit durch das Vorhandensein von Metastasen definiert, also den Nachweis von chromaffinem Gewebe in Organen, die normalerweise keine sympathischen Paraganglien aufweisen. Der sekretorische Phänotyp ist anhand der Metanephrin- und Normetanephrinwerte im Plasma nach einem publizierten Algorithmus in adrenerg und noradrenerg eingeteilt (98).

### **2.1.2 Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe wurden 36 Personen herangezogen, die aufgrund eines initialen Verdachts auf ein PPGL in die PMT-Studie am Universitätsklinikum Würzburg eingeschlossen wurden. Die Auswahl erfolgte gematcht nach Geschlecht, Alter bei Probenentnahme und verwendeten Zusatzstoffen bei der Plasmagewinnung (EDTA vs. Heparin) zu den Patient\*innen der PPGL-Gruppe. Bei 21 Kontrollen basierte der Verdacht eines PPGL auf dem Zufallsbefund eines Nebennierentumors im Rahmen einer Bildgebung, neun Patient\*innen wurden aufgrund klinischer Zeichen und Symptome eingeschlossen und bei sechs bestand eine therapieresistente Hypertonie. Patient\*innen mit einem auffälligen Routinescreening bei einer bekannten Mutation oder einem hereditären Syndrom wurden nicht als Kontrollen berücksichtigt. Das Vorliegen eines PPGL wurde durch negative biochemische Testung, Remission der Symptomatik, eine alternative Diagnose oder negative Bildgebung ausgeschlossen.

## **2.2 Randbedingungen der Blutentnahme und Probenaufbewahrung**

Die Blutentnahme erfolgte unter standardisierten Bedingungen (40). Die Patient\*innen wurden angehalten über Nacht zu fasten sowie auf Alkohol, Nikotin, koffeinhaltige und entkoffeinierte Getränke für 12 Stunden vor Probenentnahme zu verzichten. Weiterhin sollte kein Paracetamol in den vorherigen fünf Tagen eingenommen werden. Die Blutentnahme erfolgte nach 30-minütiger Ruhezeit in Rückenlage. Den Patient\*innen wurde 7,5 ml venöses Vollblut in Lithium-Heparin Sarstedt Monovetten® und 7,5 ml in EDTA

Sarstedt Monovetten® entnommen, diese wurden anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden daraufhin fünf Minuten mit 4000 U/min bei 20°C zentrifugiert und das Plasma der Lithium-Heparin-Proben aliquotiert. Anschließend wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

## **2.3 Messung der Metanephrine im Plasma und der Katecholamine im Urin**

Die Messung von Metanephrin, Normetanephrin und Methoxytyramin im Plasma sowie die Messung der Katecholamine im 24-Stunden-Sammelurin wurde an der Universitätsklinik Dresden mittels LC-MS/MS Messung nach einem validierten Verfahren durchgeführt (99-101).

## **2.4 Messung des Metabolitenprofils: Targeted Metabolomics**

Für die Charakterisierung des Metabolitenprofils wurde ein Targeted Metabolomics Ansatz gewählt.

### **2.4.1 AbsoluteIDQ®-p180 Kit**

Für die Quantifikation der Metabolite wurde das AbsoluteIDQ® p180 Kit von Biocrates (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Österreich) verwendet. Das Kit erlaubt die gezielte Analyse von 188 Metaboliten in einem Plasmavolumen von 10 µl (Tabelle 5). Nach der Probenaufbereitung erfolgt die Messung der Metabolite in zwei Schritten: einem Separationsschritt mittels Flüssigchromatografie (engl.: liquid chromatography, LC) und einer Fließinjektionsanalyse (engl.: flow injection analysis, FIA), an die sich jeweils die Detektion mittels einer Tandem-Massenspektrometrie anschließt (LC-MS/MS und FIA-MS/MS).

Das Kit ermöglicht die Quantifikation von 42 Metaboliten im Rahmen der LC-MS/MS Messung. Hierbei werden 21 Aminosäuren und 21 biogene Amine mithilfe von sieben, in verschiedenen Konzentrationen vorliegenden Kalibratoren quantifiziert. Die Messung der Aminosäuren und biogenen Amine ist absolut quantitativ validiert. Mithilfe der FIA-MS/MS-Methode lassen sich unter Nutzung einer Ein-Punkt-Kalibrierung mit

repräsentativen internen Standards weitere 146 Metabolite erfassen: 40 Acylcarnitine (AC), 38 Phosphatidylcholine mit acyl/acyl-Seitenkette (PC aa), 38 Phosphatidylcholine mit acyl/alkyl-Seitenkette (PC ae), 14 Lysophosphatidylcholine (LysoPC), 15 Sphingolipide (SM) und die Summe der Hexosen (H1). Die genauere Aufteilung in Hexose-Unterformen, beispielsweise Glukose, Galaktose, Fruktose und Mannose ist mit dem AbsoluteIDQ® p180 nicht möglich, weshalb nur die Summe aller in einer Probe vorhandenen Hexosen gemessen wird. 12 Acylcarnitine sowie die Summe der Hexosen sind absolut quantitativ validiert. Aufgrund fehlender spezifischer Standards werden die Lipide und die restlichen Acylcarnitine nur „semi-quantitativ“ gemessen. Weiterhin bilden die gemessenen Lipidkonzentrationen die Gesamtkonzentrationen möglicher Isobaren und Strukturisomeren ab. Die Benennung der Lipide erfolgt durch den zugehörigen Kurznamen sowie die Nennung der Gesamtlänge der Seitenketten und Anzahl der Doppelbindungen (102, 103).

Eine Liste aller erfassten Metabolite des AbsoluteIDQ® p180 Kits ist im Anhang 1 dargestellt.

**Tabelle 5: Übersicht der Metabolitenklassen im AbsoluteIDQ®-p180 Kit**  
nach (102)

Metabolitenklasse	Anzahl	LC-MS/MS	FIA-MS/MS
Aminosäuren	21	X	
Biogene Amine	21	X	
Phosphatidylcholine	76		X
Acylcarnitine	40		X
Sphingolipide	15		X
Lysophosphatidylcholine	14		X
Summe der Hexosen	1		X

FIA= Flow injection analysis; LC= Liquid chromatography; MS/MS= Tandem-Massenspektrometrie

Des Weiteren enthält das Kit die AbsoluteIDQ Kit Platte, eine leere 96-Well-Mikrotiterplatte, drei Plasmaproben in verschiedenen Konzentrationen als Qualitätskontrollen, einen internen Standardmix, sieben Kalibratoren für die Quantifizierung der Aminosäuren und biogenen Amine sowie die Software MetIDQ (102, 103).

## 2.4.2 Messanordnung der Proben

Die Proben wurden nach einem festen Schema auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte angeordnet (Abbildung 3). Die Vertiefung 1A blieb leer (Blank). Die Positionen 1B-1D wurden lediglich mit Phosphat-Puffer und internem Standard gefüllt (Zero Sample). Position 1E-1H und 2A-2C enthielten die im Kit mitgelieferten Kalibratoren. An Vertiefung 2D-2F wurden die ebenfalls mitgelieferten Qualitätskontrollen eingefüllt. Fünf Vertiefungen (2G, 5B, 7F, 10C, 12H) wurden mit Referenzplasma befüllt, das aus einem Plasmapool des Helmholtz-Zentrums München stammt und eine Normalisierung der Messergebnisse zwischen verschiedenen Messplatten ermöglicht. In die übrigen Positionen wurden die Plasmaproben der PPGL-Patient\*innen und Kontrollen in abwechselnder Reihenfolge gegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Cal 5	P 2	P 10	P 18	P 25	P 33	P 40	P 48	P 56	P 63	P 71
B	Zero	Cal 6	P 3	P 11	Ref	P 26	P 34	P 41	P 49	P 57	P 64	P 72
C	Zero	Cal 7	P 4	P 12	P 19	P 27	P 35	P 42	P 50	Ref	P 65	P 73
D	Zero	QC 1	P 5	P 13	P 20	P 28	P 36	P 43	P 51	P 58	P 66	P 74
E	Cal 1	QC 2	P 6	P 14	P 21	P 29	P 37	P 44	P 52	P 59	P 67	P 75
F	Cal 2	QC 3	P 7	P 15	P 22	P 30	Ref	P 45	P 53	P 60	P 68	P 76
G	Cal 3	Ref	P 8	P 16	P 23	P 31	P 38	P 46	P 54	P 61	P 69	P 77
H	Cal 4	P 1	P 9	P 17	P 24	P 32	P 39	P 47	P 55	P 62	P 70	Ref

**Abbildung 3: Schematische Anordnung der Proben auf einer 96 Well-Platte**

B=Blank; Cal=Kalibratoren; P=Plasmaprobe; QC=Qualitätskontrolle; Ref=Referenzplasma; Zero=Zero Sample

## 2.4.3 Probenvorbereitung und Probenmessung

Die Vorbereitung der Plasmaproben erfolgte nach den Herstellervorgaben. Zunächst wurden alle Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte mit Ausnahme der Blank-Position

A1 (Abbildung 3) mit 10 µl internem Standard sowie 10 µl der jeweiligen Probe (Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Plasmaproben) befüllt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten unter Stickstoffstrom getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgte die Derivatisierung der biogenen Amine und Aminosäuren mit 50 µl 5 % Phenylisothiocyanat, gefolgt von einer Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur sowie einer erneuten Trocknung unter Stickstoffstrom für weitere 60 Minuten. Die Metaboliten wurden mit 300 µl eines organischen Lösungsmittels (19 mg Ammoniumacetat in 50 ml Methanol) extrahiert und 30 Minuten mit 450 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Filtration in dem unteren Anteil der 96-Well-Platte wurde durch zweiminütige Zentrifugation bei 500xg erreicht. Für die LC-MS/MS-Messung wurde nun aus jeder Vertiefung 50 µl in eine zweite 96-Well-Mikrotiterplatte übertragen und jeweils 250 µl 40 % Methanol hinzugeben. Bei der ursprünglichen 96-Well-Platte wurden in jede Vertiefung 380 µl der mobilen Phase (Biocrates Lösungsmittel I mit 290 ml Methanol) für die FIA-MS/MS Analyse hinzugefügt. Anschließend wurden beide Mikrotiterplatten für zwei Minuten bei 600 rpm geschüttelt. Für die LC-Messung wurden die Proben bei einer Flussrate von 0.80 ml/min in die Säule injiziert. Die FIA-Messung wurde mit einer Flussrate von 0.03 ml/min begonnen, nach 2.4 Minuten auf 0.20 ml/min gesteigert und nach drei Minuten wieder auf 0.03 ml/min reduziert.

Die verwendeten Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 6 und 7 in Abschnitt 2.4.4 angegeben.

#### **2.4.4 Material**

Die Messung der Metabolite erfolgte in der Zentraleinheit Klinische Massenspektrometrie der Universitätsklinik Würzburg. Es wurde ein SCIEX QTRAP® 4500MD Triple-Quadrupol Massenspektrometer gekoppelt an eine Agilent 1290 Infinity Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Anlage (engl.: Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) verwendet. Für die Datenverarbeitung wurde die Analyst® Software (Version 1.6.3 MD) verwendet. Die Messvorbereitungen, technische Validierung und Verarbeitung der MS-Daten wurden mittels der im AbsoluteIDQ® p180-Kit enthaltenen Biocrates MetIDQ™ Software (Version 5.5.4-DB100 Boron-2623, Biocrates Life Sciences AG, Austria) durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 6 und 7 dargestellt.

**Tabelle 6: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
QTRAP® 4500MD LC-MS/MS System	SCIEX, Darmstadt, D
1290 Infinity II UHPLC Anlage	Agilent, Santa Clara, USA
ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 x75 mm	Waters, Eschborn, D
ACQUITY BEH C18 1.7 µm VanGuard	Waters, Eschborn, D
MS 3 digital, Schüttler	IKA, Staufen, D
Universal 320, Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, CH
Eppendorf Reference® 2, Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Stickstoff-Evaporator	VLM, Bielefeld, D

**Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel**

Chemikalien/ Lösungsmittel	Hersteller
Ammoniumacetat	VWR, Darmstadt, D
Methanol	VWR, Darmstadt, D
Phenylisothiocyanat	VWR, Darmstadt, D
Phosphate Buffered Saline (PBS)	VWR, Darmstadt, D
Wasser (LC-MS grade)	VWR, Darmstadt, D

## 2.3 Statistische Auswertung

Metabolite, bei denen mehr als 40 % der Konzentrationen unterhalb der Quantifizierungsgrenze (engl.: lower limit of quantification, LLOQ) und/oder des unteren Detektionslimits (engl.: lower limit of detection, LOD) lagen, wurden von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. In den verbleibenden Metaboliten wurden die Werte unterhalb dieser Grenzen unverändert übernommen. Konnte für einen Metabolit kein Signal detektiert werden, wurde der fehlende Wert durch eine Zufallskonzentration ersetzt:  $c = \frac{LOD}{\sqrt{2}} \times (\text{Zufallszahl zwischen } 0.75 - 1.25)$ .

Die Konzentration der Metaboliten wurde in µmol/l angegeben. Kategoriale Variablen der Baseline-Charakteristika wurden als Häufigkeiten und numerische Variablen als Median (Md) mit Interquartilenabstand (engl.: interquartile range, IQR) dargestellt. Der Vergleich

der Urin- und Plasmadaten zwischen den Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U Test durchgeführt und p-Werte  $\leq 0.05$  als signifikant festgelegt.

Um die metabolomischen Veränderungen durch PPGL zu erfassen, wurden die Metabolitenkonzentrationen der PPGL-Gruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen (Mann-Whitney-U-Test) und Subgruppenanalysen nach Geschlecht (Männer vs. Frauen) und Phänotyp (adrenerg vs. noradrenerg) durchgeführt. Bei der phänotypspezifischen Betrachtung wurden jeweils nach Alter und Geschlecht gematchte Kontrollen verglichen. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Test berechnet und als Spearman-Korrelationskoeffizient  $r_s$  angegeben. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0.05$  festgelegt. Für die Durchführung der statistischen Analysen wurde das Programm SPSS (IBM, New York, USA) Version 25 verwendet. Für die Hauptkomponentenanalyse (engl.: principal component analysis, PCA) wurde MetaboAnalyst, Version 5.0 genutzt.

### 3 Ergebnisse

---

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in *Frontiers in Endocrinology* im September 2021 veröffentlicht (97).

#### 3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 72 Patient\*innen in diese Studie eingeschlossen. Die PPGL-Gruppe umfasst hierbei 36 Patient\*innen, die mit 36 nach Geschlecht und Alter bei der Probenentnahme gematchten Kontrollen verglichen wurden. Die Basisauswertung der Patient\*innencharakteristika, sowie Plasma- und Urindaten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

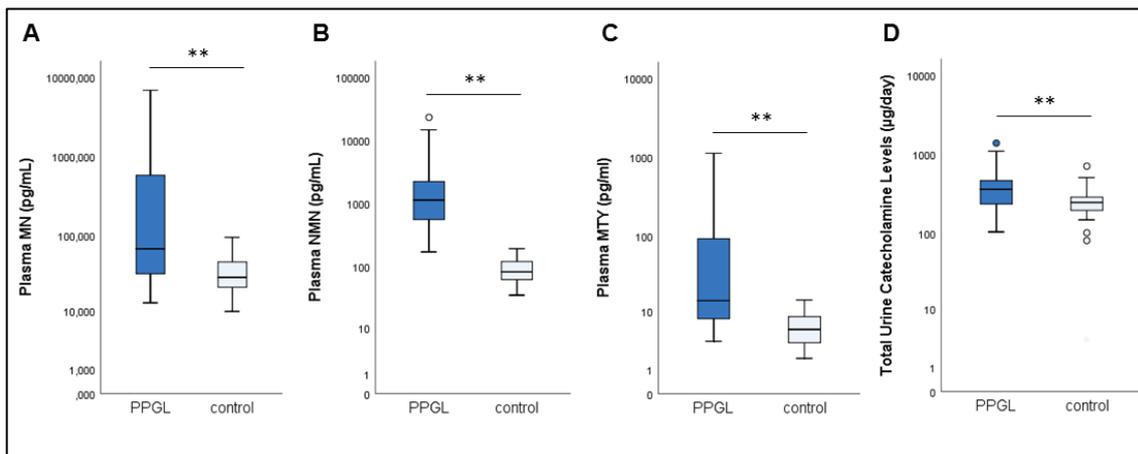
In beiden Gruppen sind jeweils 17 (47 %) Frauen und 19 (53 %) Männer. Bei 18 (50 %) Personen der Kontroll-Gruppe erfolgte nach mindestens sechs Monaten eine Follow-Up Untersuchung zum Ausschluss eines PPGL. Für die restlichen Kontrollen kann kein dokumentiertes Follow-Up nachgewiesen werden. In der PPGL-Gruppe sind sieben (19 %) der Tumore extraadrenal lokalisiert und elf (31 %) maligne. Der mediane Tumordurchmesser beträgt 4.1 cm (IQR=3.3–6.1 cm). 15 (42 %) Patient\*innen mit PPGL weisen einen adrenergen Phänotyp auf. Von den Patient\*innen mit PPGL sind bei sechs (17 %) ein Diabetes mellitus bei Studienbeginn bekannt. Der mediane Body-Mass-Index (BMI) innerhalb der PPGL-Gruppe beträgt 25.2 kg/m<sup>2</sup> (IQR=23.6–26.7 kg/m<sup>2</sup>), innerhalb der Kontroll-Gruppe 28.6 kg/m<sup>2</sup> (IQR=26.0–31.2 kg/m<sup>2</sup>) und zeigt einen signifikanten Unterschied (p=0.043) zwischen den Gruppen.

Für alle Patient\*innen beider Gruppen liegen Plasmadaten vor, davon jeweils 20 (56 %) EDTA-Proben und 16 (44 %) Lithium-Heparin-Proben. Das mediane Alter bei Probenentnahme beträgt in beiden Gruppen 51 Jahre. In der PPGL-Gruppe zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte (Median, IQR in pg/ml) für Normetanephrin (1144.4, 561.4–2327.8 vs. 82.8, 62.3–121.7, p<0.001), Metanephrin (66.7, 31.0–596.2 vs. 28.4, 21.0–45.4, p<0.001) und Methoxytyramin (14.1, 7.8–111.6 vs. 5.5, 3.4–8.8, p<0.001).

Vollständige Urindaten liegen für 27 Patient\*innen der PPGL-Gruppe und 31 Personen der Kontrollgruppe vor, auch hier ist das mediane Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Freies Adrenalin und Noradrenalin im Urin liegen bei der PPGL-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in signifikant erhöhten Konzentrationen (Median, IQR in µg/24h) vor (9.6, 2.8–34.6 vs. 4.0, 2.3–5.9, p=0.011

und 75.0, 38.0–160.9 vs. 20.6, 15.0–37.9,  $p < 0.001$ ). Das freie Dopamin im Urin weist vergleichbare Werte in beiden Gruppen auf.

Zusammenfassend zeigt die Gruppe der Patient\*innen mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom sowohl signifikant erhöhte Metanephrine im Plasma als auch Gesamtkatecholamine im Urin. Eine graphische Darstellung ist als Boxplot in der Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Boxplot der Katecholaminwerte im Plasma und Urin PPGL vs. Kontrollen**

Plasma Konzentrationen für (A) Metanephrin, MN, (B) Normetanephrin, NMN und (C) Methoxytyramin, MTY im Plasma in pg/ml sowie die Konzentration der (D) Gesamtkatecholamine im Urin in  $\mu\text{g}/24\text{h}$ .

Angabe der logarithmisch skalierten Daten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0.01$ ) sind mit \*\* markiert. Vollständige Plasmadaten verfügbar für alle PPGL und Kontrollen. Vollständige Urindaten verfügbar für PPGL  $n=27$  und Kontrollen  $n=31$ . Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachem Interquartilenbereich sind als Kreise (°) markiert.

PPGL= Phäochromozytome und Paragangliome

**Tabelle 8: Patient\*innencharakteristika, Plasma- und Urindaten**

nach (97)

	Kontroll-Gruppe	PPGL-Gruppe	p-Wert
<b>Patient*innen, n</b>	36	36	
Frauen, n (%)	17 (47)	17 (47)	
Extraadrenale Tumore, n (%)		7 (19)	
Maligne Tumore, n (%)		11 (31)	
Adrenerger Phänotyp, n (%)		15 (42)	
Tumordurchmesser in cm		4.1 (3.3–6.1)	
Diabetes mellitus, n (%)		6 (17)	
BMI in kg/m <sup>2</sup>	28.6 (26.0–31.2)	25.2 (23.6–26.7)	0.043
FUP ≥ 6 Monate, n (%)	18 (50)		
<b>Plasmadaten</b>			
EDTA-Plasma, n (%)	20 (56)	20 (56)	
Heparin-Plasma, n (%)	16 (44)	16 (44)	
Alter bei Probenentnahme in Jahren	50.9 (43.7–62.2)	50.7 (41.7–61.4)	0.884
NMN in pg/ml	82.8 (62.3–121.7)	1144.4 (561.4–2327.8)	<0.001
MN in pg/ml	28.4 (21.0–45.4)	66.7 (31.0–596.2)	<0.001
MTY pg/ml	5.5 (3.4–8.8)	14.1 (7.8–111.6)	<0.001
<b>Urindaten</b>			
Alter bei Probenentnahme in Jahren	52.5 (46.8–62.9)	53.7 (43.3–61.7)	0.953
Freies NE in µg/24h	20.6 (15.0–37.9)	75.0 (38.0–160.9)	<0.001
Freies EPI in µg/24h	4.0 (2.3–5.9)	9.6 (2.8–34.6)	0.011
Freies DA in µg/24h	218.5 (165.1–249.8)	217.1 (144.3–288.0)	0.767
Gesamtkatecholamine in µg/24h	245.7 (192.0–297.4)	360.3 (221.0–469.7)	0.003

Tumorgröße, BMI, Alter bei Probenentnahme, Metanephriene im Plasma und Katecholamine im Urin als Median mit (Interquartilenabstand) angegeben. P-Werte mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. Plasmadaten für alle Patient\*innen und vollständige Urindaten für 27 PPGL und 31 Kontrollen verfügbar. Angaben zur Tumorgröße bei 32 PPGL vorhanden.

BMI=Body Mass Index; DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; FUP=Follow Up; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin, PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

## 3.2 Metabolomische Veränderungen bei Patient\*innen mit Phäochromozytom oder Paragangliom

Von den insgesamt 188 gemessenen Metaboliten wurden 130 in die statistische Auswertung dieser Arbeit eingeschlossen, darunter sechs Acylcarnitine, 21 Aminosäuren, fünf biogene Amine, 83 Glycerophospholipide, 14 Sphingolipide und die Summe der Hexosen. 58 Metabolite wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abbildung 5).

