

Zusammenfassung der Dissertation: Etablierung H3F3A-mutierter Riesenzelltumorzelllinien und molekulare Analyse des WEE1-Signalwegs

Der Riesenzelltumor des Knochens (GCTB) ist ein seltener, primärer, semi-maligner Knochtumor. Er befällt vor allem die Epiphysen langer Röhrenknochen. Der Tumor besteht aus mindestens drei Zellkomponenten. Die neoplastischen Stromazellen tragen die diagnostisch relevante *H3F3A*-Mutation. Sie stimulieren die Osteoklasten-ähnlichen Riesenzellen über den Botenstoff RANK-Ligand zur Osteolyse der Knochensubstanz. Behandlungsstandard ist die chirurgische Entfernung des Tumors mittels Resektion oder Kürettage. Hierbei wird eine komplette Entfernung des Befunds unter möglichst minimaler chirurgischer Morbidität und akzeptablem funktionellen Endergebnis angestrebt. Der Tumor hat eine hohe Rezidivneigung. Inoperable Befunde werden systemisch oder mittels Bestrahlung therapiert. Durch Bestrahlung erhöht sich allerdings das Risiko sekundärer maligner Entartung. Als neuer Therapieansatz wird Denosumab als Antikörper gegen RANK-Ligand eingesetzt, wodurch die Bindung von RANK-Ligand an den RANK-Rezeptor auf den Osteoklasten inhibiert wird. In Verbindung mit der Denosumab-Therapie wurde das Auftreten von Osteosarkomen beobachtet und der Einfluss von Denosumab wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Aufgrund der erhöhten Zahl maligner Tumoren und mangelnder Behandlungsoptionen sekundär maligner GCTBs, wurde im Rahmen dieser Dissertation nach einer neuen Therapiemöglichkeit für den GCTB gesucht.

Durch die Etablierung und Charakterisierung fünf neuer *H3F3A*-mutierter GCTBs Zelllinien U-GCT1, U-GCT2, U-GCT3M, U-GCT3R1 und U-GCT3R2 wurde ein neues *in vitro* Modell für den GCTB entwickelt. Mit der U-GCT3M konnte die erste Zelllinie aus einer Lungenmetastase eines GCTB etabliert werden. Es wurde ein Gewebekollektiv 13 verschiedener *H3F3A*-mutierter GCTBs erstellt. Der Proliferationsindex wurde mittels Ki-67 bestimmt und die Akteure des WEE1-Signalwegs *in situ* analysiert. Daraufhin wurde der Signalweg in den Zelllinien validiert. Mittels Western Blot und immunzytochemischer Färbungen von Zellblöcken erfolgte die Proteinanalyse. WEE1, CDK1, H3K36me3 und RRM2 wurden im gesamten Kollektiv und den U-GCT-Zelllinien detektiert. Cyclin B1 konnte lediglich in den mitotischen Figuren der Zellen immunzytochemisch untersuchter Zellblockschnitte nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der WEE1-Kinase erfolgte, neben dem Nachweis auf Proteinebene, auch mittels qPCR. Durch Gensequenz-Analyse wurden Mutationen des

TP53 Gens in den GCTB-Zelllinien ausgeschlossen. Eine selektive Inhibition der WEE1-Kinase mittels MK-1775 führt zur Wachstumsinhibition der Zelllinien. Dies wurde durch Zellviabilitätsmessungen ermittelt. Die Ki-67-Analyse zeigte eine signifikante Verringerung der Zellproliferation nach Behandlung mit MK-1775 an. Ein zytotoxischer Effekt konnte durch Proteinanalyse der Zellen auf cleaved PARP vor und nach Inhibition ausgeschlossen werden. Ein nahezu identischer Effekt konnte in den GCTB Linien für Gemcitabin nachgewiesen werden. Eine signifikante Reduktion der Zellproliferation im Vergleich zur Einzelapplikation der IC25-Werte erwies sich in der Kombination beider Wirkstoffe in GCTB-Zelllinien. Somit könnte die Kombination beider Wirkstoffe eine neue Behandlungsoption für fortgeschrittene oder sekundär maligne GCTBs darstellen; die Kombination der Substanzen kann als Option für die Therapie von GCTB in einer prospektiven Studie gesehen werden.

Abstract der Publikation: Characterization of Three Novel H3F3A-mutated Giant Cell Tumor Cell Lines and Targeting of Their Wee1 Pathway

The giant cell tumor of bone (GCTB) is a locally aggressive primary bone tumor that is composed of mononuclear stroma cells, scattered macrophages, and multinucleated osteoclast-like giant cells which cause pathologic osteolysis. The stroma cells represent the neoplastic population of the tumor and are characterized by the H3F3A mutation G34W. This point mutation is regarded as the driver mutation of GCTB. We have established three new stable H3F3A mutated GCTB cell lines: U-GCT1, U-GCT2, and U-GCT3M. MK-1775 is a Wee1-kinase inhibitor which has been used for blocking of sarcoma growth. In the cell lines we detected Wee1, Cdk1, Cyclin B1, H3K36me3, and Rrm2 as members of the Wee1 pathway. We analyzed the effect of MK-1775 and gemcitabine, alone and in combination, on the growth of the cell lines. The cell lines showed a significant reduction in cell proliferation when treated with MK-1775 or gemcitabine. The combination of both agents led to a further significant reduction in cell proliferation compared to the single agents. Immunohistochemical analysis of 13 GCTB samples revealed that Wee1 and downstream-relevant members are present in GCTB tissue samples. Overall, our work offers valuable new tools for GCTB studies and presents a description of novel biomarkers and molecular targeting strategies.

Lübbehüsen C, Lüke J, Seeling C, Mellert K, Marienfeld R, von Baer A, Schultheiss M, Möller P, Barth TFE. Characterization of Three Novel H3F3A-mutated Giant Cell Tumor Cell Lines and Targeting of Their Wee1 Pathway. Sci Rep. 2019 Apr 23;9(1):6458. doi: 10.1038/s41598-019-42611-1. PMID: 31015476; PMCID: PMC6478864.