

Theophilos – Dimitrios Tzaridis  
Dr. med.

## **Novel p53-targeting therapeutic approaches for the treatment of high-risk ependymoma**

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Professor Dr. Stefan M. Pfister

### **Summary**

Ependymomas are thought to arise from the subventricular zone of the brain and comprise the third most common pediatric brain tumour. Despite considerable advances, therapeutic options for high-risk tumours remain limited leading to a 5-year overall survival rate of as low as 60%. In order to face this clinical challenge, novel mechanism-of-action based treatment strategies are urgently needed.

It is known that aberrant expression of non-functional p53 is associated with inferior prognosis. In order to unravel the underlying mechanism of p53 inactivation in ependymoma, *TP53* mutation analysis was performed in 130 primary ependymomas identifying a mutation rate of only 3%. p53 protein expression was studied in a tissue microarray representing 398 primary intracranial ependymomas and p53 accumulation was shown to occur much more frequently (22% of cases). This correlated with inferior progression-free and overall survival, consistent with previous results. It was previously established that a proportion of high-risk tumours harbours a homozygous Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) deletion. Out of the 398 intracranial ependymomas, 4% exhibited this cytogenetic aberration with all of these tumours exhibiting p53 accumulation. Thus, a possible mechanism of loss of p53 function despite protein accumulation might be p53 destabilisation due to absence of p14 and subsequently excessive Murine double minute 2 (MDM2) activity.

In order to assess the potential reversibility of this process and to reactivate p53 through MDM2 inhibition, the effects of Actinomycin-D and Nutlin-3 were evaluated in two p53 accumulating ependymoma cell lines representing high-risk supratentorial REL-associated protein A (RELA) positive (dkfzEP1NS) and infratentorial Group A (SJBT-57) ependymoma. Cell viability assays were performed after treatment with different concentrations of Actinomycin-D and Nutlin-3 confirming low-dose effects of the former for both cell lines.

The potential of the agents to induce apoptosis was investigated via flow cytometry, which showed that low-dose Actinomycin-D induced apoptosis in a more effective way than high-dose concentrations in both cell lines. Nutlin-3 also induced apoptosis in both cell lines at previously described concentrations.

Transcriptome analysis of low-dose and high-dose Actinomycin-D treated cells revealed a high number of differentially expressed genes including several p53-dependent genes (i.e. p53 upregulated modulator of apoptosis; PUMA) being upregulated after low- but not high-dose Actinomycin-D as well as oncogenes (i.e. Ephrin receptor B2; EPHB2), which were downregulated predominantly after low-dose application of the agent.

At protein level, PUMA induction upon low-dose Actinomycin-D was confirmed in both cell lines. Moreover, the re-establishment of members of the p53 complex (p21, MDM2) upon Actinomycin-D treatment was also demonstrated. Nutlin-3 proved capable of reactivating p53 mainly in RELA fusion positive and *CDKN2A* deleted tumour cells.

These results indicate that Actinomycin-D and partially Nutlin-3 are effective in reversing the loss of p53 function and could comprise a rational therapeutic approach for a significant subset of high-risk ependymoma patients.

## Zusammenfassung

Ependymome sind Hirntumore, die wahrscheinlich aus Vorläuferzellen der subventrikulären Zone entstehen. Sie machen 12% aller pädiatrischen intrakraniellen Malignome aus und sind damit der dritthäufigste kindliche Hirntumor. Trotz beträchtlichen Fortschritts bleiben die therapeutischen Optionen für Hochrisikotumore begrenzt, was sich in der 5-Jahresüberlebensrate von etwa 60% widerspiegelt. Um diesem Mangel entgegenzuwirken, müssen gezielte Behandlungsstrategien basierend auf den molekularen Pathomechanismen entwickelt werden.

Wie bereits bekannt, korreliert die Akkumulation von nicht-funktionellem p53 mit herabgesetzter Prognose. Um den unbekannt Mechanismus der p53 Inaktivierung zu entdecken, wurde eine *TP53* Mutationsanalyse in 130 Primärtumoren durchgeführt, wobei eine niedrige Frequenz von somatischen Mutationen mit 3% (4/130) detektiert wurde. Dennoch konnte die aberrante Expression von funktionslosem p53 in Tumoren als prognostischer Marker bestätigt werden. Hierbei wurde ein Tissue-Microarray mit 398 intrakraniellen Ependymomen mittels Immunhistochemie untersucht und zeigte eine p53 Akkumulation in 22% der Fälle. Dies korrelierte mit schlechter Gesamtüberlebensrate und herabgesetztem progressionsfreiem Überleben. Die homozygote Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) Deletion wurde bereits als zytogenetisches Element von Hochrisikotumoren etabliert. In dem obengenannten Tissue Microarray wurde dies bei 4% der Tumore beobachtet, wobei all diese Tumore eine p53 Akkumulation aufwiesen. Demnach könnte die Überaktivität von Murine double minute 2 (MDM2) aufgrund der Abwesenheit von p14 einen möglichen Mechanismus für die p53 Inaktivierung darstellen.

Um diesem Mechanismus durch MDM2 Inhibition und somit p53 Reaktivierung entgegenzuwirken, wurden zwei repräsentative Ependymomzelllinien für supratentorielle (dkfzEP1NS, Subtyp: REL-associated protein A (RELA) positiv) und infratentorielle (SJBT-57; Subtyp: Gruppe A) Hochrisikotumore mit den Medikamenten Actinomycin-D, sowie Nutlin-3 behandelt. Zellviabilitätsassays zeigten einerseits eine niedrige mittlere inhibitorische Konzentration von Actinomycin-D für beide Zelllinien, andererseits unterschiedliche Werte für Nutlin-3.

Die Induktion von Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, wobei niedrig dosiertes Actinomycin-D viel effektiver als höhere Dosierung vom Medikament erschien.

Nutlin-3 war ebenfalls in der Lage, in bereits bekannten Konzentrationen Apoptose zu vermitteln.

Expressionsanalysen von niedrig und hoch dosiert Actinomycin-D behandelten und unbehandelten Zellen offenbarten zahlreiche differentiell exprimierte Gene. Diese beinhalteten diverse p53-abhängige Transkriptionsfaktoren (z.B. p53 upregulated modulator of apoptosis; PUMA), die nach niedrig aber nicht hoch dosierter Actinomycin-D Behandlung hochreguliert waren, sowie Onkogene (z.B. Ephrin receptor B2; EPHB2), deren Expression vornehmlich nach niedrig dosiertem Actinomycin-D herabgesetzt war.

Auf Proteinebene wurde die Actinomycin-D bedingte PUMA Induktion bei beiden Zelllinien bestätigt. Zudem wurde die Reaktivierung des p53 Komplexes (p21, MDM2) nach vor allem niedrig dosiertem Actinomycin-D bewiesen. Nutlin-3 bewirkte ebenfalls die Wiederherstellung von p21 und MDM2 allerdings nur in den dkfzEP1NS und nicht in den SJBT-57 Zellen.

Diese Ergebnisse untermauern, dass Actinomycin-D und teilweise Nutlin-3 insbesondere in RELA fusionierten Tumoren die Funktionalität von p53 wiederherstellen können und daher eine rationale, preisgünstige Therapieoption für Rezidivpatienten mit Hochrisikoepondymomen, die besonders häufig eine p53 Inaktivierung aufweisen, darstellen könnten.