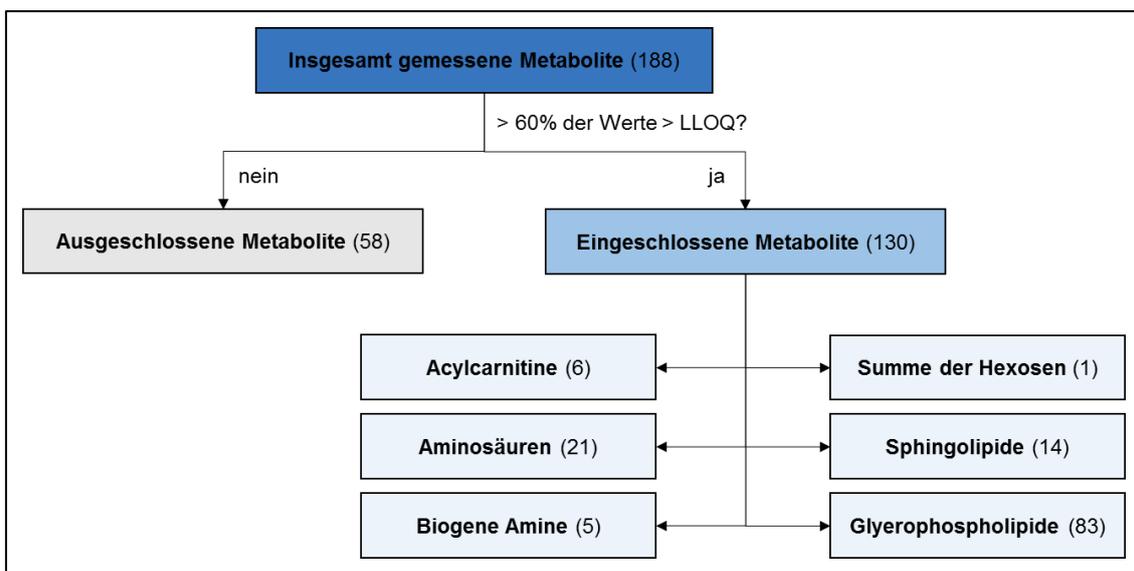
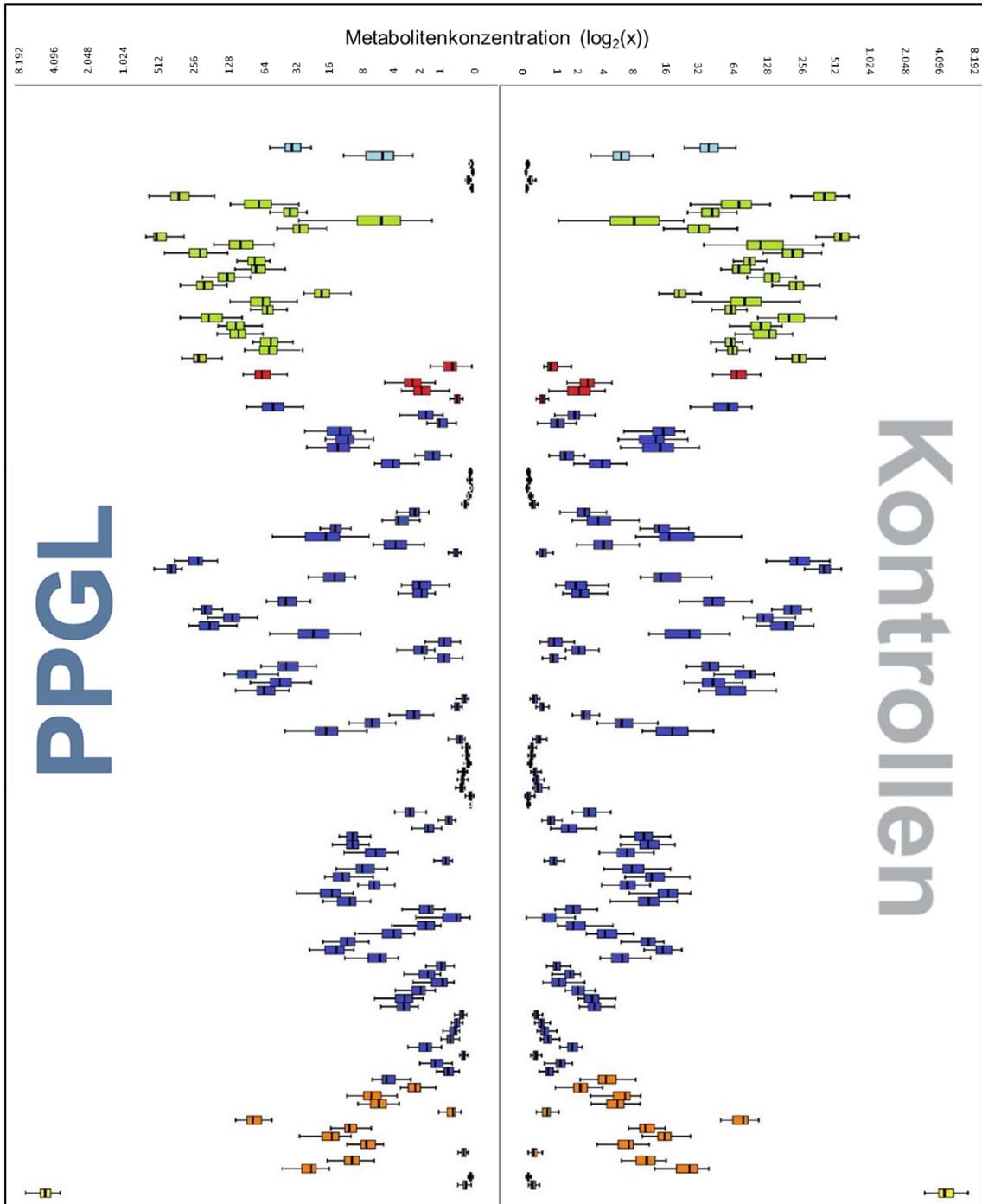


Abbildung 5: Flow Chart der analysierten Metabolite

LLOQ=lower limit of quantification

### 3.3.1 Metabolitenprofil PPGL vs. Kontrollgruppe

In Abbildung 6 ist das Metabolitenprofil der Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu dem Profil der Kontrollgruppe dargestellt. Die Graphik zeigt einen Überblick über die 130 Metabolite, die in die statistische Auswertung aufgenommen wurden. Die Werte sind in logarithmischer Skala angegeben. Ausreißer und Extremwerte sind in dieser Graphik aus Übersichtsgründen nicht abgebildet. Eine detaillierte Auflistung der Metabolite sowie der zugehörigen Medianwerte und Interquartilenabstände innerhalb der beiden Gruppen ist dem Anhang 1 zu entnehmen.



**Abbildung 6: Metabolitenprofil PPGL vs. Kontrollgruppe**  
nach (95)

Darstellung der 130 in die statistische Auswertung aufgenommenen Metabolite in logarithmischer Skala. Darunter sechs Alcylocarnitine (hellblau), 21 Aminosäuren (grün), fünf biogene Amine (rot), 83 Glycerophospholipide (dunkelblau), 14 Sphingomyeline (orange) und die Summe der Hexosen (gelb).

Ausreißer und Extremwerte sind aus Übersichtsgründen nicht angegeben. PPGL n=36, Kontrollen n=36.

PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

### 3.3.2 Histidin, Threonin, LysoPC a C28:0 und die Summe der Hexosen als signifikant veränderte Metabolite bei Patient\*innen mit PPGL

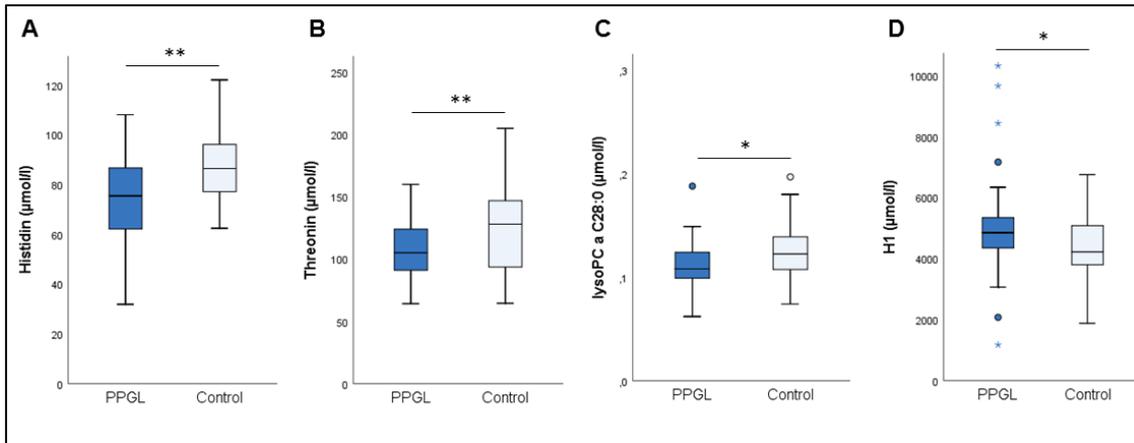
Von den 130 betrachteten Metaboliten weisen vier Metabolite signifikante Unterschiede zwischen Patient\*innen mit PPGL und den Probanden der Kontrollgruppe auf (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Signifikante metabolomische Veränderung bei Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu der Kontrollgruppe**

Metabolit	↑/↓	PPGL-Gruppe	Kontroll-Gruppe	p-Wert
		Md (IQR) in µmol/l	Md (IQR) in µmol/l	
Histidin	↓	75.40 (61.03–87.05)	86.40 (75.63–96.35)	0.004
Threonin	↓	105.00 (88.57–125.00)	128.00 (93.32–147.50)	0.008
LysoPC a 28:0	↓	0.11 (0.10–0.12)	0.12 (0.11–0.14)	0.044
H1	↑	4844.00 (4325.50–5364.50)	4215.50 (3791.00–5086.00)	0.018

Daten als Median (Md) mit Interquartilenabstand (IQR) in µmol/l angegeben. Der Pfeil zeigt die Erhöhung (↑) oder Verminderung (↓) der Metabolitenkonzentration in der PPGL-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an. P-Wert mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. H1=Summe der Hexosen; LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

Die Aminosäuren Histidin und Threonin liegen in der PPGL-Gruppe in niedrigeren Konzentrationen (Median, IQR in µmol/l) als bei den Kontrollen vor (75.40, 61.03–87.05 vs. 86.40, 75.63–96.35, p=0.004 und 105.00, 88.57–125.00 vs. 128.00, 93.32–147.50, p=0.008). Bei den Glycerophospholipiden weist LysoPC a C28:0 innerhalb der PPGL-Gruppe ebenfalls signifikant verminderte Werte auf (0.11, 0.10–0.12 vs. 0.12, 0.11–0.14, p=0.044). Die Summe der Hexosen ist bei Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu den Kontrollen als einziger Metabolit signifikant erhöht (4844.00, 4325.50–5364.50 vs. 4215.50, 3791.00–5086.00, p=0.018). Alle untersuchten biogenen Amine, Acylcarnitine und Sphingolipide zeigen vergleichbare Konzentrationen zwischen beiden Gruppen. Die vier signifikant veränderten Metabolite Histidin, Threonin, LysoPC a 28:0 und H1 sind in Abbildung 7 als Boxplot graphisch dargestellt.



**Abbildung 7: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite PPGL vs. Kontrollen**

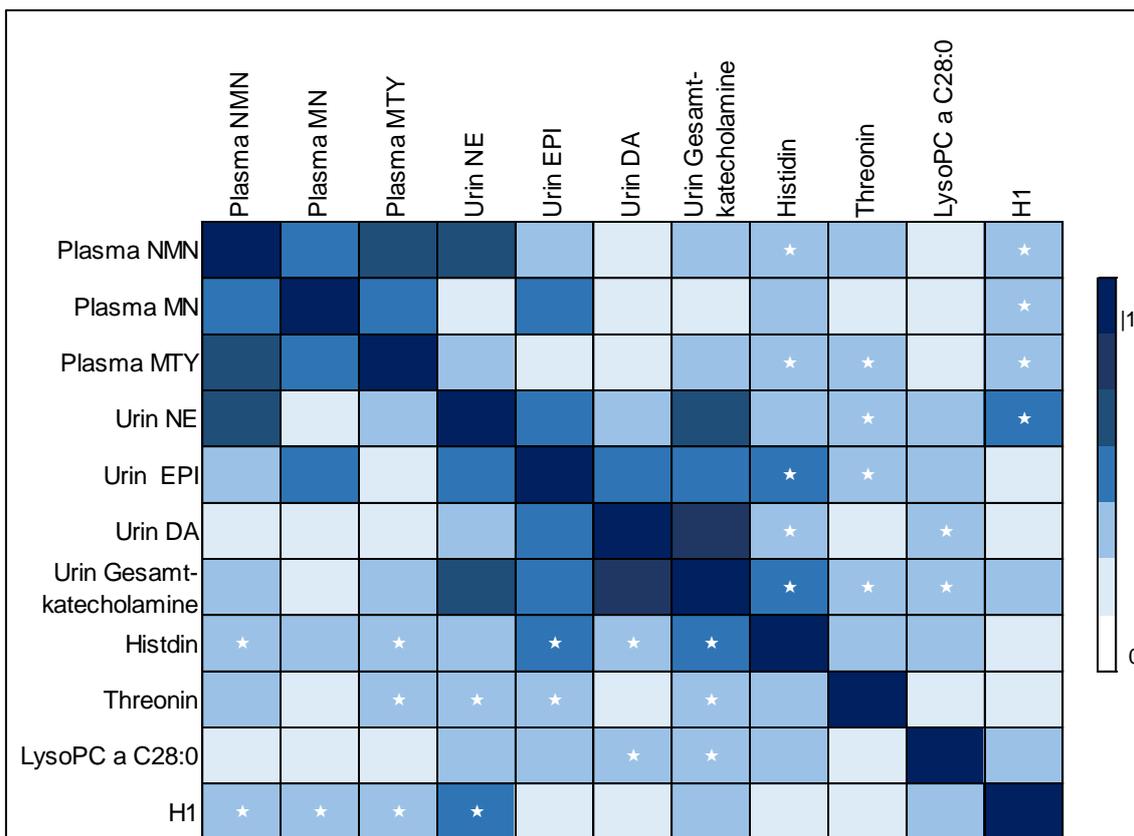
Plasmakonzentrationen für (A) Histidin, (B) Threonin, (C) LysoPC a C28:0 sowie (D) die Summe der Hexosen, H1. Angabe der Daten in µmol/l

Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachen Interquartilenbereich sind als Kreise markiert. Extremwerte, die mehr als das 3-fache des IQR vom Kastenende entfernt liegen, sind als Sternchen gekennzeichnet. Ein Extremwert der Kontrollgruppe von LysoPC a C28:0 bei 1.1 µmol/l ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit \* ( $p < 0.05$ ) und \*\* ( $p < 0.01$ ) gekennzeichnet. PPGL  $n=36$ , Kontrollen  $n=36$ .

LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

### 3.3.3 Korrelationen zwischen Plasma-Metanephrinen, Urin-Katecholaminen und Plasma-Metaboliten

Um einen etwaigen Zusammenhang zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei Patient\*innen mit PPGL und Metanephrin, Normetanephrin und Methoxytyramin im Plasma sowie den Katecholaminen im Urin zu untersuchen, wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt und der Spearman-Korrelationskoeffizient in einer Heatmap farblich visualisiert (Abbildung 8). Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten  $r_s$  erfolgt nach Cohen (104), wobei  $|r_s|=0,10$  für eine schwache bzw. geringe Korrelation,  $|r_s|=0,30$  für eine mittlere bzw. moderate Korrelation und  $|r_s|=0,50$  für eine große bzw. starke Korrelation spricht.



**Abbildung 8: Heatmap der Korrelationen zwischen den Metaboliten im Plasma und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma nach (95)**

Dargestellt ist der Betrag des Spearman-Korrelationskoeffizienten ( $r_s$ ). Signifikante Korrelationen sind mit einem Stern markiert.

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; H1=Summe der Hexosen; LysoPC= Lysophosphatidylcholin; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

Insgesamt zeigen sich für alle vier Metabolite signifikante Korrelationen mit Metanephrinen im Plasma oder Katecholaminen im Urin, allerdings liegen lediglich schwache bis moderate Zusammenhänge nach Cohen vor (Tabelle 10).

So zeigt Histidin eine signifikante, aber schwache, negative Korrelation mit Normetanephrin und Methoxytyramin im Plasma ( $r_s=-0.287$ ,  $p=0.015$  und  $r_s=-0.242$ ,  $p=0.044$ ), sowie eine moderate negative Korrelation mit Adrenalin und Dopamin ( $r_s=-0.408$ ,  $p=0.001$  und  $r_s=-0.300$ ,  $p=0.021$ ) sowie mit den Gesamtkatecholaminen im Urin ( $r_s=-0.407$ ,  $p=0.002$ ). Threonin korreliert schwach negativ mit der Konzentration von Methoxytyramin im Plasma sowie Noradrenalin und den Gesamtkatecholaminen im Urin ( $r_s=-0.266$ ,  $p=0.026$  sowie  $r_s=-0.255$ ,  $p=0.045$  und  $r_s=-0.275$ ,  $p=0.037$ ). Zusätzlich weist es eine moderate negative Korrelation mit Adrenalin im Urin auf ( $r_s=-0.304$ ,  $p=0.017$ ). LysoPC a C28:0 präsentiert eine schwache, negative Korrelation mit Dopamin und den

Gesamtkatecholaminen im Urin ( $r_s=-0.260$ ,  $p=0.047$  und  $r_s=-0.269$ ,  $p=0.041$ ). Die Summe der Hexosen zeigt eine positive Korrelation mit den Plasmakonzentrationen von Normetanephrin, Metanephrin und Methoxytyramin sowie mit Noradrenalin im Urin ( $r_s=0.337$ ,  $p=0.004$ ,  $r_s=0.276$ ,  $p=0.019$  und  $r_s=0.339$ ,  $p=0.004$  sowie  $r_s=0.437$ ,  $p<0.001$ ).

**Tabelle 10: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGL und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma**

	Histidin	Threonin	LysoPC a C28:0	H1
<b>Plasma NMN</b>	<b>-0.287*</b> <b>(0.015)</b>	-0.229 (0.053)	-0.169 (0.157)	<b>0.337**</b> <b>(0.004)</b>
<b>Plasma MN</b>	-0.219 (0.065)	-0.054 (0.655)	-0.147 (0.217)	<b>0.276*</b> <b>(0.019)</b>
<b>Plasma MTY</b>	<b>-0.242*</b> <b>(0.044)</b>	<b>-0.266*</b> <b>(0.026)</b>	-0.144 (0.233)	<b>0.339**</b> <b>(0.004)</b>
<b>Urin NE</b>	-0.239 (0.061)	<b>-0.255*</b> <b>(0.045)</b>	-0.212 (0.097)	<b>0.437**</b> <b>(&lt;0.001)</b>
<b>Urin EPI</b>	<b>-0.408**</b> <b>(0.001)</b>	<b>-0.304*</b> <b>(0.017)</b>	-0.219 (0.090)	0.145 (0.264)
<b>Urin DA</b>	<b>-0.300*</b> <b>(0.021)</b>	-0.161 (0.224)	<b>-0.260*</b> <b>(0.047)</b>	-0.046 0.728
<b>Urin GK</b>	<b>-0.407**</b> <b>(0.002)</b>	<b>-0.275*</b> <b>(0.037)</b>	<b>-0.269*</b> <b>(0.041)</b>	0.221 (0.096)

Angabe des Spearman-Korrelationskoeffizienten  $r_s$  und des p-Werts in Klammern. Signifikante Korrelationen sind fett markiert. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; H1=Summe der Hexosen; LysoPC=Lysophosphatidylcholin; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

### 3.4 Geschlechtsspezifische metabolomische Veränderungen und deren Korrelationen mit Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen

In exploratorischen Analysen wurden Subgruppen von Patient\*innen separat untersucht, um etwaige Einflussfaktoren auf die genannten Ergebnisse zu identifizieren.

#### 3.4.1 Frauen

Bei der Betrachtung der Frauen mit PPGL im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen zeigen sich fünf Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (Tabelle 11). So tritt die Aminosäure Histidin in der PPGL-Gruppe in verminderter Konzentration (Median, IQR in  $\mu\text{mol/l}$ ) auf (64.10, 56.70–78.30 vs. 85.90, 71.70–104.50,  $p=0.001$ ). PC ae C38:1 zeigt ebenfalls erniedrigte Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe (0.37, 0.28–1.24 vs. 0.71, 0.47–1.69,  $p=0.022$ ). Die Glycerophospholipide LysoPC a C20:4, PC aa C36:4 und PC aa C38:4 liegen bei den Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu den Kontrollen mit erhöhten Werten vor (3.95, 3.50–4.95 vs. 2.62, 2.44–3.54,  $p=0.006$ , 203.00, 165.00–249.50 vs. 160.00, 124.00–211.00,  $p=0.041$  und 94,10, 77.35–107.00 vs. 82.60, 64.40–91.55,  $p=0.049$ ). Eine graphische Darstellung als Boxplot befindet sich im Anhang 2.

**Tabelle 11: Signifikante metabolomische Veränderungen bei Frauen**

Metabolit	↑/↓	PPGL-Gruppe	Kontroll-Gruppe	p-Wert
		Md (IQR) in $\mu\text{mol/l}$	Md (IQR) in $\mu\text{mol/l}$	
Histidin	↓	64.10 (56.70-78.30)	85.90 (71.70-104.50)	0.001
LysoPC a C20:4	↑	3.95 (3.50-4.95)	2.62 (2.44-3.54)	0.006
PC aa C36:4	↑	203.00 (165.00-249.50)	160.00 (124.00-211.00)	0.041
PC ae C38:1	↓	0.37 (0.28-1.24)	0.71 (0.47-1.69)	0.022
PC aa C38:4	↑	94.10 (77.35-107.00)	82.60 (64.40-91.55)	0.049

Daten als Median (Md) mit Interquartilenabstand (IQR) in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. Der Pfeil zeigt die Erhöhung (↑) oder Verminderung (↓) der Metabolitenkonzentration in der PPGL-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an. P-Wert mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

Alle Metabolite weisen signifikante Zusammenhänge mit Metanephrinen im Plasma oder Katecholaminen im Urin auf (Tabelle 12). So korreliert die Konzentration von Histidin signifikant negativ mit Normetanephrin im Plasma und Adrenalin sowie den Gesamtkatecholaminen im Urin ( $r_s=-0.428$ ,  $p=0.012$  und  $r_s=-0.434$ ,  $p=0.024$  sowie  $r_s=-0.479$ ,  $p=0,012$ ). LysoPC a C20:4 weist eine positive Korrelation mit Normetanephrin und Methoxytyramin im Plasma sowie Noradrenalin und Adrenalin im Urin auf ( $r_s=0.471$ ,  $p=0.005$  und  $r_s=0.438$ ,  $p=0.012$ , sowie  $r_s=0.537$ ,  $p=0.004$  und  $r_s=0.412$ ,  $p=0.033$ ). Zusätzlich zeigt sich ein starker positiver Zusammenhang mit den Gesamtkatecholaminwerten im Urin ( $r_s=0.538$ ,  $p=0.004$ ). Des Weiteren liegt eine signifikant positive Korrelation zwischen PC aa C36:4 und Normetanephrin, Metanephrin und Methoxytyramin im Plasma vor ( $r_s=0.356$ ,  $p=0.039$ ,  $r_s =0.514$ ,  $p=0.002$  und  $r_s=0.525$ ,  $p=0.002$ ). Es besteht ein negativer Zusammenhang von PC ae C38:1 mit Normetanephrin und Metanephrin im Plasma sowie mit Adrenalin im Urin ( $r_s=-0.368$ ,  $p=0.032$  und  $r_s=-0.474$ ,  $p=0.005$  sowie  $r_s=-0.531$ ,  $p=0.004$ ). PC aa C38:4 korreliert signifikant positiv mit den Metanephrin- und Methoxytyraminkonzentrationen im Plasma ( $r_s =0.535$ ,  $p=0.001$  und  $r_s=0.508$ ,  $p=0.003$ ). Eine detaillierte Übersicht der Korrelationen befindet sich im Anhang 3.

**Tabelle 12: Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei Frauen**

Metabolit	Korrelationen						
	Plasma			Urin			
	NMN	MN	MTY	NE	EPI	DA	GK
Histidin	X*	-	-	-	X*	-	X*
LysoPC a C20:4	X**	-	X*	X**	X*	-	X**
PC aa C36:4	X*	X**	X**	-	-	-	-
PC ae C38:1	X*	X**	-	-	X**	-	-
PC aa C38:4	-	X**	X**	-	-	-	-

Signifikante Korrelationen nach Spearman sind mit X markiert. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin, LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin

### 3.4.2 Männer

Beim Vergleich der männlichen PPGL-Patienten mit den männlichen Kontrollen fallen ebenfalls fünf Metabolite mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den Gruppen auf (Tabelle 13). Threonin liegt in der PPGL-Gruppe mit erniedrigten Werten (Median, IQR in  $\mu\text{mol/l}$ ) vor (102.00, 85.50–127.00 vs. 132.00, 104.00–156.00,  $p=0.008$ ). Ebenfalls vermindert in der PPGL-Gruppe zeigt sich LysoPC a C16:1 (1.68, 1.09–1.79 vs. 1.89, 1.54–2.16,  $p=0.025$ ). Dahingegen sind das Glycerophospholipid PC ae C30:2 und das Sphingolipid SM (OH) C14:1 sowie die Summe der Hexosen bei Patienten mit PPGL im Vergleich zu den männlichen Kontrollen erhöht (0.07, 0.06–0.08 vs. 0.06, 0.06–0.07,  $p=0.040$  und 4.77, 3.20–5.43 vs. 3.46, 2.59–4.38,  $p=0.040$  sowie 4845.00, 4489.00–5285.00 vs. 4079.00, 3789.00–5131.00,  $p=0.050$ ). Eine graphische Darstellung als Boxplot befindet sich im Anhang 4.

**Tabelle 13: Signifikante metabolomische Veränderungen bei Männern**

Metabolit	$\uparrow/\downarrow$	PPGL-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
		Md	(IQR) in $\mu\text{mol/l}$	Md	(IQR) in $\mu\text{mol/l}$	
Threonin	$\downarrow$	102.00	(85.50–127.00)	132.00	(104.00–156.00)	0.008
LysoPC a C16:1	$\downarrow$	1.68	(1.09–1.79)	1.89	(1.54–2.16)	0.025
PC ae C30:2	$\uparrow$	0.07	(0.06–0.08)	0.06	(0.06–0.07)	0.040
SM (OH) C14:1	$\uparrow$	4.77	(3.20–5.43)	3.46	(2.59–4.38)	0.040
H1	$\uparrow$	4845.00	(4489.00–5285.00)	4079.00	(3789.00–5131.00)	0.050

Daten als Median (Md) mit Interquartilenabstand (IQR) in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. Der Pfeil zeigt die Erhöhung ( $\uparrow$ ) oder Verminderung ( $\downarrow$ ) der Metabolitenkonzentration in der PPGL-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an. P-Wert mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. H1=Summe der Hexosen; LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome; SM= Sphingolipid

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Katecholaminwerten und der Konzentration der Metabolite zeigt sich lediglich für Threonin und die Summe der Hexosen (Tabelle 14). Threonin korreliert negativ mit Normetanephrin im Plasma und Adrenalin im Urin ( $r_s=-0.328$ ,  $p=0.044$  und  $r_s=-0.345$ ,  $p=0.046$ ). Eine positive Korrelation fällt weiterhin zwischen der Summe der Hexosen und Normetanephrin im Plasma sowie Noradrenalin

im Urin auf ( $r_s=0.381$ ,  $p=0.018$  und  $r_s =0.425$ ,  $p=0.011$ ). Eine detaillierte Übersicht der Korrelationen befindet sich im Anhang 5.

**Tabelle 14: Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei Männern**

Metabolit	Korrelationen						
	Plasma			Urin			
	NMN	MN	MTY	NE	EPI	DA	GK
Threonin	X*	-	-	-	X*	-	-
LysoPC a C16:1	-	-	-	-	-	-	-
PC ae C30:2	-	-	-	-	-	-	-
SM (OH) C14:1	-	-	-	-	-	-	-
H1	X*	-	-	X*	-	-	-

Signifikante Korrelationen nach Spearman sind mit X markiert. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; H1= Summe der Hexosen; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin; LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin, SM= Sphingolipid

### 3.5 Phänotypspezifische metabolomische Veränderungen

In exploratorischen Analysen wurden Subgruppen von Patient\*innen separat untersucht, um etwaige Einflussfaktoren auf die genannten Ergebnisse zu identifizieren.

#### 3.5.1 Kohortenkollektiv

Um metabolomische Auswirkungen des sekretorischen Phänotyps zu charakterisieren, wurden die 15 Patient\*innen mit einem adrenergen sowie die 21 Patient\*innen mit einem noradrenergen PPGL mit nach Alter und Geschlecht gematchten Personen aus der Kontrollgruppe verglichen (Tabelle 15). In der Kohorte der PPGL mit adrenergen Phänotyp befinden sich neun (60 %) Frauen, keine extraadrenalen und drei (20 %) maligne Tumore. Bei Probanden mit noradrenergem Phänotyp sind dahingegen acht (38 %) weiblich. Weiterhin sind hier sieben (33 %) der Tumore extraadrenal lokalisiert und acht (38 %) maligne. Das Alter zum Zeitpunkt der Urinprobe ist für die Gruppe mit adrenergem und noradrenergem Phänotyp zwischen PPGL und Kontrollen vergleichbar ( $p=0.742$  und  $p=0.798$ ). Auch das Alter bei der Plasmaentnahme zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (adrenerg  $p=0.838$  und noradrenerg  $p=0.753$ ).

**Tabelle 15: Charakterisierung des Patientenkollektivs nach sekretorischem Phänotyp**

	Adrenerg		Noradrenerg	
	PPGL	Kontrollen	PPGL	Kontrollen
Patient*innen, n	15	15	21	21
Frauen, n (%)	9 (60)	9 (60)	8 (38)	8 (38)
Extraadrenale Tumore, n (%)	0 (0)		7 (33)	
Maligne Tumore, n (%)	3 (20)		8 (38)	
Alter bei Urinprobe in Jahren	51 (43–59)	49 (46–55)	55 (43–64)	55 (47–64)
Alter bei Plasmaprobe in Jahren	50 (41–55)	49 (44–54)	53 (42–62)	53 (44–64)

Alter bei Probenentnahme als Median mit Interquartilenabstand angegeben. Das Alter bei Plasmaprobe war für alle Personen vorhanden. Alter bei Urinprobe bei adrenergem Phänotyp vorhanden für  $n=12$  PPGL und  $n=14$  Kontrollen. Alter bei Urinprobe bei noradrenergem Phänotyp vorhanden für  $n=16$  PPGL und  $n=18$  Kontrollen. PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

### 3.5.2 Adrenerger Phänotyp

Bei alleiniger Betrachtung der Patient\*innen mit einem adrenergen PPGL zeigen sich im Vergleich zu den Kontrollen vier Metabolite signifikant verändert (Tabelle 16). Die Aminosäure Glycin sowie das Glycerophospholipid LysoPC a C20:4 weisen innerhalb der PPGL-Gruppe erhöhte Konzentrationen (Median, IQR in  $\mu\text{mol/l}$ ) auf (221.00, 182.00–373.00 vs. 167.00, 145.00–192.00,  $p=0.007$  sowie 3.99, 3.37–5.18 vs. 3.10, 2.46–4.04,  $p=0.019$ ). Histidin und LysoPC a C28:0 zeigen hingegen verminderte Plasmawerte im Vergleich zu den Kontrollen (69.00, 58.40–76.10 vs. 85.10, 71.30–93.60,  $p=0.004$  und 0.11, 0.08–0.11 vs. 0.13, 0.11–0.14,  $p=0.026$ ). Diese Ergebnisse sind im Anhang 6 in Form einer graphischen Darstellung als Boxplot zu finden.

**Tabelle 16: Signifikante metabolomische Veränderungen bei adrenergem Phänotyp**

Metabolit	$\uparrow/\downarrow$	PPGL-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
		Md	(IQR) in $\mu\text{mol/l}$	Md	(IQR) in $\mu\text{mol/l}$	
Glycin	$\uparrow$	221.00	(182.00–373.00)	167.00	(145.00–192.00)	0.007
Histidin	$\downarrow$	69.00	(58.40–76.10)	85.10	(71.30–93.60)	0.004
LysoPC a C20:4	$\uparrow$	3.99	(3.37–5.18)	3.10	(2.46–4.04)	0.019
LysoPC a C28:0	$\downarrow$	0.11	(0.08–0.11)	0.13	(0.11–0.14)	0.026

Daten als Median (Md) mit Interquartilenabstand (IQR) in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. Der Pfeil zeigt die Erhöhung ( $\uparrow$ ) oder Verminderung ( $\downarrow$ ) der Metabolitenkonzentration in der PPGL-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an. P-Wert mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. LysoPC= Lysophosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

Die Betrachtung etwaiger Korrelationen zwischen den Metaboliten und den Metanephrin- beziehungsweise Katecholaminkonzentrationen im Plasma und Urin ergibt signifikante Zusammenhänge für alle vier Metabolite (Tabelle 17). So zeigt Glycin eine moderate Korrelation mit Metanephrin und Normetanephrin im Plasma ( $r_s=0.490$ ,  $p=0.006$  und  $r_s=0.464$ ,  $p=0.010$ ). Ein Zusammenhang mit den Katecholaminwerten im Urin besteht nicht. Im Gegensatz dazu weist LysoPC a C20:4 keine Korrelationen mit den Metanephrinen im Plasma auf, zeigt jedoch einen positiven signifikanten Zusammenhang mit Noradrenalin und Adrenalin im Urin ( $r_s=0.461$ ,  $p=0.016$  und  $r_s=0.477$ ,  $p=0.012$ ). LysoPC a C28:0 korreliert lediglich negativ mit NMN im Plasma ( $r_s=-0.371$ ,  $p=0.043$ ). Die Aminosäure Histidin zeigt eine moderate bis starke negative Korrelation mit Normetanephrin, Metanephrin und Methoxytyramin im Plasma ( $r_s=-0.597$ ,  $p<0.001$ ,  $r_s=-0.494$ ,  $p=0.006$

und  $r_s = -0.535$ ,  $p = 0.003$ ) sowie mit Noradrenalin, Adrenalin und den Gesamtkatecholaminwerten im Urin ( $r_s = -0.412$ ,  $p = 0.033$ ,  $r_s = -0.499$ ,  $p = 0.008$  und  $r_s = -0.459$ ,  $p = 0.018$ ). Eine detaillierte Übersicht über alle Korrelationen ist im Anhang 7 zu finden.

**Tabelle 17: Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei adrenergem Phänotyp**

Metabolit	Korrelationen						
	Plasma			Urin			
	NMN	MN	MTY	NE	EPI	DA	GK
Glycin	X**	X**	-	-	-	-	-
Histidin	X**	X**	X**	X*	X**	-	X*
LysoPC a C20:4	-	-	-	X*	X*	-	-
LysoPC a C28:0	X*	-	-	-	-	-	-

Signifikante Korrelationen nach Spearman sind mit X markiert. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0.05 signifikant (zweiseitig). \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0.01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; LysoPC= Lysophosphatidylcholin; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

### 3.5.3 Noradrenerger Phänotyp

Die Patient\*innen mit einem noradrenergen PPGL zeigen signifikante metabolomische Veränderungen bei insgesamt vier Metaboliten (Tabelle 18). Darunter befand sich das Acylcarnitin C0, das in der PPGL-Gruppe in verminderter Konzentration (Median, IQR in  $\mu\text{mol/l}$ ) auftritt (35.60, 28.70–41.15 vs. 43.00, 34.05–48.70,  $p = 0.042$ ). Auch die Aminosäuren Asparagin und Threonin zeigen ebenso wie das biogene Amin ADMA erniedrigte Werte in der Gruppe der Patient\*innen mit PPGL (37.20, 32.00–41.95 vs. 42.00, 38.65–48.05,  $p = 0.013$  und 112.00, 96.20–127.50 vs. 133.00, 120.00–151.00,  $p = 0.002$  sowie 0.51, 0.39–0.80 vs. 0.62, 0.55–0.91,  $p = 0.048$ ). Eine graphische Darstellung als Boxplot befindet sich im Anhang 8.

**Tabelle 18: Signifikante metabolomische Veränderungen bei noradrenergem Phänotyp**

Metabolit	PPGL-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
	↑/↓	Md (IQR) in µmol/l	Md (IQR) in µmol/l		
C0	↓	35.60 (28.70–41.15)	43.00 (34.05–48.70)		0.042
Asparagin	↓	37.20 (32.00–41.95)	42.00 (38.65–48.05)		0.013
Threonin	↓	112.00 (96.20–127.50)	133.00 (120.00– 151.00)		0.002
ADMA	↓	0.51 (0.39–0.80)	0.62 (0.55–0.91)		0.048

Daten als Median (Md) mit Interquartilenabstand (IQR) in µmol/l angegeben. Der Pfeil zeigt die Erhöhung (↑) oder Verminderung (↓) der Metabolitenkonzentration in der PPGL-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an. P-Wert mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

Bei Untersuchung der Korrelationen weisen lediglich Threonin und ADMA einen Zusammenhang mit Urin-Katecholaminen beziehungsweise Plasma-Metanephrinen im Urin oder Plasma auf (Tabelle 19). Threonin zeigt eine moderate negative Korrelation mit Normetanephrin und Methoxytyramin im Plasma ( $r_s=-0.344$ ,  $p=0.026$  und  $r_s=-0.351$ ,  $p=0.023$ ) sowie einen moderaten, ebenfalls negativen Zusammenhang mit Noradrenalin und den gesamten Katecholaminwerten im Urin ( $r_s=-0.472$ ,  $p=0.004$  und  $r_s=-0.494$ ,  $p=0.004$ ). ADMA weist eine ebenfalls negative moderate Korrelation mit Noradrenalin im Urin auf ( $r_s=-0.399$ ,  $p=0.018$ ). Für C0 und Asparagin kann kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Eine vollständige Darstellung der Korrelationen ist in Anhang 9 zu finden.

**Tabelle 19: Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei noradrenergem Phänotyp**

Metabolit	Korrelationen						
	Plasma			Urin			
	NMN	MN	MTY	NE	EPI	DA	GK
C0	-	-	-	-	-	-	-
Asparagin	-	-	-	-	-	-	-
Threonin	X*	-	X*	X**	-	-	X**
ADMA	-	-	-	X*	-	-	-

Signifikante Korrelationen nach Spearman sind mit X markiert. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0.01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

### 3.6 Hauptkomponentenanalysen

Um die Frage nach einem möglichen diagnostischen Nutzen des Metabolitenprofils zu beantworten, wurden Hauptkomponentenanalysen in der Gesamtkohorte im Hinblick auf die Diagnose, Malignität und den sekretorischen Phänotyp durchgeführt. Hierbei kann jedoch keine Diskrimination der Gruppen durch die gemessenen Metabolite gezeigt werden (Anhang 10). Weiterhin ergeben Analysen bei alleiniger Betrachtung der Frauen beziehungsweise Männer keine Hinweise auf diskriminierende Parametersets, um geschlechtsspezifisch zwischen PPGL und Kontrollen zu unterscheiden (Anhang 11).

## 4 Diskussion

---

Es ist hinreichend beschrieben, dass Phäochromozytome und Paragangliome durch einen Katecholaminexzess zu einer typischen klinischen Symptomatik sowie einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität der betroffenen Patient\*innen führen (2, 11, 36, 105, 106). Ein Zusammenhang mit erhöhten Blutglukosewerten und PPGL als sekundäre Ursache eines Diabetes mellitus ist ebenfalls etabliert (107-109).

Der genaue Einfluss des Katecholaminexzesses auf den Metabolismus bei PPGL im Vergleich zu tumorfreien Kontrollen ist jedoch bisher weitgehend unbekannt. In kürzlich publizierten Studien untersuchten Erlic et al. (95) sowie Bliziotis et al. (96) das Metabolitenprofil von Patient\*innen mit PPGL vor und nach der operativen Tumorentfernung und konnten signifikante intraindividuelle Unterschiede im prä- und postoperativen Vergleich nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit werden die interindividuellen metabolischen Veränderungen bei Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu PPGL-freien Kontrollen innerhalb einer prospektiven Kohortenstudie mit einem Targeted-Metabolomics Ansatz untersucht. Zwischen beiden Gruppen zeigen sich Histidin, Threonin, LysoPC a C28:0 und die Summe der Hexosen signifikant verändert. Alle vier Metabolite weisen Korrelationen mit Metanephrinen im Plasma beziehungsweise Katecholaminen im Urin auf. Subgruppenanalysen ergeben weiterhin geschlechtsspezifische und phänotypspezifische Veränderungen im Metabolitenprofil bei Patient\*innen mit PPGL. Hinweise auf eine diagnostische Wertigkeit des Metabolitenprofils im Hinblick auf eine Diskrimination zwischen PPGL und Kontrollen kann nicht nachgewiesen werden. Die Bedeutung der Ergebnisse im Hinblick auf das Verständnis der Stoffwechsellage bei PPGL und Hinweise für das Risikoprofil bei Patient\*innen mit PPGL wird im Folgenden diskutiert.

### 4.1 PPGL und Veränderungen der Glukosehomöostase

Es ist bekannt, dass Katecholamine über alpha- und beta-Adrenorezeptoren Einfluss auf die Glukosehomöostase nehmen und zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellage führen (110-112). Es wird angenommen, dass es bei PPGL durch den Katecholaminexzess zu einer Beeinträchtigung der Insulinsekretion und dadurch zu einer gestörten

Glukosetoleranz kommt (113, 114). Ein manifester Diabetes mellitus bei Patient\*innen mit einem PPGL wird mit einer Prävalenz von 15-18 % angegeben. Studien mit aktiver Testung auf das Vorliegen eines Diabetes mellitus zeigen sogar eine Prävalenz von 21-37 % (107). In der vorliegenden Studie war bei sechs Patient\*innen (17%) ein Diabetes mellitus als Nebendiagnose vorbekannt. Weiterhin ist auch in dieser Arbeit die Konzentration der Summe der Hexosen innerhalb der Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu den Personen der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dieses Ergebnis war im Hinblick auf die Literatur zu erwarten.

Ferner wird ein verringerter Plasmaspiegel von Histidin bei Patient\*innen mit PPGL in der Gesamtgruppe sowie in der Subgruppenanalyse der Frauen und bei PPGL mit adrenergem Phänotyp beobachtet. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Studien von Erlic et al. (95) und Bliziotis et al. (96). Hier zeigen sich bei Patient\*innen mit PPGL präoperativ niedrigere Histidin-Konzentrationen als postoperativ. Erniedrigte Histidin-Level können mit einer Insulinresistenz in Verbindung stehen (115). Weitere Studien, die nicht den Zusammenhang mit einem PPGL untersuchen, beschreiben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen niedrigen Histidin-Konzentrationen und Prädiabetes beziehungsweise Diabetes mellitus Typ 2 (116-118). Hingegen zeigt eine Metaanalyse von Guasch-Ferré et al. keine Assoziation von Histidin mit einem Diabetes mellitus Typ 2 (119).

Es scheinen insbesondere verzweigtkettige Aminosäuren und aromatische Aminosäuren eine relevante Assoziation mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus zu haben (119-121). Mit der Ausnahme von Histidin zeigen diese in der vorliegenden Studie jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patient\*innen mit PPGL und den Kontrollen, bei denen ein PPGL ausgeschlossen wurde. Zusammengenommen mit den Ergebnissen von Erlic et al. (95) scheint es sich um einen zusätzlichen Effekt der PPGL-assoziierten Katecholaminsekretion auf den Stoffwechsel zu handeln, der möglicherweise unabhängig von einem Diabetes vorliegt.

## **4.2 Verringerte Lysophosphatidylcholkonzentrationen als Hinweis auf ein tumoröses Geschehen**

Innerhalb der 83 Glycerophospholipide und 14 Sphingolipide, die in die statistische Auswertung der vorliegenden Studie eingeschlossen wurden, zeigt sich allein LysoPC a

C28:0 bei Patient\*innen mit PPGL signifikant verändert und tritt innerhalb dieser Gruppe in verminderter Konzentration auf. Lysophosphatidylcholine entstehen durch Abspaltung eines Fettsäurerestes via Phospholipase A<sub>2</sub> aus Phosphatidylcholinen (122).

Verringerte Plasmakonzentrationen von LysoPC sind mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen assoziiert und wurden bereits als Befund bei Patient\*innen mit kolorektalen Karzinomen, Brust- sowie Prostatakrebs beschrieben (123-126). Weiterhin ist bei verschiedenen Krebserkrankungen eine Überexpression der Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) bekannt. Diese katalysiert die Umwandlung von LysoPC in PC durch direkte Acylierung mit Acyl-CoA und führt somit zu reduzierten LysoPC-Levels (127).

Ferner ist eine gesteigerte Expression von Autotaxin mit malignen Tumorerkrankungen assoziiert. Autotaxin ist ein Enzym mit Lysophospholipase-D-Aktivität, welches extrazelluläre LysoPC in Lysophosphatidsäuren (LPA) umwandelt. Erhöhte LPA-Level stimulieren wiederum Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese (128). Der genaue Zusammenhang zwischen verringerten LysoPC-Konzentrationen und Krebsrisiko ist jedoch bisher nicht bekannt.

Assoziationen mit PPGL sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch zu beachten, dass in der vorliegenden Studie lediglich LysoPC a C28:0 mit signifikantem Unterschied in der Gesamtgruppe der Patient\*innen mit und ohne PPGL auftritt. Subgruppenanalysen zeigen zwei zusätzliche, verringerte LysoPC innerhalb der PPGL-Gruppe. Allerdings wurden ebenfalls zwei LysoPC mit erhöhter Konzentration nachgewiesen. Eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen verminderten LysoPC-Konzentrationen und PPGL ist somit nur eingeschränkt möglich.

### **4.3 Vermindertes Threonin und Histidin als Hinweis auf Hypoxie-induzierte Tumorgenese**

Die Aminosäuren Histidin und Threonin treten bei Patient\*innen mit PPGL in geringerer Plasmakonzentration auf. Zusätzlich ist eine von beiden auch in jeder Subgruppenanalyse vermindert nachweisbar. Der Abbau von Threonin liefert unter anderem Succinyl-CoA, dessen anaplerotische Wirkung Verluste im Citratzyklus auffüllen kann. Auch Histidin kann über den Abbau zu Glutamat in den Citratzyklus eingehen (129).

Insbesondere bei PPGL mit Mutationen in SDHx-Genen ist eine Störung des Citratzyklus beschrieben, deren Nachweis mittel Metabolit-Profilings bereits als diagnostisches Mittel

beschrieben wurde (94). Es kommt zu einer Akkumulation von Succinat, welches in erhöhter Konzentration als Onkometabolit die Tumorgenese durch die Stabilisierung von HIF<sub>1</sub>α fördert (130). Aktuelle Daten stützen die These, dass HIF-α mittels Aktivierung von (Pseudo)-Hypoxie-Signalwegen ein wichtiger Faktor der Tumorgenese bei PPGL ist und eine Verknüpfung zwischen Cluster 1- sowie Cluster 2-Tumoren darstellt (21).

Die Verbindung zwischen Tumorgenese und Veränderungen im Metabolismus der entarteten Zellen ist ein zentrales Gebiet der Krebsforschung. Mittlerweile geht man davon aus, dass die Aktivierung vieler onkogener Signalwege zu einem veränderten Stoffwechsel in den Tumorzellen führt und somit deren Wachstum und Überleben begünstigt (131). Die (intrazelluläre) Konzentration von Succinat wurde in der vorliegenden Studie nicht bestimmt. Es bleibt daher spekulativ, ob die verminderten Level von Histidin und Threonin Hinweise auf die Störung des Citratzyklus darstellen und die These einer Pseudohypoxie-bedingten Tumorgenese in PPGL unterstützen. Es ist anzumerken, dass andere Aminosäuren mit anaplerotischer Wirkung wie beispielsweise Valin und Isoleucin in dieser Studie zwischen Patient\*innen mit und ohne PPGL keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zeigen.

#### **4.4 Korrelation mit Katecholaminen und Metanephrinen**

In der vorliegenden Studie zeigen sich bei Patient\*innen mit PPGL in vier Metaboliten signifikante Konzentrationsunterschiede im Vergleich zu Kontrollen. Diese Beobachtung steht unter der Annahme, dass die Veränderungen im Metabolitenprofil auf den Katecholaminexzess bei PPGL zurückzuführen sind.

Alle signifikant veränderten Metabolite weisen einen Zusammenhang mit den Metanephrinen im Plasma beziehungsweise den Katecholaminen im Urin auf. Auch eine Vielzahl der Metabolite mit signifikanten Veränderungen in den Subgruppenanalysen zeigen solche Korrelationen. Dies stützt die Hypothese, dass die deutlich erhöhte Katecholaminproduktion bei PPGL zu den metabolomischen Veränderungen beiträgt.

## **4.5 Metabolitenprofil als Hinweis auf erhöhtes kardiovaskuläres Risiko**

Patient\*innen mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom besitzen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen. Neben einer Hypertonie können kardiale Arrhythmien, Schocks, akute Myokardinfarkte und Kardiomyopathien auftreten (2, 132-134). Weiterhin sind bei PPGL Störungen der Endothelfunktion und Verdickungen der Intima/Media beschrieben, welche Einfluss auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen nehmen können (133, 135, 136). Auch das in dieser Studie gemessene Metabolitenprofil bei Patient\*innen mit PPGL weist Assoziationen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen auf. Im Folgenden sollen die bereits oben beschriebenen Veränderungen spezifisch unter dem Blickwinkel des kardiovaskulären Risikos diskutiert werden.

### **4.5.1 Hyperglykämie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen bei PPGL**

Das Metabolitenprofil von Patient\*innen mit PPGL weist eine erhöhte Konzentration der Summe der Hexosen im Plasma auf, wobei bei sechs Patient\*innen ein Diabetes mellitus bekannt war. Eine Hyperglykämie ist insbesondere im Zusammenhang mit Diabetes mellitus als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt (137-140). Exemplarisch zeigt sich in der EpiDREAM Kohorten-Studie (141), dass die Erhöhung der Nüchtern-Plasmaglukose um 1 mmol/l zu einer Risikozunahme von 17% für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse führt. Eine hyperglykämische Stoffwechsellage aktiviert diverse biochemische Signalwege, welche die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen begünstigen. Über die Aktivierung der Proteinkinase C, die erhöhte Produktion von Advanced Glycation Endproducts (AGE) sowie die Stimulation des Polyol- und Hexosaminwegs entsteht oxidativer Stress (142-144). Dieser induziert wiederum endotheliale Dysfunktionen und beschleunigt die Entwicklung von Atherosklerose (145-147). Es ist somit anzunehmen, dass die signifikant erhöhte Plasmakonzentration der Summe der Hexosen innerhalb der Gruppe der Patient\*innen mit einem PPGL im Vergleich zu Patient\*innen, bei denen ein solcher Tumor ausgeschlossen wurde, zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei PPGL beiträgt.

#### **4.5.2 Verminderte Lysophosphatidylcholin-Konzentration als Hinweis auf ein kardiovaskuläres Risikoprofil**

Üblicherweise werden Lysophosphatidylcholone mit einer inflammatorischen sowie atherogenen Wirkung in Verbindung gebracht (148, 149). In mehreren aktuellen Studien wird jedoch überraschenderweise auch ein protektiver Zusammenhang zwischen erhöhten LysoPC-Konzentrationen und kardiovaskulären Risiken gezeigt. Lee et al. (150) beschreiben beispielsweise niedrige LysoPC-Konzentrationen als Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen. Im Rahmen einer Lipidomic-Studie von Stegemann et al. (151) tritt ein inverser Zusammenhang zwischen LysoPC und kardiovaskulären Erkrankungen auf. Auch die Ergebnisse von Ganna et al. (152) weisen in die gleiche Richtung. Im Zuge einer Untargeted-Metabolomics-Studie mit über 1000 Patient\*innen wird hier eine negative Assoziation von LysoPC mit Inflammationsmarkern, dem BMI sowie kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben.

Als möglicher Grund für die verminderte LysoPC-Konzentration wird eine herabgesetzte Aktivität der Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) diskutiert. Diese katalysiert die Bildung von LysoPC enthaltenden Cholesterinestern. Eine erniedrigte LCAT-Aktivität ist wiederum mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (153). Im Rahmen der vorliegenden Studie zeigt sich das Lysophosphatidylcholin LysoPC a C28:0 in signifikant verminderter Konzentration bei der Gruppe der Patient\*innen mit PPGL. Insofern kann dieses Ergebnis ein weiterer Hinweis auf das erhöhte kardiovaskuläre Risikoprofil bei Patient\*innen mit einem Katecholamin-produzierenden Tumor sein. Die 13 weiteren gemessenen Lysophosphatidylcholone zeigen allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den Subgruppenanalysen wird bei PPGL mit adrenergem Phänotyp ebenfalls ein erniedrigte Konzentration von LysoPC a C28:0 nachgewiesen, auch bei alleiniger Betrachtung der Männer mit PPGL zeigt sich für ein weiteres LysoPC, LysoPC a C16:1, eine verminderte Konzentration. Daneben zeigen sich jedoch mit jeweils einem erhöhten LysoPC in der Subgruppe der adrenergen PPGL und der Frauen diskrepante Ergebnisse. Auch hier kann die vermindert gemessene Konzentration dieses Metaboliten lediglich als Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang gedeutet werden.

### **4.5.3 Proinflammatorische Wirkung durch verminderte Histidin-Konzentration**

Ein anti-inflammatorischer Effekt von Histidin ist in der Literatur ausführlich beschrieben (154, 155). Insbesondere im Hinblick auf das kardiovaskuläre System wurde eine protektive Wirkung von Histidin beschrieben. Teilweise ist dies auf die Fähigkeit als Fänger von Hydroxylradikalen und Singulett-Sauerstoff zurückzuführen (155, 156). In einer Studie von Hasegawa et al. (157) zeigt sich eine Hemmung der endothelialen Inflammation in menschlichen Koronararterienzellen durch Histidin. Die Aminosäure inhibiert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells). Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Aktivierung von Endothelzellen beteiligt und spielt eine Rolle bei der Pathogenese von Atherosklerose. Zusätzlich hemmt Histidin die CD62E-Expression sowie die Interleukin-6-Produktion (158, 159). Überdies deutet eine Studie von Son et al. (160) mit intestinalen Epithelzellen darauf hin, dass Histidin die durch Wasserstoffperoxid und TNF-alpha induzierte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 hemmt und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung besitzt. Weiterhin wurde bei Patient\*innen mit einer chronischen Nierenerkrankung eine Assoziation zwischen niedrigen Histidin-Konzentrationen im Plasma und kardiovaskulären Erkrankungen gefunden (161).

In der vorliegenden Studie tritt die Aminosäure Histidin in der Gesamtgruppe der Patient\*innen mit PPGL sowie in den Subgruppen der Frauen und der PPGL mit adrenergem Phänotyp in signifikant verminderter Konzentration auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Studie von Erlic et al. (95) und Bliziotis (96). Hier findet sich bei Patient\*innen mit PPGL präoperativ eine niedrigere Histidin-Konzentration als nach der operativen Tumorentfernung. Ob und inwiefern die geringere Konzentration von Histidin bei Patient\*innen mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko dieses Patientenkollektivs beiträgt, benötigt weitere Untersuchungen.

## **4.6 Limitationen der Studie**

Die vorliegende Studie weist Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Obgleich 36 Patient\*innen mit PPGL und 36 nach Geschlecht und Alter bei Probenentnahme gematchte Kontrollen in die Untersuchungen eingeschlossen werden konnten,

ist die Größe der Stichprobe klein. Die Gruppengröße wird durch die monozentrische Rekrutierung der Proband\*innen sowie die geringe Inzidenz der Erkrankung begrenzt. Insbesondere für Subgruppenanalysen stellt die geringe Stichprobengröße eine maßgebliche Limitation dar.

Die Personen der Kontrollgruppe entstammen ebenso wie die Patient\*innen mit PPGL dem Kollektiv der PMT-Studie. Somit gab es auch bei den Kontrollen zunächst den Verdacht auf ein PPGL, der zu dem Einschluss in die PMT-Studie führte. So wurden neun Kontrollen aufgrund klinischer Symptome und sechs mit einer therapieresistenten Hypertonie in das Kollektiv aufgenommen. Daraus könnte sich ein Selektionsbias ergeben. Dies würde dementsprechend Rückschlüsse auf die Normalbevölkerung einschränken. Zusätzlich können die Ergebnisse durch Komorbiditäten wie Diabetes mellitus oder die Einnahme von Medikamenten, die Wechselwirkungen mit Adrenorezeptoren aufweisen, beeinflusst werden.

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte unter standardisierten Bedingungen auf Grundlage des PMT-Protokolls, mit dem Ziel, mögliche Einflüsse auf die Messung der Metanephrine zu minimieren. Präanalytische Einflussfaktoren für die Messung der Metabolite wurden bei der Probengewinnung nicht speziell berücksichtigt. So wurden bekannte Faktoren mit Auswirkungen auf das Metabolitenprofil, wie beispielsweise Blutcholesterin und Nikotinabusus, im Voraus nicht erfasst (162, 163). Auch Fettleibigkeit kann bekanntermaßen metabolomische Daten beeinflussen (164). Die Gruppen unterscheiden sich in dieser Studie signifikant anhand ihres BMI, wobei die PPGL-Gruppe erhöhte Werte aufweist. Jedoch befindet sich der mediane BMI bei beiden Gruppen im Bereich des Übergewichts unterhalb der Grenze für Adipositas (165). Andere etablierte Variablen mit Effekt auf das Ergebnis in metabolomischen Studien konnten ausgeschlossen werden. So wurden die Proband\*innen der Kontrollgruppe nach Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme gematcht (166, 167). Weiterhin wurde das Blut bei allen Personen morgens und somit zur selben Tageszeit entnommen (168).

## **4.7 Ausblick**

Die vorliegende Studie zeigt, dass das Metabolitenprofil von Patient\*innen mit PPGL in der untersuchten Stichprobe signifikante Unterschiede zu Personen ohne einen solchen Katecholamin-produzierenden Tumor aufweist. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Übertragung auf die Gesamtbevölkerung zu prüfen, wäre eine

weiterführende Studie mit einer größeren Kohorte erforderlich. Die geringe Inzidenz von PPGL stellt dabei jedoch eine Herausforderung dar.

Weiterhin zeigt das Metabolitenprofil Veränderungen, die Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil geben. Diese Erkenntnisse ließen sich durch eine detaillierte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen und weiterer Auswirkungen ergänzen. Insbesondere bei Patient\*innen mit malignem PPGL, für die eine Heilung durch operative Strategien nicht möglich ist, sind die durch den Katecholaminexzess bedingten Folgeerkrankungen von Interesse. Hier wäre eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Metabolitenprofil bei malignen PPGL und den im Verlauf auftretenden kardiovaskulären Erkrankungen denkbar, um Risikopatient\*innen zu identifizieren und gegebenenfalls gezielte klinische Verlaufskontrollen zur Reduktion von kardiovaskulären Komplikationen zu etablieren.

## 5 Zusammenfassung

---

Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene, katecholaminproduzierende, neuroendokrine Tumore des chromaffinen Gewebes. Phäochromozytome beschreiben hierbei Raumforderungen des Nebennierenmarks, wohingegen Paragangliome eine extra-adrenale Tumormanifestation bezeichnen. Die Erkrankung ist durch die Überproduktion von Katecholaminen gekennzeichnet und kann lebensbedrohliche Folgen haben. Ob und auf welche Weise der Katecholaminexzess die Stoffwechselfvorgänge beeinflusst, ist bisher weitgehend unbekannt. Die Analyse der Metabolite eines Organismus wird als Metabolomik (engl.: metabolomics) bezeichnet. Targeted Metabolomics beschreibt die Messung und Quantifizierung von im Voraus definierten Metaboliten in einer Probe. Hauptziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie ist die Untersuchung der individuellen Unterschiede im Metabolitenprofil bei Patient\*innen mit PPGL im Vergleich zu Kontrollen. Hierfür wurden mittels eines Targeted Metabolomics-Ansatzes Plasma-proben von 36 Patient\*innen mit PPGL und 36 nach Geschlecht und Alter bei Probenentnahme gematchten Kontrollen mittels einer Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung analysiert. Von den 188 gemessenen Metaboliten zeigen vier Metabolite eine signifikante Veränderung zwischen den Gruppen (Histidin  $p=0.004$ , Threonin  $p=0.008$ , LysoPC a C28:0  $p=0.044$ , Summe der Hexosen  $p=0.018$ ). Für alle ist ein Zusammenhang mit Katecholaminen im Urin beziehungsweise Metanephrinen im Plasma nachweisbar. Subgruppenanalysen ergeben für Frauen ( $n=17$ ) und Männer jeweils fünf signifikant veränderte Metabolite sowie je vier Metabolite bei adrenergem ( $n=15$ ) und noradrenergem Phänotyp. Eine Differenzierung der Gruppen anhand des Metabolitenprofils als Hinweis auf diagnostische Marker ist nicht möglich. Es wird jedoch gezeigt, dass Phäochromozytome und Paragangliome zu signifikanten Veränderungen im Plasmametabolom führen. Inwieweit die veränderten Metabolite Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil geben, bleibt zu diskutieren. Die größte Limitation der Studie besteht in dem geringen Stichprobenumfang. Eine Studie mit einer größeren Kohorte wäre daher wünschenswert, auch wenn dies durch das seltene Auftreten der Erkrankung erschwert wird.

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. DeLellis RA LR, Heitz PU, Eng C. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs (IARC WHO Classification of Tumours). Lyon, France: World Health Organization; 2004.
2. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet*. 2005;366(9486):665-75.
3. Whalen RK, Althausen AF, Daniels GH. Extra-adrenal pheochromocytoma. *J Urol*. 1992;147(1):1-10.
4. Neumann HPH, Young WF, Jr., Eng C. Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N Engl J Med*. 2019;381(6):552-65.
5. Sinclair AM, Isles CG, Brown I, Cameron H, Murray GD, Robertson JW. Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch Intern Med*. 1987;147(7):1289-93.
6. Anderson GH, Jr., Blakeman N, Streeten DH. The effect of age on prevalence of secondary forms of hypertension in 4429 consecutively referred patients. *J Hypertens*. 1994;12(5):609-15.
7. Ariton M, Juan CS, AvRuskin TW. Pheochromocytoma: clinical observations from a Brooklyn tertiary hospital. *Endocr Pract*. 2000;6(3):249-52.
8. Platts JK, Drew PJ, Harvey JN. Death from pheochromocytoma: lessons from a post-mortem survey. *J R Coll Physicians Lond*. 1995;29(4):299-306.
9. McNeil AR, Blok BH, Koelmeyer TD, Burke MP, Hilton JM. Pheochromocytomas discovered during coronial autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland. *Aust N Z J Med*. 2000;30(6):648-52.
10. Lo CY, Lam KY, Wat MS, Lam KS. Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *Am J Surg*. 2000;179(3):212-5.
11. Lenders JWM, Eisenhofer G. Update on Modern Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2017;32(2):152-61.
12. Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, Ejaz S, Habra MA, Rich T, et al. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):717-25.
13. Tischler AS. Pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma: updates. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1272-84.
14. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo AP. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):101-11.
15. Dahia PL. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):108-19.

16. Welander J, Soderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(6):R253-76.
17. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama*. 2004;292(8):943-51.
18. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J, et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):3822-8.
19. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res*. 2003;63(17):5615-21.
20. Nölting S, Ullrich M, Pietzsch J, Ziegler CG, Eisenhofer G, Grossman A, et al. Current Management of Pheochromocytoma/Paraganglioma: A Guide for the Practicing Clinician in the Era of Precision Medicine. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1505.
21. Jochmanova I, Yang C, Zhuang Z, Pacak K. Hypoxia-inducible factor signaling in pheochromocytoma: turning the rudder in the right direction. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(17):1270-83.
22. Jochmanová I, Zelinka T, Widimský J, Jr., Pacak K. HIF signaling pathway in pheochromocytoma and other neuroendocrine tumors. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 2:S251-62.
23. Jochmanova I, Pacak K. Genomic Landscape of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Trends Cancer*. 2018;4(1):6-9.
24. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell*. 2017;31(2):181-93.
25. Lenders JW, Eisenhofer G. Pathophysiology and diagnosis of disorders of the adrenal medulla: focus on pheochromocytoma. *Compr Physiol*. 2014;4(2):691-713.
26. Därr R, Lenders JW, Hofbauer LC, Naumann B, Bornstein SR, Eisenhofer G. Pheochromocytoma - update on disease management. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2012;3(1):11-26.
27. Yucha C, Blakeman N. Pheochromocytoma. The great mimic. *Cancer Nurs*. 1991;14(3):136-40.
28. Kebebew E, Duh QY. Benign and malignant pheochromocytoma: diagnosis, treatment, and follow-Up. *Surg Oncol Clin N Am*. 1998;7(4):765-89.
29. Karagiannis A, Mikhailidis DP, Athyros VG, Harsoulis F. Pheochromocytoma: an update on genetics and management. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(4):935-56.
30. Manger WM. The protean manifestations of pheochromocytoma. *Horm Metab Res*. 2009;41(9):658-63.

31. Mannelli M, Lenders JW, Pacak K, Parenti G, Eisenhofer G. Subclinical pheochromocytoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(4):507-15.
32. Whitelaw BC, Prague JK, Mustafa OG, Schulte KM, Hopkins PA, Gilbert JA, et al. Pheochromocytoma [corrected] crisis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80(1):13-22.
33. Bergland BE. Pheochromocytoma presenting as shock. *Am J Emerg Med.* 1989;7(1):44-8.
34. Brouwers FM, Lenders JW, Eisenhofer G, Pacak K. Pheochromocytoma as an endocrine emergency. *Rev Endocr Metab Disord.* 2003;4(2):121-8.
35. Zhang R, Gupta D, Albert SG. Pheochromocytoma as a reversible cause of cardiomyopathy: Analysis and review of the literature. *Int J Cardiol.* 2017;249:319-23.
36. Prejbisz A, Lenders JW, Eisenhofer G, Januszewicz A. Cardiovascular manifestations of pheochromocytoma. *J Hypertens.* 2011;29(11):2049-60.
37. Brouwers FM, Eisenhofer G, Lenders JW, Pacak K. Emergencies caused by pheochromocytoma, neuroblastoma, or ganglioneuroma. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006;35(4):699-724, viii.
38. Cohen CD, Dent DM. Pheochromocytoma and acute cardiovascular death (with special reference to myocardial infarction). *Postgrad Med J.* 1984;60(700):111-5.
39. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1915-42.
40. Eisenhofer G, Prejbisz A, Peitzsch M, Pamporaki C, Masjkur J, Rogowski-Lehmann N, et al. Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites. *Clin Chem.* 2018;64(11):1646-56.
41. Eisenhofer G, Keiser H, Friberg P, Mezey E, Huynh TT, Hiremagalur B, et al. Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):2175-85.
42. Eisenhofer G, Friberg P, Pacak K, Goldstein DS, Murphy DL, Tsigos C, et al. Plasma metadrenalines: do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? *Clin Sci (Lond).* 1995;88(5):533-42.
43. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(3):297-311.
44. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *Jama.* 2002;287(11):1427-34.
45. Deutschbein T, Unger N, Jaeger A, Broecker-Preuss M, Mann K, Petersenn S. Influence of various confounding variables and storage conditions on metanephrine and normetanephrine levels in plasma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;73(2):153-60.

46. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, Friberg P, Lenders JW, Keiser HR, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2656-66.
47. Neary NM, King KS, Pacak K. Drugs and pheochromocytoma--don't be fooled by every elevated metanephrine. *N Engl J Med.* 2011;364(23):2268-70.
48. Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, Bornstein SR, Friberg P, Milosevic D, et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *Eur J Cancer.* 2012;48(11):1739-49.
49. Eisenhofer G, Lenders JW, Timmers H, Mannelli M, Grebe SK, Hofbauer LC, et al. Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma. *Clin Chem.* 2011;57(3):411-20.
50. Welch TJ, Sheedy PF, 2nd, van Heerden JA, Sheps SG, Hattery RR, Stephens DH. Pheochromocytoma: value of computed tomography. *Radiology.* 1983;148(2):501-3.
51. Berglund AS, Hulthén UL, Manhem P, Thorsson O, Wollmer P, Törnquist C. Metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy and computed tomography (CT) in clinical practice. Primary and secondary evaluation for localization of phaeochromocytomas. *J Intern Med.* 2001;249(3):247-51.
52. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Platt JF, Dunnick NR, et al. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology.* 2002;222(3):629-33.
53. Sahdev A, Sohaib A, Monson JP, Grossman AB, Chew SL, Reznick RH. CT and MR imaging of unusual locations of extra-adrenal paragangliomas (pheochromocytomas). *Eur Radiol.* 2005;15(1):85-92.
54. Timmers HJ, Kozupa A, Chen CC, Carrasquillo JA, Ling A, Eisenhofer G, et al. Superiority of fluorodeoxyglucose positron emission tomography to other functional imaging techniques in the evaluation of metastatic SDHB-associated pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Oncol.* 2007;25(16):2262-9.
55. Mamede M, Carrasquillo JA, Chen CC, Del Corral P, Whatley M, Ilias I, et al. Discordant localization of 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in 6-[18F]-fluorodopamine- and [(123)I]-metaiodobenzylguanidine-negative metastatic pheochromocytoma sites. *Nucl Med Commun.* 2006;27(1):31-6.
56. Timmers HJ, Eisenhofer G, Carrasquillo JA, Chen CC, Whatley M, Ling A, et al. Use of 6-[18F]-fluorodopamine positron emission tomography (PET) as first-line investigation for the diagnosis and localization of non-metastatic and metastatic phaeochromocytoma (PHEO). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(1):11-7.
57. Timmers HJ, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Havekes B, et al. Comparison of 18F-fluoro-L-DOPA, 18F-fluoro-deoxyglucose, and 18F-fluorodopamine PET and 123I-MIBG scintigraphy in the localization of pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4757-67.

58. Toledo RA, Dahia PL. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22(3):169-79.
59. Agarwal G, Sadacharan D, Aggarwal V, Chand G, Mishra A, Agarwal A, et al. Surgical management of organ-contained unilateral pheochromocytoma: comparative outcomes of laparoscopic and conventional open surgical procedures in a large single-institution series. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397(7):1109-16.
60. Janetschek G, Finkenstedt G, Gasser R, Waibel UG, Peschel R, Bartsch G, et al. Laparoscopic surgery for pheochromocytoma: adrenalectomy, partial resection, excision of paragangliomas. *J Urol.* 1998;160(2):330-4.
61. Vargas HI, Kavoussi LR, Bartlett DL, Wagner JR, Venzon DJ, Fraker DL, et al. Laparoscopic adrenalectomy: a new standard of care. *Urology.* 1997;49(5):673-8.
62. Jaroszewski DE, Tessier DJ, Schlinkert RT, Grant CS, Thompson GB, van Heerden JA, et al. Laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(12):1501-4.
63. Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, Bornstein SR, Gimenez-Roqueplo AP, Grossman AB, et al. Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(2):92-102.
64. Pacak K. Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4069-79.
65. van der Zee PA, de Boer A. Pheochromocytoma: a review on preoperative treatment with phenoxybenzamine or doxazosin. *Neth J Med.* 2014;72(4):190-201.
66. Buitenwerf E, Osinga TE, Timmers H, Lenders JWM, Feelders RA, Eekhoff EMW, et al. Efficacy of  $\alpha$ -Blockers on Hemodynamic Control during Pheochromocytoma Resection: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(7):2381-91.
67. Amar L, Lussey-Lepoutre C, Lenders JW, Djadi-Prat J, Plouin PF, Steichen O. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Recurrence or new tumors after complete resection of pheochromocytomas and paragangliomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(4):R135-45.
68. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.* 2002;48(1-2):155-71.
69. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):263-9.
70. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):373-8.
71. Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature.* 2008;451(7181):949-52.

72. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D608-d17.
73. Klupczynska A, Derezinski P, Kokot ZJ. METABOLOMICS IN MEDICAL SCIENCES--TRENDS, CHALLENGES AND PERSPECTIVES. *Acta Pol Pharm.* 2015;72(4):629-41.
74. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):431-40.
75. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 30:Unit 30.2.1-24.
76. Vinayavekhin N, Saghatelian A. Untargeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010;Chapter 30:Unit 30.1.1-24.
77. Klepacki J, Klawitter J, Klawitter J, Karimpour-Fard A, Thurman J, Ingle G, et al. Amino acids in a targeted versus a non-targeted metabolomics LC-MS/MS assay. Are the results consistent? *Clin Biochem.* 2016;49(13-14):955-61.
78. Bingol K, Brüsweiler R. Two elephants in the room: new hybrid nuclear magnetic resonance and mass spectrometry approaches for metabolomics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(5):471-7.
79. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review.* 1946;69(1-2):37-8.
80. Markley JL, Brusweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;43:34-40.
81. Fan TW, Lane AN. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2016;92-93:18-53.
82. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst.* 2012;8(2):470-81.
83. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115(9):559-70.
84. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25435-42.
85. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell.* 2018;173(4):822-37.
86. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007;26(1):51-78.
87. Hartmann C, Radermacher P, Wepler M, Nussbaum B. Non-Hemodynamic Effects of Catecholamines. *Shock.* 2017;48(4):390-400.
88. Bearn AG, Billing B, Sherlock S. The effect of adrenaline and noradrenaline on hepatic blood flow and splanchnic carbohydrate metabolism in man. *J Physiol.* 1951;115(4):430-41.

89. Gjedsted J, Buhl M, Nielsen S, Schmitz O, Vestergaard ET, Tonnesen E, et al. Effects of adrenaline on lactate, glucose, lipid and protein metabolism in the placebo controlled bilaterally perfused human leg. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;202(4):641-8.
90. Steinberg D, Nestel PJ, Buskirk ER, Thompson RH. CALORIGENIC EFFECT OF NOREPINEPHRINE CORRELATED WITH PLASMA FREE FATTY ACID TURNOVER AND OXIDATION. *J Clin Invest*. 1964;43:167-76.
91. Imperiale A, Moussallieh FM, Roche P, Battini S, Cicek AE, Sebag F, et al. Metabolome profiling by HRMAS NMR spectroscopy of pheochromocytomas and paragangliomas detects SDH deficiency: clinical and pathophysiological implications. *Neoplasia*. 2015;17(1):55-65.
92. Rao JU, Engelke UF, Sweep FC, Pacak K, Kusters B, Goudswaard AG, et al. Genotype-specific differences in the tumor metabolite profile of pheochromocytoma and paraganglioma using untargeted and targeted metabolomics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(2):E214-22.
93. Richter S, Geldon L, Pang Y, Peitzsch M, Huynh T, Leton R, et al. Metabolome-guided genomics to identify pathogenic variants in isocitrate dehydrogenase, fumarate hydratase, and succinate dehydrogenase genes in pheochromocytoma and paraganglioma. *Genet Med*. 2019;21(3):705-17.
94. Wallace PW, Conrad C, Brückmann S, Pang Y, Caleiras E, Murakami M, et al. Metabolomics, machine learning and immunohistochemistry to predict succinate dehydrogenase mutational status in pheochromocytomas and paragangliomas. *J Pathol*. 2020;251(4):378-87.
95. Erlic Z, Kurlbaum M, Deutschbein T, Nölting S, Prejbisz A, Timmers H, et al. Metabolic impact of pheochromocytoma/paraganglioma: targeted metabolomics in patients before and after tumor removal. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(6):647-57.
96. Bliziotis NG, Kluijtmans LAJ, Soto S, Tinnevelt GH, Langton K, Robledo M, et al. Pre- versus post-operative untargeted plasma nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine*. 2022;75(1):254-65.
97. März J, Kurlbaum M, Roche-Lancaster O, Deutschbein T, Peitzsch M, Prehn C, et al. Plasma Metabolome Profiling for the Diagnosis of Catecholamine Producing Tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:722656.
98. Pamporaki C, Hamplova B, Peitzsch M, Prejbisz A, Beuschlein F, Timmers H, et al. Characteristics of Pediatric vs Adult Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(4):1122-32.
99. Peitzsch M, Prejbisz A, Kroiss M, Beuschlein F, Arlt W, Januszewicz A, et al. Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic pheochromocytoma. *Ann Clin Biochem*. 2013;50(Pt 2):147-55.

100. Peitzsch M, Pelzel D, Glockner S, Prejbisz A, Fassnacht M, Beuschlein F, et al. Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. *Clin Chim Acta*. 2013;418:50-8.
101. Peitzsch M, Adaway JE, Eisenhofer G. Interference from 3-O-methyldopa with ultra-high performance LC-MS/MS measurements of plasma metanephrines: chromatographic separation remains important. *Clin Chem*. 2015;61(7):993-6.
102. Zukunft S, Sorgenfrei M, Prehn C, G. M, Adamski J. Targeted Metabolomics of Dried Blood Spot Extracts. *Chromatographia*. 2013:1295-305.
103. Siskos AP, Jain P, Romisch-Margl W, Bennett M, Achaintre D, Asad Y, et al. Interlaboratory Reproducibility of a Targeted Metabolomics Platform for Analysis of Human Serum and Plasma. *Anal Chem*. 2017;89(1):656-65.
104. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates; 1988.
105. Stolk RF, Bakx C, Mulder J, Timmers HJ, Lenders JW. Is the excess cardiovascular morbidity in pheochromocytoma related to blood pressure or to catecholamines? *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):1100-6.
106. Prejbisz A, Lenders JW, Eisenhofer G, Januszewicz A. Mortality associated with phaeochromocytoma. *Horm Metab Res*. 2013;45(2):154-8.
107. Erlic Z, Beuschlein F. Metabolic Alterations in Patients with Pheochromocytoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(2-03):129-36.
108. Stenström G, Sjöström L, Smith U. Diabetes mellitus in phaeochromocytoma. Fasting blood glucose levels before and after surgery in 60 patients with phaeochromocytoma. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1984;106(4):511-5.
109. La Batide-Alanore A, Chatellier G, Plouin PF. Diabetes as a marker of pheochromocytoma in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2003;21(9):1703-7.
110. Rizza RA, Haymond MW, Miles JM, Verdonk CA, Cryer PE, Gerich JE. Effect of alpha-adrenergic stimulation and its blockade on glucose turnover in man. *Am J Physiol*. 1980;238(5):E467-72.
111. Vieira E, Liu YJ, Gylfe E. Involvement of alpha1 and beta-adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse alpha-cell. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004;369(2):179-83.
112. Hamilton A, Zhang Q, Salehi A, Willems M, Knudsen JG, Ringgaard AK, et al. Adrenaline Stimulates Glucagon Secretion by Tpc2-Dependent Ca(2+) Mobilization From Acidic Stores in Pancreatic  $\alpha$ -Cells. *Diabetes*. 2018;67(6):1128-39.
113. Wilber JF, Turtle JR, Crane NA. Inhibition of insulin secretion by a phaeochromocytoma. *Lancet*. 1966;2(7466):733.
114. Komada H, Hirota Y, So A, Nakamura T, Okuno Y, Fukuoka H, et al. Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Before and After Surgical Treatment of Pheochromocytoma or Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3400-5.

115. Feng RN, Niu YC, Sun XW, Li Q, Zhao C, Wang C, et al. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in obese women with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2013;56(5):985-94.
116. Zhang X, Wang Y, Hao F, Zhou X, Han X, Tang H, et al. Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses. *J Proteome Res*. 2009;8(11):5188-95.
117. Zhou Y, Qiu L, Xiao Q, Wang Y, Meng X, Xu R, et al. Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1447-52.
118. Thalacker-Mercer AE, Ingram KH, Guo F, Ilkayeva O, Newgard CB, Garvey WT. BMI, RQ, diabetes, and sex affect the relationships between amino acids and clamp measures of insulin action in humans. *Diabetes*. 2014;63(2):791-800.
119. Guasch-Ferre M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2016;39(5):833-46.
120. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. 2011;17(4):448-53.
121. Pallares-Mendez R, Aguilar-Salinas CA, Cruz-Bautista I, Del Bosque-Plata L. Metabolomics in diabetes, a review. *Ann Med*. 2016;48(1-2):89-102.
122. Löffler G. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9 ed. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Berlin; Heidelberg: Springer; 2014.
123. Zhao Z, Xiao Y, Elson P, Tan H, Plummer SJ, Berk M, et al. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2696-701.
124. Osl M, Dreiseitl S, Pfeifer B, Weinberger K, Klocker H, Bartsch G, et al. A new rule-based algorithm for identifying metabolic markers in prostate cancer using tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*. 2008;24(24):2908-14.
125. Qiu Y, Zhou B, Su M, Baxter S, Zheng X, Zhao X, et al. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8047-61.
126. Taylor LA, Arends J, Hodina AK, Unger C, Massing U. Plasma lysophosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis*. 2007;6:17.
127. Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
128. Benesch MG, Ko YM, McMullen TP, Brindley DN. Autotaxin in the crosshairs: taking aim at cancer and other inflammatory conditions. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2712-27.
129. Röhm K-H. Funktioneller Aminosäurestoffwechsel. 9 ed. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Berlin; Heidelberg: Springer; 2014.

130. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet.* 2005;14(15):2231-9.
131. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
132. Gu YW, Poste J, Kunal M, Schwarcz M, Weiss I. Cardiovascular Manifestations of Pheochromocytoma. *Cardiol Rev.* 2017;25(5):215-22.
133. Galetta F, Franzoni F, Bernini G, Poupak F, Carpi A, Cini G, et al. Cardiovascular complications in patients with pheochromocytoma: a mini-review. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(7):505-9.
134. Zelinka T, Petrak O, Turkova H, Holaj R, Strauch B, Krsek M, et al. High incidence of cardiovascular complications in pheochromocytoma. *Horm Metab Res.* 2012;44(5):379-84.
135. Holaj R, Zelinka T, Wichterle D, Petrak O, Strauch B, Vrankova A, et al. Increased carotid intima-media thickness in patients with pheochromocytoma in comparison to essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2009;23(5):350-8.
136. Vasilev V, Matrozova J, Elenkova A, Vandeva S, Kirilov G, Zacharieva S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and soluble vascular cell adhesion molecule 1(sVCAM-1) as circulating markers for endothelial dysfunction in patients with pheochromocytoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(9):551-5.
137. Elley CR, Kenealy T, Robinson E, Drury PL. Glycated haemoglobin and cardiovascular outcomes in people with Type 2 diabetes: a large prospective cohort study. *Diabet Med.* 2008;25(11):1295-301.
138. Gerstein HC, Pogue J, Mann JF, Lonn E, Dagenais GR, McQueen M, et al. The relationship between dysglycaemia and cardiovascular and renal risk in diabetic and non-diabetic participants in the HOPE study: a prospective epidemiological analysis. *Diabetologia.* 2005;48(9):1749-55.
139. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj.* 2000;321(7258):405-12.
140. Navarro-Perez J, Orozco-Beltran D, Gil-Guillen V, Pallares V, Valls F, Fernandez A, et al. Mortality and cardiovascular disease burden of uncontrolled diabetes in a registry-based cohort: the ESCARVAL-risk study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2018;18(1):180.
141. Anand SS, Dagenais GR, Mohan V, Diaz R, Probstfield J, Freeman R, et al. Glucose levels are associated with cardiovascular disease and death in an international cohort of normal glycaemic and dysglycaemic men and women: the EpiDREAM cohort study. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19(4):755-64.
142. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996;19(3):257-67.

143. Verges B. Is reduction of hyperglycemia associated with a cardiovascular benefit? *Presse Med.* 2018;47(9):764-8.
144. Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2013;19(32):5695-703.
145. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(1):27-39.
146. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-35.
147. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(11):42.
148. Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis.* 2010;208(1):10-8.
149. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr Med Chem.* 2007;14(30):3209-20.
150. Lee YK, Lee DH, Kim JK, Park MJ, Yan JJ, Song DK, et al. Lysophosphatidylcholine, oxidized low-density lipoprotein and cardiovascular disease in Korean hemodialysis patients: analysis at 5 years of follow-up. *J Korean Med Sci.* 2013;28(2):268-73.
151. Stegemann C, Pechlaner R, Willeit P, Langley SR, Mangino M, Mayr U, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation.* 2014;129(18):1821-31.
152. Ganna A, Salihovic S, Sundstrom J, Broeckling CD, Hedman AK, Magnusson PK, et al. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease. *PLoS Genet.* 2014;10(12):e1004801.
153. Duivenvoorden R, Holleboom AG, van den Bogaard B, Nederveen AJ, de Groot E, Hutten BA, et al. Carriers of lecithin cholesterol acyltransferase gene mutations have accelerated atherogenesis as assessed by carotid 3.0-T magnetic resonance imaging [corrected]. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(24):2481-7.
154. Watanabe M, Suliman ME, Qureshi AR, Garcia-Lopez E, Bárány P, Heimbürger O, et al. Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(6):1860-6.
155. Wade AM, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 1998;9(6):308-15.
156. Pisarenko OI. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23(8):627-33.
157. Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, Wakiguchi H, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(2):269-74.

158. Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Nuclear Factor-kappaB Activation as a Pathological Mechanism of Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Adv Clin Chem.* 2015;70:1-30.
159. Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med.* 1994;179(2):503-12.
160. Son DO, Satsu H, Shimizu M. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 2005;579(21):4671-7.
161. Watanabe M, Suliman ME, Qureshi AR, Garcia-Lopez E, Barany P, Heimbürger O, et al. Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(6):1860-6.
162. Hsu PC, Zhou B, Zhao Y, Ressom HW, Cheema AK, Pickworth W, et al. Feasibility of identifying the tobacco-related global metabolome in blood by UPLC-QTOF-MS. *J Proteome Res.* 2013;12(2):679-91.
163. Trabado S, Al-Salameh A, Croixmarie V, Masson P, Corruble E, Fève B, et al. The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173615.
164. Morris C, O'Grada C, Ryan M, Roche HM, Gibney MJ, Gibney ER, et al. The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(4):634-8.
165. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
166. Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, et al. Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age. *PLoS One.* 2014;9(3):e91806.
167. Lawton KA, Berger A, Mitchell M, Milgram KE, Evans AM, Guo L, et al. Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics.* 2008;9(4):383-97.
168. Ang JE, Revell V, Mann A, Mäntele S, Otway DT, Johnston JD, et al. Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. *Chronobiol Int.* 2012;29(7):868-81.

## Anhang

---

- Anhang 1: Übersicht über alle gemessenen Metabolite
- Anhang 2: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei Frauen PPGL vs. Kontrollen
- Anhang 3: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei Frauen und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma
- Anhang 4: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei Männern PPGL vs. Kontrollen
- Anhang 5: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei Männern und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma
- Anhang 6: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei PPGL mit adrenergem Phänotyp vs. Kontrollen
- Anhang 7: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGL mit adrenergem Phänotyp und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma
- Anhang 8: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei PPGL mit noradrenergem Phänotyp vs. Kontrollen
- Anhang 9: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGL mit noradrenergem Phänotyp und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma
- Anhang 10: Hauptkomponentenanalysen der Gesamtkohorte
- Anhang 11: Hauptkomponentenanalysen nach Geschlecht

Anhang 1 : Übersicht über die gemessenen Metabolite

Metabolit	Metabolitenklasse	% < LLOQ	LC-MS/MS	FIA-MS/MS	PPGL - Gruppe		Kontroll - Gruppe		p -Wert
					Median	IQR	Median	IQR	
C0	Acylcarnitine	0%		X	35,6	29,40 – 41,18	37,95	31,55 – 45,78	0,224
C2	Acylcarnitine	1%		X	5,09	3,79 – 7,51	5,80	4,74 – 7,03	0,475
C3	Acylcarnitine	42%		X					
C3-DC (C4-OH)	Acylcarnitine	94%		X					
C3-OH	Acylcarnitine	100%		X					
C3:1	Acylcarnitine	100%		X					
C4	Acylcarnitine	94%		X					
C4:1	Acylcarnitine	100%		X					
C5	Acylcarnitine	99%		X					
C5-DC (C6-OH)	Acylcarnitine	99%		X					
C5-M-DC	Acylcarnitine	99%		X					
C5-OH (C3-DC-M)	Acylcarnitine	99%		X					
C5:1	Acylcarnitine	100%		X					
C5:1-DC	Acylcarnitine	100%		X					
C6 (C4:1-DC)	Acylcarnitine	97%		X					
C6:1	Acylcarnitine	100%		X					
C7-DC	Acylcarnitine	99%		X					
C8	Acylcarnitine	92%		X					
C9	Acylcarnitine	99%		X					
C10	Acylcarnitine	85%		X					
C10:1	Acylcarnitine	81%		X					
C10:2	Acylcarnitine	100%		X					
C12	Acylcarnitine	100%		X					
C12-DC	Acylcarnitine	100%		X					
C12:1	Acylcarnitine	40%		X					
C14	Acylcarnitine	100%		X					

C14:1	Acylcarnitine	14%		X	0,05	0,04 – 0,07	0,05	0,04 – 0,08	0,392
C14:1-OH	Acylcarnitine	99%		X					
C14:2	Acylcarnitine	39%		X	0,02	0,02 – 0,03	0,02	0,02 – 0,03	0,404
C14:2-OH	Acylcarnitine	99%		X					
C16	Acylcarnitine	99%		X					
C16-OH	Acylcarnitine	100%		X					
C16:1	Acylcarnitine	97%		X					
C16:1-OH	Acylcarnitine	97%		X					
C16:2	Acylcarnitine	100%		X					
C16:2-OH	Acylcarnitine	100%		X					
C18	Acylcarnitine	99%		X					
C18:1	Acylcarnitine	0%		X	0,11	0,09 – 0,14	0,11	0,09 – 0,15	0,677
C18:1-OH	Acylcarnitine	100%		X					
C18:2	Acylcarnitine	0%		X	0,03	0,03 – 0,05	0,03	0,03 – 0,05	0,640
Alanin	Aminosäuren	0%	X		343,5	278,50 – 404,75	387,00	311,50 – 485,25	0,092
Arginin	Aminosäuren	1%	X		69,55	53,78 – 94,03	69,90	48,40 – 90,43	0,765
Asparagin	Aminosäuren	0%	X		37,25	31,63 – 42,20	40,55	32,10 – 46,75	0,171
Asparaginsäure	Aminosäuren	36%	X		5,24	3,24 – 9,38	7,78	4,45 – 13,55	0,079
Citrullin	Aminosäuren	0%	X		30,35	25,75 – 34,78	30,90	24,63 – 38,30	0,551
Glutaminsäure	Aminosäuren	0%	X		535	436,75 – 564,50	535,50	469,75 – 633,75	0,581
Glutamin	Aminosäuren	0%	X		100,45	78,13 – 126,50	107,00	81,23 – 170,50	0,414
Glycin	Aminosäuren	0%	X		225,00	192,75 – 291,50	205,00	167,00 – 256,75	0,081
Histidin	Aminosäuren	0%	X		75,40	61,03 – 87,05	86,40	75,63 – 96,35	0,004
Isoleucin	Aminosäuren	0%	X		73,55	60,53 – 81,00	69,20	61,08 – 88,68	0,879
Leucin	Aminosäuren	0%	X		131,00	113,25 – 157,50	135,50	115,50 – 156,00	0,532
Lysin	Aminosäuren	0%	X		207,50	176,00 – 241,75	220,50	191,25 – 256,75	0,383
Methionin	Aminosäuren	0%	X		19,40	16,38 – 22,58	20,30	18,45 – 23,60	0,151
Ornithin	Aminosäuren	0%	X		64,65	55,53 – 82,35	78,40	58,05 – 110,00	0,086

Phenylalanin	Aminosäuren	0%	X		58,85	51,78 – 64,73	59,35	52,43 – 65,63	0,471
Prolin	Aminosäuren	0%	X		189,00	141,75 – 220,25	190,00	153,50 – 260,00	0,398
Serin	Aminosäuren	0%	X		110,50	92,58 – 133,00	108,50	88,70 – 132,75	0,656
Threonin	Aminosäuren	0%	X		105,00	88,58 – 125,00	128,00	93,33 – 147,50	0,008
Tryptophan	Aminosäuren	0%	X		54,85	47,55 – 67,43	59,70	51,85 – 64,53	0,313
Tyrosin	Aminosäuren	0%	X		56,80	48,08 – 69,15	61,80	55,38 – 67,75	0,175
Valin	Aminosäuren	0%	X		233,00	197,25 – 256,25	234,50	201,75 – 269,25	0,408
Ac-Orn	Biogene Amine	71%	X						
ADMA	Biogene Amine	14%	X		0,53	0,41 – 0,82	0,67	0,57 – 0,93	0,056
alpha-AAA	Biogene Amine	86%	X						
c4-OH-Pro	Biogene Amine	100%	X						
Carnosine	Biogene Amine	100%	X						
Creatinine	Biogene Amine	0%	X		65,55	55,33 – 75,08	66,50	59,20 – 81,30	0,464
DOPA	Biogene Amine	100%	X						
Dopamine	Biogene Amine	100%	X						
Histamine	Biogene Amine	100%	X						
Kynurenine	Biogene Amine	0%	X		2,37	1,86 – 2,96	2,48	2,00 – 2,97	0,585
Met-SO	Biogene Amine	100%	X						
Nitro-Tyr	Biogene Amine	100%	X						
PEA	Biogene Amine	100%	X						
Putrescine	Biogene Amine	46%	X						
Sarcosine	Biogene Amine	11%	X		1,84	1,34 – 2,32	1,95	1,32 – 2,66	0,322
SDMA	Biogene Amine	0%	X		0,40	0,32 – 0,47	0,42	0,34 – 0,50	0,510
Serotonin	Biogene Amine	40%	X						
Spermidine	Biogene Amine	63%	X						
Spermine	Biogene Amine	83%	X						
t4-OH-Pro	Biogene Amine	56%	X						
Taurine	Biogene Amine	40%	X						

lysoPC a C14:0	Glyercophospholipide	100%		X					
lysoPC a C16:0	Glyercophospholipide	0%		X	52,30	41,65 – 64,75	56,15	41,83 – 67,95	0,454
lysoPC a C16:1	Glyercophospholipide	0%		X	1,58	1,25 – 2,03	1,70	1,35 – 1,97	0,371
lysoPC a C17:0	Glyercophospholipide	0%		X	0,98	0,69 – 1,08	0,91	0,67 – 1,20	0,727
lysoPC a C18:0	Glyercophospholipide	0%		X	13,30	10,23 – 17,43	14,65	11,48 – 18,78	0,319
lysoPC a C18:1	Glyercophospholipide	0%		X	11,15	9,75 – 14,45	12,50	8,61 – 14,90	0,853
lysoPC a C18:2	Glyercophospholipide	0%		X	13,80	10,70 – 17,33	13,80	9,28 – 18,30	0,817
lysoPC a C20:3	Glyercophospholipide	0%		X	1,24	0,95 – 1,68	1,22	1,01 – 1,68	0,796
lysoPC a C20:4	Glyercophospholipide	0%		X	3,97	3,36 – 5,26	3,63	2,62 – 4,46	0,083
lysoPC a C24:0	Glyercophospholipide	1%		X	0,07	0,06 – 0,08	0,07	0,07 – 0,08	0,689
lysoPC a C26:0	Glyercophospholipide	35%		X	0,08	0,07 – 0,10	0,09	0,07 – 0,11	0,327
lysoPC a C26:1	Glyercophospholipide	39%		X	0,05	0,04 – 0,06	0,05	0,03 – 0,06	0,791
lysoPC a C28:0	Glyercophospholipide	25%		X	0,11	0,10 – 0,12	0,12	0,11 – 0,14	0,044
lysoPC a C28:1	Glyercophospholipide	0%		X	0,19	0,16 – 0,21	0,18	0,14 – 0,23	0,408
PC aa C24:0	Glyercophospholipide	54%		X					
PC aa C26:0	Glyercophospholipide	99%		X					
PC aa C28:1	Glyercophospholipide	0%		X	2,22	1,95 – 2,59	2,32	1,83 – 2,65	0,892
PC aa C30:0	Glyercophospholipide	0%		X	3,46	2,62 – 3,74	3,30	2,44 – 4,55	0,796
PC aa C30:2	Glyercophospholipide	50%		X					
PC aa C32:0	Glyercophospholipide	0%		X	14,65	12,85 – 16,10	13,45	12,10 – 16,85	0,411
PC aa C32:1	Glyercophospholipide	0%		X	17,75	13,13 – 27,20	16,75	13,60 – 28,40	0,848
PC aa C32:2	Glyercophospholipide	0%		X	3,74	2,79 – 4,92	3,78	2,94 – 4,69	0,857
PC aa C32:3	Glyercophospholipide	0%		X	0,43	0,37 – 0,50	0,41	0,33 – 0,53	0,499
PC aa C34:1	Glyercophospholipide	0%		X	233,50	215,00 – 284,50	225,00	195,00 – 289,25	0,669
PC aa C34:2	Glyercophospholipide	0%		X	401,00	360,00 – 433,50	386,00	349,00 – 436,00	0,440
PC aa C34:3	Glyercophospholipide	0%		X	14,85	11,90 – 18,65	14,00	11,85 – 21,73	0,800
PC aa C34:4	Glyercophospholipide	0%		X	1,94	1,33 – 2,38	1,74	1,25 – 2,44	0,933
PC aa C36:0	Glyercophospholipide	0%		X	1,82	1,49 – 2,41	2,03	1,54 – 2,59	0,401

PC aa C36:1	Glyercophospholipide	0%		X	40,50	32,45 – 47,23	40,85	33,90 – 52,33	0,506
PC aa C36:2	Glyercophospholipide	0%		X	204,00	179,25 – 219,75	199,50	172,50 – 244,00	0,600
PC aa C36:3	Glyercophospholipide	0%		X	119,00	101,75 – 142,50	113,50	100,13 – 142,50	0,566
PC aa C36:4	Glyercophospholipide	0%		X	186,50	155,50 – 230,50	179,00	132,00 – 209,75	0,295
PC aa C36:5	Glyercophospholipide	0%		X	23,05	16,35 – 31,40	25,30	15,30 – 32,03	0,955
PC aa C36:6	Glyercophospholipide	0%		X	0,81	0,57 – 1,01	0,78	0,58 – 1,11	0,562
PC aa C38:0	Glyercophospholipide	0%		X	1,79	1,51 – 2,29	1,92	1,54 – 2,33	0,569
PC aa C38:1	Glyercophospholipide	0%		X	0,81	0,61 – 1,04	0,74	0,64 – 0,95	0,660
PC aa C38:3	Glyercophospholipide	0%		X	40,25	31,03 – 47,58	38,60	32,63 – 46,60	0,866
PC aa C38:4	Glyercophospholipide	0%		X	89,55	73,53 – 108,25	87,90	64,48 – 96,83	0,267
PC aa C38:5	Glyercophospholipide	0%		X	45,60	36,05 – 55,48	41,20	32,68 – 52,18	0,241
PC aa C38:6	Glyercophospholipide	0%		X	62,80	50,60 – 71,93	57,85	43,33 – 82,50	0,644
PC aa C40:1	Glyercophospholipide	74%		X					
PC aa C40:2	Glyercophospholipide	0%		X	0,20	0,15 – 0,28	0,20	0,17 – 0,28	0,748
PC aa C40:3	Glyercophospholipide	0%		X	0,39	0,33 – 0,47	0,41	0,34 – 0,46	0,892
PC aa C40:4	Glyercophospholipide	0%		X	2,27	1,93 – 2,78	2,24	2,07 – 2,68	0,919
PC aa C40:5	Glyercophospholipide	0%		X	6,55	5,43 – 7,64	5,87	5,04 – 7,57	0,499
PC aa C40:6	Glyercophospholipide	0%		X	17,70	13,58 – 22,30	17,85	12,60 – 25,35	0,870
PC aa C42:0	Glyercophospholipide	0%		X	0,32	0,25 – 0,42	0,33	0,24 – 0,37	0,593
PC aa C42:1	Glyercophospholipide	0%		X	0,15	0,12 – 0,18	0,16	0,12 – 0,18	0,973
PC aa C42:2	Glyercophospholipide	3%		X	0,14	0,12 – 0,18	0,14	0,11 – 0,17	0,796
PC aa C42:4	Glyercophospholipide	0%		X	0,12	0,09 – 0,15	0,11	0,09 – 0,13	0,604
PC aa C42:5	Glyercophospholipide	0%		X	0,21	0,19 – 0,26	0,22	0,19 – 0,27	0,719
PC aa C42:6	Glyercophospholipide	0%		X	0,26	0,22 – 0,29	0,27	0,20 – 0,32	0,787
PC ae C30:0	Glyercophospholipide	0%		X	0,28	0,23 – 0,32	0,29	0,21 – 0,40	0,371
PC ae C30:1	Glyercophospholipide	13%		X	0,07	0,04 – 0,10	0,07	0,03 – 0,11	0,822
PC ae C30:2	Glyercophospholipide	0%		X	0,07	0,06 – 0,08	0,07	0,06 – 0,08	0,681
PC ae C32:1	Glyercophospholipide	0%		X	2,56	2,28 – 2,93	2,56	2,20 – 3,21	0,955

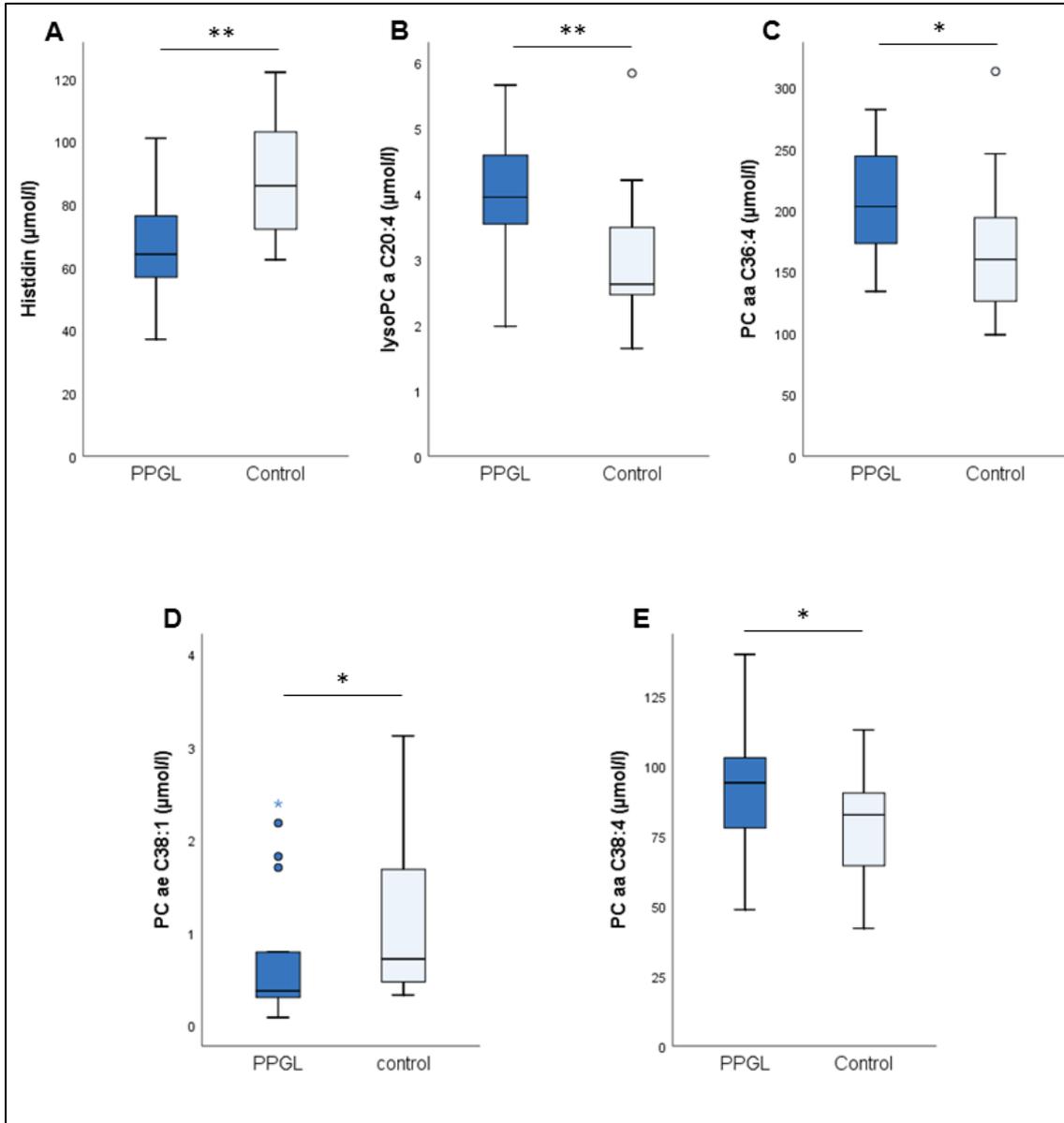
PC ae C32:2	Glyercophospholipide	0%		X	0,66	0,54 – 0,76	0,66	0,57 – 0,80	0,636
PC ae C34:0	Glyercophospholipide	0%		X	1,49	1,21 – 1,65	1,38	1,06 – 1,82	0,731
PC ae C34:1	Glyercophospholipide	0%		X	10,00	8,99 – 11,70	9,67	7,91 – 11,60	0,566
PC ae C34:2	Glyercophospholipide	0%		X	10,05	8,80 – 11,48	10,55	8,83 – 13,45	0,421
PC ae C34:3	Glyercophospholipide	0%		X	5,95	4,71 – 7,69	6,63	5,27 – 7,89	0,547
PC ae C36:0	Glyercophospholipide	0%		X	0,75	0,63 – 0,87	0,78	0,64 – 0,90	0,973
PC ae C36:1	Glyercophospholipide	0%		X	8,10	6,20 – 9,43	7,39	5,93 – 9,75	0,562
PC ae C36:2	Glyercophospholipide	0%		X	12,45	10,65 – 15,18	11,45	9,96 – 15,28	0,660
PC ae C36:3	Glyercophospholipide	0%		X	6,24	5,43 – 7,00	6,68	5,66 – 7,93	0,213
PC ae C36:4	Glyercophospholipide	0%		X	15,60	13,05 – 20,00	16,40	13,08 – 19,88	0,875
PC ae C36:5	Glyercophospholipide	0%		X	10,70	9,36 – 13,95	10,75	8,51 – 13,55	0,558
PC ae C38:0	Glyercophospholipide	0%		X	1,45	1,24 – 1,96	1,63	1,26 – 2,02	0,660
PC ae C38:1	Glyercophospholipide	0%		X	0,41	0,30 – 0,90	0,48	0,41 – 0,86	0,188
PC ae C38:2	Glyercophospholipide	0%		X	1,59	1,17 – 2,09	1,62	1,28 – 2,32	0,765
PC ae C38:3	Glyercophospholipide	0%		X	3,92	3,23 – 5,28	3,91	3,24 – 5,21	0,761
PC ae C38:4	Glyercophospholipide	0%		X	11,30	9,48 – 13,08	10,70	9,10 – 12,30	0,424
PC ae C38:5	Glyercophospholipide	0%		X	14,20	12,03 – 18,23	14,50	12,58 – 17,73	0,740
PC ae C38:6	Glyercophospholipide	0%		X	5,45	4,57 – 7,13	5,89	4,58 – 6,98	0,978
PC ae C40:1	Glyercophospholipide	0%		X	0,92	0,75 – 1,11	0,84	0,76 – 1,03	0,386
PC ae C40:2	Glyercophospholipide	0%		X	1,48	1,17 – 1,97	1,46	1,21 – 1,66	0,550
PC ae C40:3	Glyercophospholipide	0%		X	0,85	0,70 – 1,33	0,97	0,70 – 1,30	0,951
PC ae C40:4	Glyercophospholipide	0%		X	1,89	1,61 – 2,44	1,89	1,56 – 2,28	0,765
PC ae C40:5	Glyercophospholipide	0%		X	2,95	2,36 – 3,83	2,80	2,27 – 3,36	0,395
PC ae C40:6	Glyercophospholipide	0%		X	3,00	2,53 – 3,60	2,96	2,52 – 3,54	0,624
PC ae C42:0	Glyercophospholipide	99%		X					
PC ae C42:1	Glyercophospholipide	3%		X	0,26	0,22 – 0,34	0,26	0,21 – 0,30	0,636
PC ae C42:2	Glyercophospholipide	0%		X	0,41	0,33 – 0,48	0,38	0,31 – 0,47	0,804
PC ae C42:3	Glyercophospholipide	0%		X	0,47	0,39 – 0,61	0,48	0,37 – 0,59	0,901

PC ae C42:4	Glycerophospholipide	0%		X	0,59	0,50 – 0,71	0,60	0,45 – 0,69	0,748
PC ae C42:5	Glycerophospholipide	0%		X	1,53	1,32 – 1,97	1,55	1,34 – 1,84	0,551
PC ae C44:3	Glycerophospholipide	47%		X					
PC ae C44:4	Glycerophospholipide	0%		X	0,23	0,19 – 0,28	0,25	0,19 – 0,29	0,389
PC ae C44:5	Glycerophospholipide	0%		X	1,17	0,87 – 1,33	1,03	0,86 – 1,24	0,220
PC ae C44:6	Glycerophospholipide	0%		X	0,68	0,50 – 0,81	0,60	0,51 – 0,76	0,303
SM (OH) C14:1	Sphingolipide	0%		X	4,63	3,76 – 5,16	4,00	3,30 – 5,15	0,237
SM (OH) C16:1	Sphingolipide	0%		X	2,21	1,88 – 2,71	2,02	1,59 – 2,47	0,224
SM (OH) C22:1	Sphingolipide	0%		X	6,63	5,24 – 8,03	6,35	4,79 – 7,15	0,207
SM (OH) C22:2	Sphingolipide	0%		X	5,55	4,65 – 6,76	5,31	3,97 – 6,23	0,146
SM (OH) C24:1	Sphingolipide	0%		X	0,52	0,45 – 0,69	0,56	0,41 – 0,65	0,875
SM C16:0	Sphingolipide	0%		X	78,50	65,85 – 89,35	75,60	61,40 – 84,03	0,258
SM C16:1	Sphingolipide	0%		X	10,80	9,18 – 11,88	9,94	8,76 – 12,10	0,562
SM C18:0	Sphingolipide	0%		X	15,65	13,43 – 19,35	15,00	13,10 – 17,38	0,330
SM C18:1	Sphingolipide	0%		X	7,43	6,00 – 8,38	6,92	5,40 – 7,66	0,215
SM C20:2	Sphingolipide	0%		X	0,22	0,17 – 0,27	0,20	0,15 – 0,27	0,517
SM C22:3	Sphingolipide	97%		X					
SM C24:0	Sphingolipide	0%		X	10,20	8,64 – 12,15	10,30	8,13 – 12,35	0,620
SM C24:1	Sphingolipide	0%		X	24,15	21,75 – 29,18	25,35	19,23 – 30,55	0,562
SM C26:0	Sphingolipide	0%		X	0,07	0,05 – 0,09	0,07	0,05 – 0,09	0,946
SM C26:1	Sphingolipide	0%		X	0,18	0,15 – 0,24	0,16	0,12 – 0,23	0,398
H1	Summe der Hexosen	0%		X	4844,00	4325,50 – 5364,50	4215,50	3791,00 – 5086,00	0,018

Metabolite, die aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden, sind rot markiert. Signifikant veränderte Metabolite ( $p \leq 0,05$ ) zwischen PPGL und Kontrollen sind gelb markiert. Berechnung des p-Werts mittels Mann-Whitney-U Test.

FIA=flow injection analysis, IQR=Interquartilenabstand, LC=liquid chromatography, LLOQ=lower limit of quantification, MS/MS=Tandem-Massenspektrometrie, PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

## Anhang 2: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei Frauen PPGL vs. Kontrollen



Plasmakonzentrationen für Histidin (A), LysoPC a C20:4 (B), PC aa C36:4 (C), PC ae C38:1 (D) sowie PC aa C38:4 (E). Angabe der Daten in µmol/l.

Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachem Interquartilenbereich sind als Kreise markiert. Extremwerte, die mehr als das 3-fache des IQR vom Kastenende entfernt liegen, sind als Sternchen gekennzeichnet. Ein Extremwert der Kontrollgruppe von PC ae C38:1 bei 14.1 µmol/l ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit \* ( $p < 0.05$ ) und \*\* ( $p < 0.01$ ) gekennzeichnet. PPGL n=17, Kontrollen n=17.

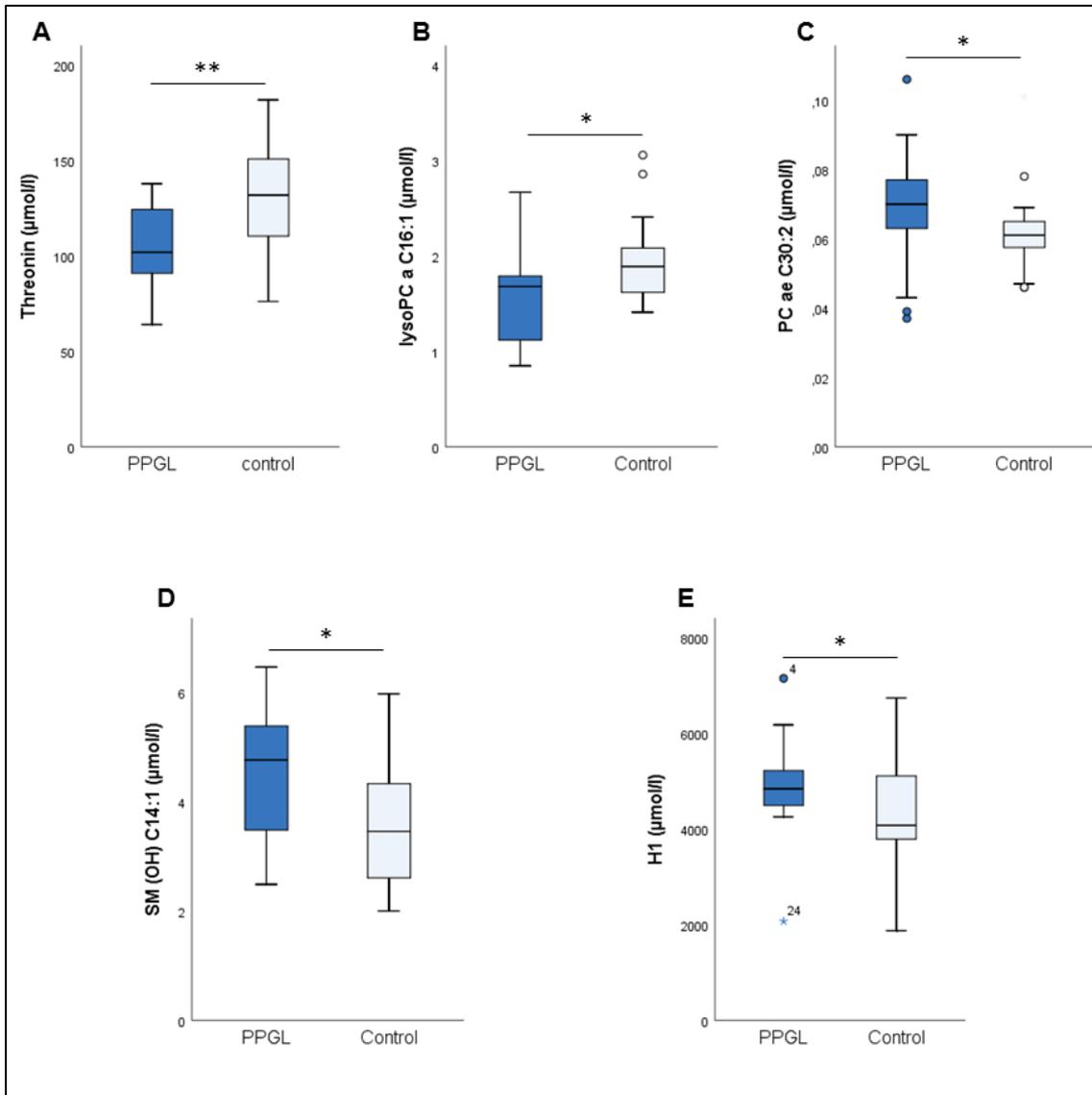
LysoPC=Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

Anhang 3: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei Frauen und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma

		Plasma NMN	Plasma MN	Plasma MTY	Urin NE	Urin EPI	Urin DA	Urin GK	PC ae C38:1	PC aa C38:4	PC aa C36:4	lysoPC a C20:4	Histidin
Plasma NMN	r <sub>s</sub>	1,000	<b>,555**</b>	<b>,765**</b>	<b>,672**</b>	<b>,405*</b>	-0,007	0,345	<b>-,368*</b>	0,325	<b>,356*</b>	<b>,471**</b>	<b>-,428*</b>
	p-Wert		<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,036</b>	0,971	0,078	<b>0,032</b>	0,060	<b>0,039</b>	<b>0,005</b>	<b>0,012</b>
Plasma MN	r <sub>s</sub>	<b>,555**</b>	1,000	<b>,563**</b>	0,234	<b>,619**</b>	0,097	0,246	<b>-,474**</b>	<b>,535**</b>	<b>,514**</b>	0,273	-0,339
	p-Wert	<b>0,001</b>		<b>0,001</b>	0,240	<b>0,001</b>	0,630	0,216	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	0,118	0,050
Plasma MTY	r <sub>s</sub>	<b>,765**</b>	<b>,563**</b>	1,000	<b>,512**</b>	<b>,405*</b>	0,048	0,366	-0,137	<b>,508**</b>	<b>,525**</b>	<b>,438*</b>	-0,301
	p-Wert	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>		<b>0,009</b>	<b>0,044</b>	0,821	0,072	0,453	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,012</b>	0,095
Urin NE	r <sub>s</sub>	<b>,672**</b>	0,234	<b>,512**</b>	1,000	<b>,533**</b>	0,196	<b>,582**</b>	-0,353	0,120	0,117	<b>,537**</b>	-0,364
	p-Wert	<b>0,000</b>	0,240	<b>0,009</b>		<b>0,004</b>	0,327	<b>0,001</b>	0,071	0,550	0,560	<b>0,004</b>	0,062
Urin EPI	r <sub>s</sub>	<b>,405*</b>	<b>,619**</b>	<b>,405*</b>	<b>,533**</b>	1,000	<b>,474*</b>	<b>,606**</b>	<b>-,531**</b>	0,197	0,022	<b>,412*</b>	<b>-,434*</b>
	p-Wert	<b>0,036</b>	<b>0,001</b>	<b>0,044</b>	<b>0,004</b>		<b>0,013</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	0,325	0,913	<b>0,033</b>	<b>0,024</b>
Urin DA	r <sub>s</sub>	-0,007	0,097	0,048	0,196	<b>,474*</b>	1,000	<b>,838**</b>	-0,048	-0,093	-0,256	0,302	-0,294
	p-Wert	0,971	0,630	0,821	0,327	<b>0,013</b>		<b>0,000</b>	0,812	0,643	0,197	0,126	0,137
Urin GK	r <sub>s</sub>	0,345	0,246	0,366	<b>,582**</b>	<b>,606**</b>	<b>,838**</b>	1,000	-0,225	0,002	-0,123	<b>,538**</b>	<b>-,479*</b>
	p-Wert	0,078	0,216	0,072	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>		0,260	0,993	0,540	<b>0,004</b>	<b>0,012</b>
PC ae C38:1	r <sub>s</sub>	<b>-,368*</b>	<b>-,474**</b>	-0,137	-0,353	<b>-,531**</b>	-0,048	-0,225	1,000	-0,298	-0,150	<b>-,354*</b>	0,230
	p-Wert	<b>0,032</b>	<b>0,005</b>	0,453	0,071	<b>0,004</b>	0,812	0,260		0,087	0,397	<b>0,040</b>	0,190
PC aa C38:4	r <sub>s</sub>	0,325	<b>,535**</b>	<b>,508**</b>	0,120	0,197	-0,093	0,002	-0,298	1,000	<b>,856**</b>	<b>,442**</b>	-0,065
	p-Wert	0,060	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	0,550	0,325	0,643	0,993	0,087		<b>0,000</b>	<b>0,009</b>	0,717
PC aa C36:4	r <sub>s</sub>	<b>,356*</b>	<b>,514**</b>	<b>,525**</b>	0,117	0,022	-0,256	-0,123	-0,150	<b>,856**</b>	1,000	0,252	0,023
	p-Wert	<b>0,039</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	0,560	0,913	0,197	0,540	0,397	<b>0,000</b>		0,150	0,896
lysoPC a C20:4	r <sub>s</sub>	<b>,471**</b>	0,273	<b>,438*</b>	<b>,537**</b>	<b>,412*</b>	0,302	<b>,538**</b>	<b>-,354*</b>	<b>,442**</b>	0,252	1,000	-0,180
	p-Wert	<b>0,005</b>	0,118	<b>0,012</b>	<b>0,004</b>	<b>0,033</b>	0,126	<b>0,004</b>	<b>0,040</b>	<b>0,009</b>	0,150		0,309
Histidin	r <sub>s</sub>	<b>-,428*</b>	-0,339	-0,301	-0,364	<b>-,434*</b>	-0,294	<b>-,479*</b>	0,230	-0,065	0,023	-0,180	1,000
	p-Wert	<b>0,012</b>	0,050	0,095	0,062	<b>0,024</b>	0,137	<b>0,012</b>	0,190	0,717	0,896	0,309	

Angabe des Spearman-Korrelationskoeffizienten r<sub>s</sub>. Signifikante Korrelationen sind fett markiert. \* (hellgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* (dunkelgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig). DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

## Anhang 4: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei Männern PPGL vs. Kontrollen



Plasmakonzentrationen für Threonin (A), LysoPC a C16:1 (B), PC ae C30:2 (C), SM (OH) C14:1 (D) sowie Summe der Hexosen, H1 (E). Angabe der Daten in µmol/l.

Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachem Interquartilenbereich sind als Kreise markiert. Signifikante Unterschiede sind mit \* ( $p < 0.05$ ) und \*\* ( $p < 0.01$ ) gekennzeichnet. PPGL n=19, Kontrollen n=19.

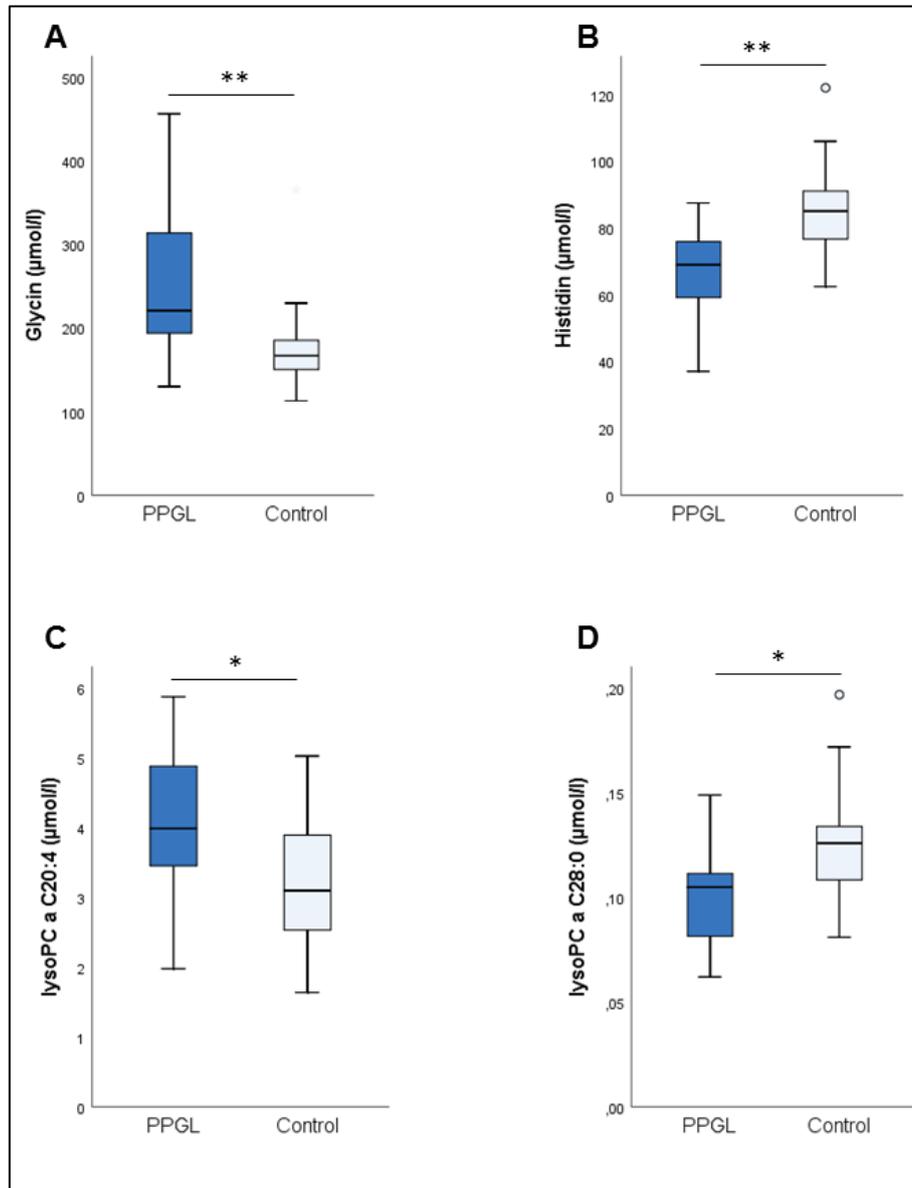
LysoPC=Lysophosphatidylcholin; PC=Phosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome, SM=Sphingolipid

**Anhang 5: Korrelationen zwischen den signifikant  
veränderten Metaboliten bei Männern und den  
Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen  
im Plasma**

		Plasma NMN	Plasma MN	Plasma MTY	Urin NE	Urin EPI	Urin DA	Urin GK	Threo- nin	LysoPC a C16:1	PC ae C30:2	SM (OH) C14:1	H1
Plasma NMN	r <sub>s</sub>	1,000	0,213	<b>,633**</b>	<b>,586**</b>	0,090	0,000	<b>,385*</b>	<b>-,328*</b>	-0,295	0,244	0,266	<b>,381*</b>
	p-Wert		0,200	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,612	1,000	<b>0,032</b>	<b>0,044</b>	0,072	0,140	0,107	<b>0,018</b>
Plasma MN	r <sub>s</sub>	0,213	1,000	0,212	0,081	<b>,580**</b>	0,003	-0,012	-0,206	0,163	-0,168	-0,157	0,068
	p-Wert	0,200		0,201	0,642	<b>0,000</b>	0,988	0,948	0,215	0,329	0,314	0,347	0,686
Plasma MTY	r <sub>s</sub>	<b>,633**</b>	0,212	1,000	0,316	-0,027	-0,038	0,244	-0,226	-0,147	0,071	-0,060	0,306
	p-Wert	<b>0,000</b>	0,201		0,064	0,880	0,837	0,186	0,173	0,380	0,672	0,720	0,062
Urin NE	r <sub>s</sub>	<b>,586**</b>	0,081	0,316	1,000	<b>,361*</b>	<b>,411*</b>	<b>,722**</b>	-0,269	-0,329	0,185	0,071	<b>,425*</b>
	p-Wert	<b>0,000</b>	0,642	0,064		<b>0,036</b>	<b>0,019</b>	<b>0,000</b>	0,118	0,053	0,287	0,685	<b>0,011</b>
Urin EPI	r <sub>s</sub>	0,090	<b>,580**</b>	-0,027	<b>,361*</b>	1,000	<b>,446*</b>	<b>,499**</b>	<b>-,345*</b>	0,042	-0,181	-0,151	-0,020
	p-Wert	0,612	<b>0,000</b>	0,880	<b>0,036</b>		<b>0,012</b>	<b>0,004</b>	<b>0,046</b>	0,813	0,306	0,393	0,911
Urin DA	r <sub>s</sub>	0,000	0,003	-0,038	<b>,411*</b>	<b>,446*</b>	1,000	<b>,845**</b>	-0,085	-0,102	-0,208	-0,253	-0,097
	p-Wert	1,000	0,988	0,837	<b>0,019</b>	<b>0,012</b>		<b>0,000</b>	0,643	0,579	0,254	0,162	0,598
Urin GK	r <sub>s</sub>	<b>,385*</b>	-0,012	0,244	<b>,722**</b>	<b>,499**</b>	<b>,845**</b>	1,000	-0,212	-0,184	-0,040	-0,084	0,206
	p-Wert	<b>0,032</b>	0,948	0,186	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>		0,252	0,322	0,832	0,654	0,265
Threonin	r <sub>s</sub>	<b>-,328*</b>	-0,206	-0,226	-0,269	<b>-,345*</b>	-0,085	-0,212	1,000	0,051	<b>-,414**</b>	<b>-,428**</b>	0,004
	p-Wert	<b>0,044</b>	0,215	0,173	0,118	<b>0,046</b>	0,643	0,252		0,761	<b>0,010</b>	<b>0,007</b>	0,979
LysoPC a C16:1	r <sub>s</sub>	-0,295	0,163	-0,147	-0,329	0,042	-0,102	-0,184	0,051	1,000	-0,239	-0,283	-0,097
	p-Wert	0,072	0,329	0,380	0,053	0,813	0,579	0,322	0,761		0,149	0,085	0,563
PC ae C30:2	r <sub>s</sub>	0,244	-0,168	0,071	0,185	-0,181	-0,208	-0,040	<b>-,414**</b>	-0,239	1,000	<b>,845**</b>	0,120
	p-Wert	0,140	0,314	0,672	0,287	0,306	0,254	0,832	<b>0,010</b>	0,149		<b>0,000</b>	0,475
SM (OH) C14:1	r <sub>s</sub>	0,266	-0,157	-0,060	0,071	-0,151	-0,253	-0,084	<b>-,428**</b>	-0,283	<b>,845**</b>	1,000	0,070
	p-Wert	0,107	0,347	0,720	0,685	0,393	0,162	0,654	<b>0,007</b>	0,085	<b>0,000</b>		0,677
H1	r <sub>s</sub>	<b>,381*</b>	0,068	0,306	<b>,425*</b>	-0,020	-0,097	0,206	0,004	-0,097	0,120	0,070	1,000
	p-Wert	<b>0,018</b>	0,686	0,062	<b>0,011</b>	0,911	0,598	0,265	0,979	0,563	0,475	0,677	

Angabe des Spearman-Korrelationskoeffizienten r<sub>s</sub>. Signifikante Korrelationen sind fett markiert. \* (hellgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* (dunkelgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig). DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

## Anhang 6: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei adrenergem Phänotyp PPGL vs. Kontrollen



Plasmakonzentrationen für Glycin (A), Histidin (B), Lyso PC a C20:4 (C) sowie LysoPC a C28:0 (D). Angabe der Daten in µmol/l.

Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachem Interquartilenbereich sind als Kreise markiert. Signifikante Unterschiede sind mit \* ( $p < 0.05$ ) und \*\* ( $p < 0.01$ ) gekennzeichnet. PPGL n=15, Kontrollen n=15.

LysoPC=Lysophosphatidylcholin; PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

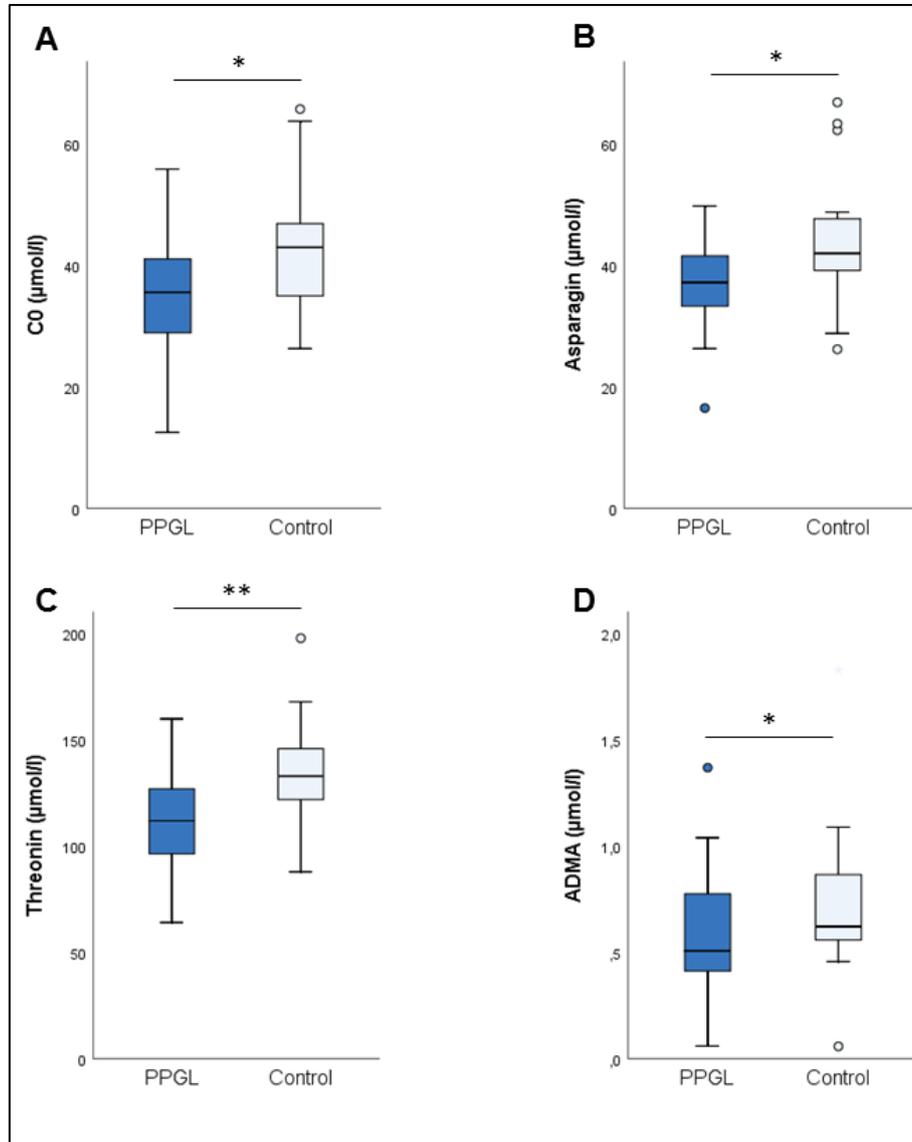
**Anhang 7: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGI mit adrenergem Phänotyp und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephri-  
nen im Plasma**

		Plasma NMN	Plasma MN	Plasma MTY	Urin NE	Urin EPI	Urin DA	Urin GK	Glycin	Histidin	LysoPC a C20:4	LysoPC a C28:0
Plasma NMN	r <sub>s</sub>	1,000	<b>,862**</b>	<b>,684**</b>	<b>,521**</b>	<b>,703**</b>	-0,061	0,279	<b>,464**</b>	<b>-,597**</b>	0,353	<b>-,371*</b>
	p-Wert		<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	0,769	0,168	<b>0,010</b>	<b>0,000</b>	0,056	0,043
Plasma MN	r <sub>s</sub>	<b>,862**</b>	1,000	<b>,675**</b>	0,304	<b>,762**</b>	-0,088	0,199	<b>,490**</b>	<b>-,494**</b>	0,317	-0,236
	p-Wert	<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	0,123	<b>0,000</b>	0,670	0,329	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	0,088	0,210
Plasma MTY	r <sub>s</sub>	<b>,684**</b>	<b>,675**</b>	1,000	0,212	<b>,497*</b>	-0,147	0,117	0,258	<b>-,535**</b>	0,082	-0,336
	p-Wert	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>		0,310	0,012	0,492	0,585	0,186	<b>0,003</b>	0,679	0,080
Urin NE	r <sub>s</sub>	<b>,521**</b>	0,304	0,212	1,000	<b>,676**</b>	0,357	<b>,670**</b>	0,280	<b>-,412*</b>	<b>,461*</b>	-0,345
	p-Wert	<b>0,005</b>	0,123	0,310		<b>0,000</b>	0,074	<b>0,000</b>	0,157	0,033	0,016	0,078
Urin EPI	r <sub>s</sub>	<b>,703**</b>	<b>,762**</b>	<b>,497*</b>	<b>,676**</b>	1,000	0,160	<b>,488*</b>	0,376	<b>-,499**</b>	<b>,477*</b>	-0,327
	p-Wert	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,012	<b>0,000</b>		0,434	0,011	0,053	<b>0,008</b>	0,012	0,096
Urin DA	r <sub>s</sub>	-0,061	-0,088	-0,147	0,357	0,160	1,000	<b>,883**</b>	0,108	-0,315	0,087	-0,211
	p-Wert	0,769	0,670	0,492	0,074	0,434		<b>0,000</b>	0,600	0,117	0,674	0,301
Urin GK	r <sub>s</sub>	0,279	0,199	0,117	<b>,670**</b>	<b>,488*</b>	<b>,883**</b>	1,000	0,297	<b>-,459*</b>	0,283	-0,297
	p-Wert	0,168	0,329	0,585	<b>0,000</b>	0,011	<b>0,000</b>		0,141	0,018	0,161	0,141
Glycin	r <sub>s</sub>	<b>,464**</b>	<b>,490**</b>	0,258	0,280	0,376	0,108	0,297	1,000	-0,087	<b>,401*</b>	0,020
	p-Wert	<b>0,010</b>	<b>0,006</b>	0,186	0,157	0,053	0,600	0,141		0,646	0,028	0,916
Histidin	r <sub>s</sub>	<b>-,597**</b>	<b>-,494**</b>	<b>-,535**</b>	<b>-,412*</b>	<b>-,499**</b>	-0,315	<b>-,459*</b>	-0,087	1,000	-0,052	0,337
	p-Wert	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>	0,033	<b>0,008</b>	0,117	0,018	0,646		0,785	0,069
LysoPC a C20:4	r <sub>s</sub>	0,353	0,317	0,082	<b>,461*</b>	<b>,477*</b>	0,087	0,283	<b>,401*</b>	-0,052	1,000	-0,218
	p-Wert	0,056	0,088	0,679	0,016	0,012	0,674	0,161	0,028	0,785		0,247
LysoPC a C28:0	r <sub>s</sub>	<b>-,371*</b>	-0,236	-0,336	-0,345	-0,327	-0,211	-0,297	0,020	0,337	-0,218	1,000
	p-Wert	<b>0,043</b>	0,210	0,080	0,078	0,096	0,301	0,141	0,916	0,069	0,247	

Angabe des Spearman-Korrelationskoeffizienten r<sub>s</sub>. Signifikante Korrelationen sind fett markiert. \* (hellgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* (dunkelgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

## Anhang 8: Boxplot der signifikant veränderten Metabolite bei noradrenergem Phänotyp PPGL vs. Kontrollen



Plasmakonzentrationen für C0 (A), Asparagin (B), Threonin (C) sowie ADMA (D). Angabe der Daten in  $\mu\text{mol/l}$ .

Ausreißer mit Werten zwischen dem 1.5- und 3-fachem Interquartilenbereich sind als Kreise markiert. Signifikante Unterschiede sind mit \* ( $p < 0.05$ ) und \*\* ( $p < 0.01$ ) gekennzeichnet. PPGL  $n=21$ , Kontrollen  $n=21$ .

PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

**Anhang 9: Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGL mit noradrenergem Phänotyp und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephren im Plasma**

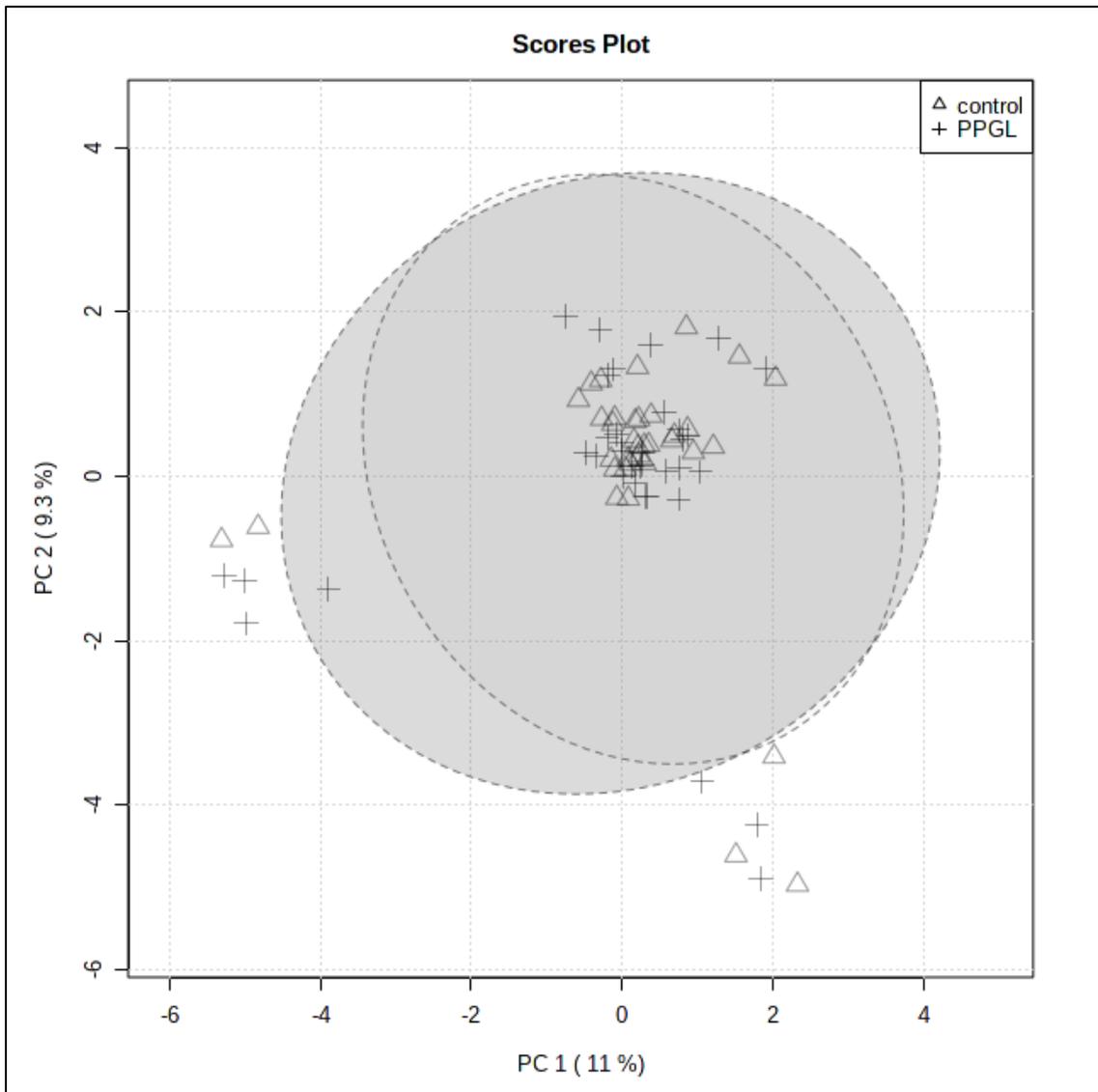
		Plasma NMN	Plasma MN	Plasma MTY	Urin NE	Urin EPI	Urin DA	Urin GK	C0	Asparagin	Threonin	ADMA
<b>Plasma NMN</b>	r <sub>s</sub>	1,000	<b>,307*</b>	<b>,684**</b>	<b>,676**</b>	0,056	0,035	<b>,430*</b>	-0,226	-0,252	<b>-,344*</b>	-0,258
	p-Wert		<b>0,048</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,751	0,848	<b>0,014</b>	0,149	0,108	<b>0,026</b>	0,099
<b>Plasma MN</b>	r <sub>s</sub>	<b>,307*</b>	1,000	<b>,408**</b>	0,215	0,309	0,122	0,146	0,201	0,129	0,064	-0,041
	p-Wert	<b>0,048</b>		<b>0,007</b>	0,215	0,076	0,499	0,424	0,202	0,416	0,687	0,795
<b>Plasma MTY</b>	r <sub>s</sub>	<b>,684**</b>	<b>,408**</b>	1,000	<b>,454**</b>	0,038	0,082	<b>,390*</b>	-0,234	-0,124	<b>-,351*</b>	-0,132
	p-Wert	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>		<b>0,006</b>	0,831	0,650	<b>0,027</b>	0,136	0,435	<b>0,023</b>	0,404
<b>Urin NE</b>	r <sub>s</sub>	<b>,676**</b>	0,215	<b>,454**</b>	1,000	<b>,466**</b>	0,276	<b>,643**</b>	-0,114	-0,254	<b>-,472**</b>	<b>-,399*</b>
	p-Wert	<b>0,000</b>	0,215	<b>0,006</b>		<b>0,006</b>	0,120	<b>0,000</b>	0,515	0,141	<b>0,004</b>	<b>0,018</b>
<b>Urin EPI</b>	r <sub>s</sub>	0,056	0,309	0,038	<b>,466**</b>	1,000	<b>,698**</b>	<b>,674**</b>	-0,089	-0,060	-0,199	-0,029
	p-Wert	0,751	0,076	0,831	<b>0,006</b>		<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,616	0,736	0,260	0,871
<b>Urin DA</b>	r <sub>s</sub>	0,035	0,122	0,082	0,276	<b>,698**</b>	1,000	<b>,829**</b>	-0,342	-0,116	-0,307	-0,001
	p-Wert	0,848	0,499	0,650	0,120	<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	0,051	0,522	0,082	0,997
<b>Urin GK</b>	r <sub>s</sub>	<b>,430*</b>	0,146	<b>,390*</b>	<b>,643**</b>	<b>,674**</b>	<b>,829**</b>	1,000	-0,290	-0,193	<b>-,494**</b>	-0,195
	p-Wert	<b>0,014</b>	0,424	<b>0,027</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>		0,108	0,289	<b>0,004</b>	0,285
<b>C0</b>	r <sub>s</sub>	-0,226	0,201	-0,234	-0,114	-0,089	-0,342	-0,290	1,000	<b>,452**</b>	0,240	0,114
	p-Wert	0,149	0,202	0,136	0,515	0,616	0,051	0,108		<b>0,003</b>	0,125	0,472
<b>Asparagin</b>	r <sub>s</sub>	-0,252	0,129	-0,124	-0,254	-0,060	-0,116	-0,193	<b>,452**</b>	1,000	<b>,534**</b>	-0,018
	p-Wert	0,108	0,416	0,435	0,141	0,736	0,522	0,289	<b>0,003</b>		<b>0,000</b>	0,912
<b>Threonin</b>	r <sub>s</sub>	<b>-,344*</b>	0,064	<b>-,351*</b>	<b>-,472**</b>	-0,199	-0,307	<b>-,494**</b>	0,240	<b>,534**</b>	1,000	0,152
	p-Wert	<b>0,026</b>	0,687	<b>0,023</b>	<b>0,004</b>	0,260	0,082	<b>0,004</b>	0,125	<b>0,000</b>		0,338
<b>ADMA</b>	r <sub>s</sub>	-0,258	-0,041	-0,132	<b>-,399*</b>	-0,029	-0,001	-0,195	0,114	-0,018	0,152	1,000
	p-Wert	0,099	0,795	0,404	<b>0,018</b>	0,871	0,997	0,285	0,472	0,912	0,338	

Angabe des Spearman-Korrelationskoeffizienten r<sub>s</sub>. Signifikante Korrelationen sind fett markiert. \* (hellgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (zweiseitig). \*\* (dunkelgrau), die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (zweiseitig).

DA=Dopamin; EPI=Adrenalin; GK=Gesamtkatecholamine; MN=Metanephrin; MTY=Methoxytyramin; NE=Noradrenalin; NMN=Normetanephrin

## Anhang 10: Hauptkomponentenanalysen der Gesamtkohorte

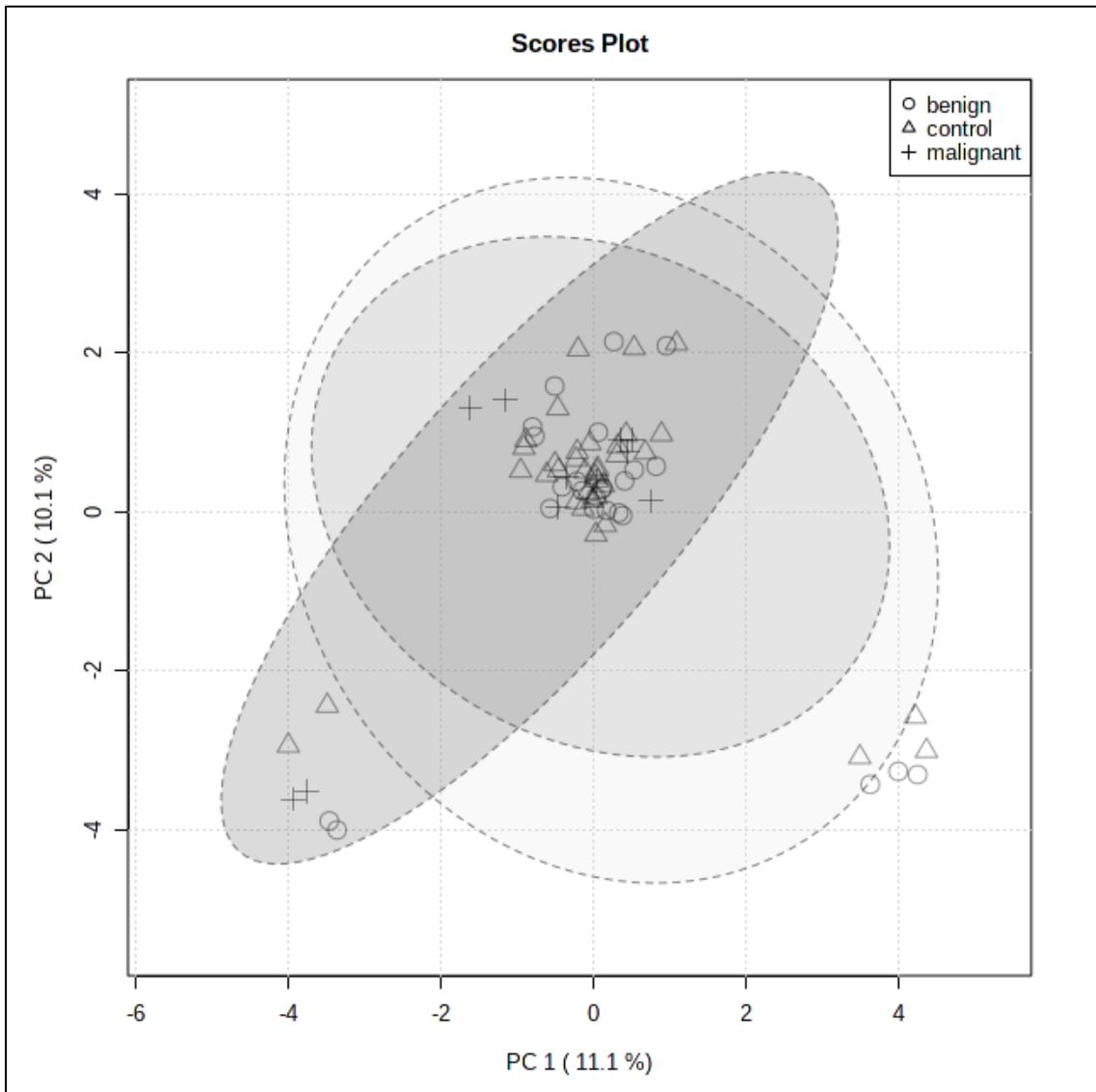
### a) Diagnose (PPGL vs. Kontrolle)



Kontrollen sind als Dreieck und PPGL als Kreuze dargestellt. Daten von 130 Metaboliten nach logarithmischer Normalisierung. Darstellung der 95%-Konfidenz-Region. PPGL n =36, Kontrollen n=36.

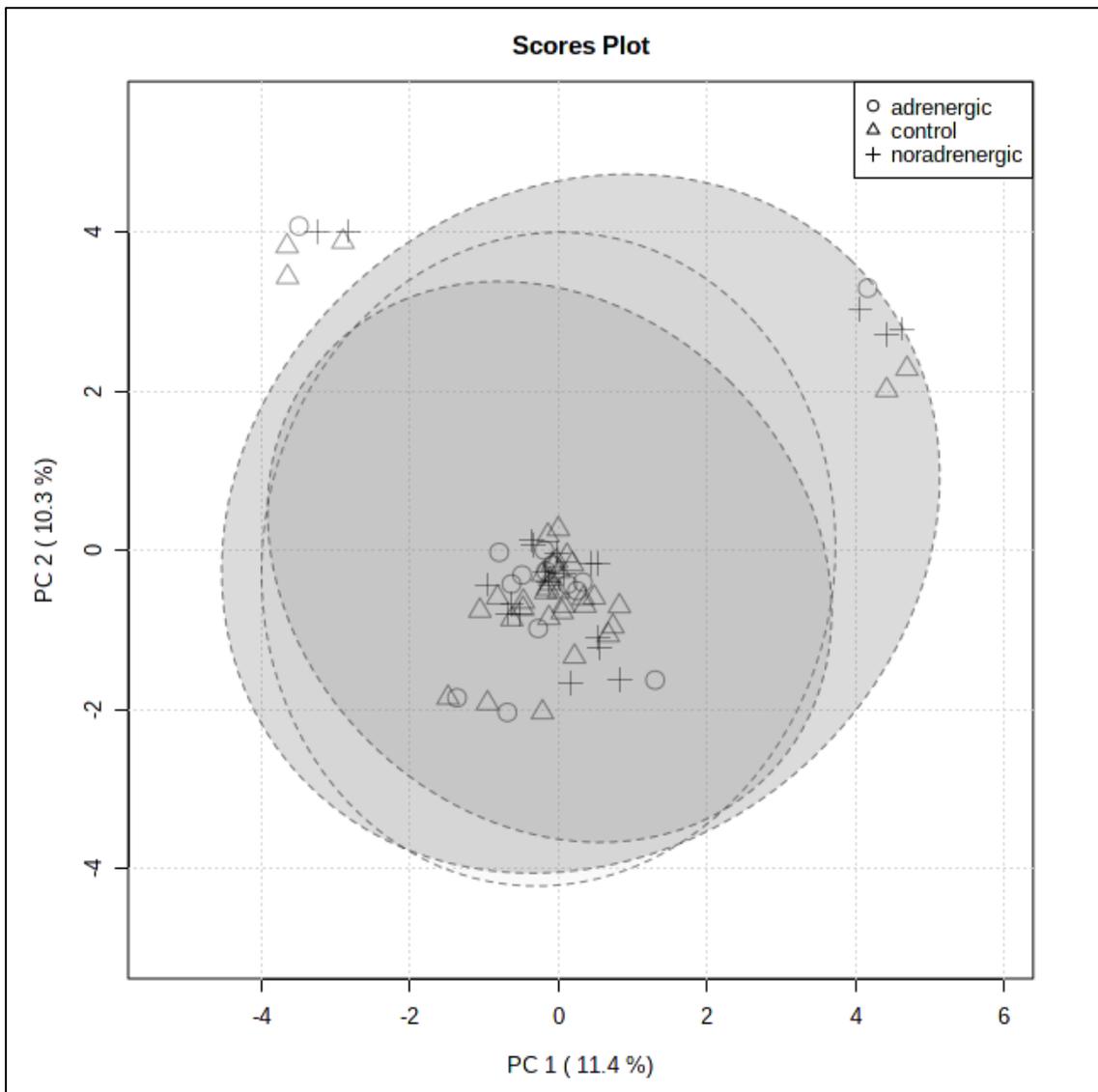
PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

**b) Malignität (benigne vs. maligne vs. Kontrollen)**



Maligne PPGL sind als Kreuz, benigne PPGL als Kreis und Kontrollen als Dreieck dargestellt. Daten von 130 Metaboliten nach logarithmischer Normalisierung. Darstellung der 95%-Konfidenz-Region. Maligne n=11, benigne n=25, Kontrollen n=36.

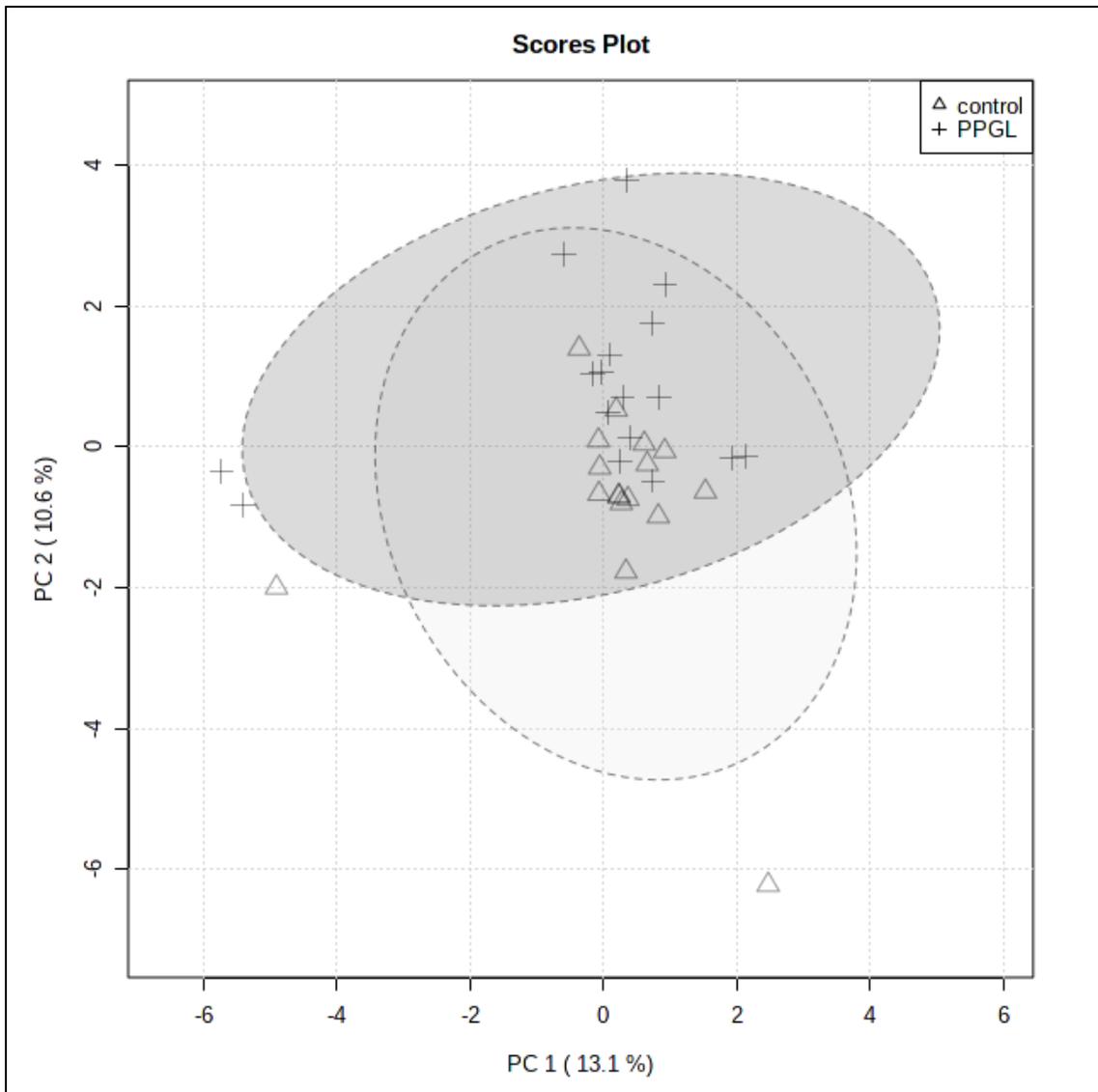
c) Sekretorischer Phänotyp (adrenerg vs. noradrenerg vs. Kontrollen)



PPGL mit adrenergem Phänotyp sind als Kreis, PPGL mit noradrenergem Phänotyp als Kreuz und Kontrollen als Dreieck dargestellt. Daten von 130 Metaboliten nach logarithmischer Normalisierung. Darstellung der 95%-Konfidenz-Region. Adrenergischer Phänotyp n=15, noradrenergischer Phänotyp n=21, Kontrollen n=36.

## Anhang 11: Hauptkomponentenanalysen nach Geschlecht

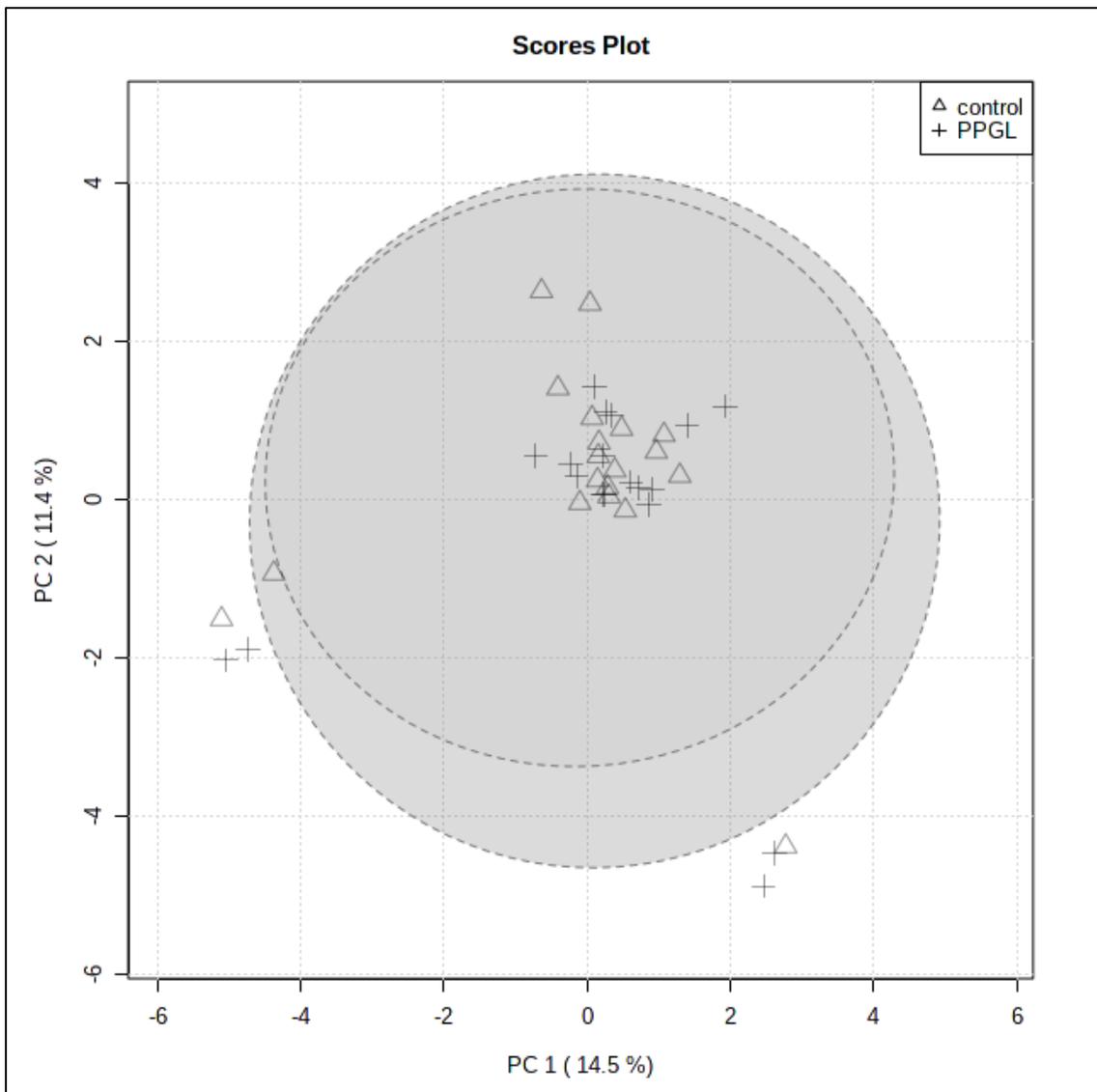
### a) Frauen (PPGL vs. Kontrollen)



PPGL sind als Kreuz und Kontrollen als Dreieck dargestellt. Daten von 130 Metaboliten nach logarithmischer Normalisierung. Darstellung der 95%-Konfidenz-Region. PPGL n=17, Kontrollen n=17.

PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

**b) Männer (PPGL vs. Kontrollen)**



PPGL sind als Kreuz und Kontrollen als Dreieck dargestellt. Daten von 130 Metaboliten nach logarithmischer Normalisierung. Darstellung der 95%-Konfidenz-Region. PPGL n=19, Kontrollen n=19.

PPGL=Phäochromozytome und Paragangliome

# I Abkürzungsverzeichnis

---

CSDE1	Cold Shock Domain Containing E1
CT	Computertomographie
DA	Dopamine
EPI	Epinephrine, Adrenalin
FH	Fumarat-Hydratase
FIA	Flow injection analysis
GC	Gas chromatography
H1	Summe der Hexosen
HIF- $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor $\alpha$
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IQR	Interquartilenrange
LC	Liquid chromatography
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LLOQ	Lower limit of quantification
LOD	Lower limit of detection
LPA	Lysophosphatidsäure
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
MAML3	Mastermind-like transcriptional coactivator 3
MAX	Myc-assoziiertes Faktor X
Md	Median
MDH2	Malat-Dehydrogenase 2
MEN II	Multiple Endokrine Neoplasie Typ II
MN	Metanephrin
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTY	Methoxytyramin
NE	Norepinephrine, Noradrenalin
NF1	Neurofibromin 1
NMN	Normetanephrin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PC aa	Phosphatidylcholin diacyl

PC ae	Phosphatidylcholin acly-alkyl
PC	Phosphatidylcholin
PCA	Principal component analysis
PCC	Phäochromozytom
PGL	Paragangliom
PMT	Prospective Monoamine-producing Tumor
PPGL	Phäochromozytom und Paragangliom
RET	Rearranged during Transfection
SDHx	Succinatdehydrogenase x
SM	Sphingolipid
TMEM127	Transmembranprotein 127
UHPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography
VHL	Von-Hippel-Lindau

## II **Abbildungsverzeichnis**

---

Abbildung 1:	Der Weg vom Genotyp zum Phänotyp	11
Abbildung 2:	Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol (Q)- Massenspektrometers	14
Abbildung 3:	Schematische Anordnung der Proben auf einer 96 Well-Platte	25
Abbildung 4:	Boxplot der Katecholaminwerte im Plasma und Urin PPGL vs. Kontrollen	30
Abbildung 5:	Flow Chart der analysierten Metabolite	32
Abbildung 6:	Metabolitenprofil PPGL vs. Kontrollgruppe	33
Abbildung 7:	Boxplot der signifikant veränderten Metabolite PPGL vs. Kontrollen	35
Abbildung 8:	Heatmap der Korrelationen zwischen den Metaboliten im Plasma und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma	36

### III Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1:	Indikationen für biochemische Testung auf Phäochromozytome/ Paragangliome (PPGL)	9
Tabelle 2:	Intraindividuelle Unterschiede im Metabolitenprofil prä- vs. postoperativ und deren Korrelation mit den Gesamtkatecholaminen im Urin	18
Tabelle 3:	Einschlusskriterien für die Teilnahme an der PMT-Studie	21
Tabelle 4:	Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der PMT-Studie oder Teilen der Studie	21
Tabelle 5:	Übersicht der Metabolitenklassen im AbsoluteIDQ®-p180 Kit	24
Tabelle 6:	Verwendete Geräte	27
Tabelle 7:	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel	27
Tabelle 8:	Patient*innencharakteristika, Plasma- und Urindaten	31
Tabelle 9:	Signifikante metabolomische Veränderung bei Patient*innen mit PPGL im Vergleich zu der Kontrollgruppe	34
Tabelle 10:	Korrelationen zwischen den signifikant veränderten Metaboliten bei PPGL und den Katecholaminen im Urin sowie Metanephrinen im Plasma	37
Tabelle 11:	Signifikante metabolomische Veränderungen bei Frauen	38
Tabelle 12:	Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei Frauen	39
Tabelle 13:	Signifikante metabolomische Veränderungen bei Männern	40
Tabelle 14:	Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei Männern	41
Tabelle 15:	Charakterisierung des Patientenkollektivs nach sekretorischem Phänotyp	42
Tabelle 16:	Signifikante metabolomische Veränderungen bei adrenergem Phänotyp	43

Tabelle 17:	Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei adrenergem Phänotyp	44
Tabelle 18:	Signifikante metabolomische Veränderungen bei noradrenergem Phänotyp	45
Tabelle 19:	Korrelationen der signifikant veränderten Metabolite mit den Plasma-Metanephrinen und Urin-Katecholaminen bei noradrenergem Phänotyp	46

## IV Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Matthias Kroiss für die Überlassung des Dissertationsthemas, die zuverlässige Unterstützung bei allen Herausforderungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Seine unerschöpflichen Ideen, der konstruktive Austausch und seine mitreißende Begeisterungsfähigkeit waren für mich stets eine Motivation und haben mir die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt.

Herrn Dr. Max Kurlbaum danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Verarbeitung der massenspektrometrischen Messungen sowie seine Hilfestellung bei technischen Fragen und Problemen jeder Art.

Mein weiterer Dank gilt Sabine Kendl für die helfende Hand bei der praktischen Durchführung der Probenvorbereitung und Messung. Weiterhin danke ich Yvonne Möhres, die mir mit Rat und Tat bei dem Zusammentragen notwendiger Daten zur Seite stand.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Großfamilie und meinem Freund. Ohne ihren uneingeschränkten Rückhalt und ihre immerwährende Zuversicht wäre mein bisheriger Weg so nicht möglich gewesen. Das grundlegende Vertrauen meiner Familie lässt mich glauben, dass alles möglich ist.