

Sara-Najafi

Dr.sc.hum

Zebrafish xenografts of pediatric nervous system tumors for rapid *in vivo* validation of small molecule inhibitor-based combination treatments

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Olaf Witt

The majority of high-risk neuroblastoma patients respond poorly to multimodal chemotherapy, thus the development of novel drug combinations and improved preclinical drug testing models are necessary to effectively treat the disease. Histone deacetylase (HDAC) activity plays an important role in numerous cellular processes and aberrant expression of HDACs has been associated with a variety of malignancies, including neuroblastoma. Selective inhibition of HDACs has previously been reported as a promising approach to sensitize aggressive neuroblastomas to chemotherapy. Aberrant expression or activation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a frequent observation in neuroblastomas. The current study describes a zebrafish neuroblastoma and brain tumor xenograft model, which allows to evaluate the efficacy of combination treatments involving standard chemotherapy and selected HDAC inhibitors (HDACis). Fluorescently labeled neuroblastoma cell lines or patient-derived neuroblastoma, as well as brain tumor (MB, LGG and HGG) cells, which have been briefly expanded in culture, were injected into the yolk sac of zebrafish larvae. In addition, tumor cells were injected orthotopically into the brain or into perivitelline space to study tumor cell migration. Cancer progression was monitored using confocal microscopy.

After injection, 40%-50% of tumor cells remained mitotically active and the model allowed monitoring of tumor progression, including tumor cell migration with single-cell resolution in an intact environment. We observed a reduction in tumor volume following monotherapy with HDACis (tubastatin A, vorinostat, panobinostat), as well as following combination therapies with doxorubicin. Similar effects were observed when HDACis were applied in combination with chloroquine or ALKi crizotinib. Hence, this model allows for fast, cost-efficient, and reliable *in vivo* evaluation of toxicity and response of the primary and metastatic tumor sites to drug combinations.

Moreover, the combination of ALKi and HDACi was studied in more detail with classical cell culture methods, such as colony assays, cell viability assays and western blot analysis. These studies demonstrated that the combination of HDACi and ALKi

efficiently shifted the phenotype of cell differentiation towards cell death in ALK expressing neuroblastoma cell lines.

In summary, the study established for the first time neuroblastoma and orthotopic brain tumor xenografts in zebrafish larvae for drug treatment evaluation. The study successfully established a model for determination of the migrating potential of tumor cells and analyzed a diversity of different treatment combinations for anti-tumor activity. Overall, the here described zebrafish xenograft model of pediatric nervous system tumors allows for fast and reliable evaluation of toxicity and response of primary and metastatic tumors to treatments involving chemotherapy and novel drugs before testing on complex mammalian studies.

Die Mehrzahl der Hochrisiko-Neuroblastompatienten spricht schlecht auf eine multimodale Chemotherapie an. Daher sind die Entwicklung neuer Arzneimittelkombinationen und verbesserter präklinischer Arzneimittelprüfmodelle erforderlich, um die Krankheit wirksam zu behandeln. Die Aktivität der Histondeacetylasen (HDAC) spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen, und eine fehlerhafte Expression von HDACs wurde mit einer Vielzahl von malignen Erkrankungen, einschließlich Neuroblastomen, in Verbindung gebracht. Die selektive Hemmung von HDACs wurde bereits als vielversprechender Ansatz zur Sensibilisierung aggressiver Neuroblastome für eine Chemotherapie beschrieben. Anormale Expression oder Aktivierung der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) sind eine häufige Beobachtung bei Neuroblastomen. Die vorliegende Studie beschreibt ein Zebrafisch-Xenotransplantant-Modell von Neuroblastom und Hirntumoren, mit dem die Wirksamkeit von Kombinationsbehandlungen mit Standardchemotherapie und ausgewählten HDAC-Inhibitoren (HDACis) bewertet werden kann.

Fluoreszenzmarkierte Neuroblastomzelllinien oder von Patienten stammende Neuroblastome, sowie kurzzeitig in Kultur expandierte Gehirntumorzellen (MB, LGG und HGG) wurden in den Dottersack von Zebrafischlarven injiziert. Zusätzlich wurden Tumorzellen orthotop in das Gehirn oder in den Perivitellinraum injiziert, um die Migration von Tumorzellen zu untersuchen. Das Fortschreiten des Krebses wurde unter Verwendung von konfokaler Mikroskopie überwacht.

Nach der Injektion blieben 40% -50% der Tumorzellen mitotisch aktiv und das Modell ermöglichte die Überwachung des Tumorfortschritts, einschließlich der Tumorzellmigration, auf Einzelzellebene in einer intakten Umgebung. Wir beobachteten eine Verringerung des Tumolvolumens nach Monotherapie mit HDACis (Tubastatin A, Vorinostat, Panobinostat) sowie nach Kombinationstherapien mit Doxorubicin. Ähnliche Effekte wurden beobachtet, wenn HDACis in Kombination mit Chloroquin oder dem ALKi Crizotinib angewendet wurden. Daher ermöglicht dieses Modell eine schnelle, kostengünstige und zuverlässige In-vivo-Bewertung der Toxizität und des Ansprechens von primären und metastasierten Tumoren auf Arzneimittelkombinationen.

Darüber hinaus wurde die Kombination von ALKi und HDACis mit klassischen Zellkulturmethoden wie Colony Assays, Viabilitäts Assays und Western-Blot-Analysen genauer untersucht. Diese Studien zeigten, dass die Kombination von HDACi und ALKi den Phänotyp der Zelldifferenzierung in ALK-exprimierenden Neuroblastom-Zelllinien effizient in Richtung Zelltod verschob.

Zusammenfassend stellte die Studie zum ersten Mal Neuroblastom- und orthotope Gehirntumor-Xenotransplantate in Zebrafisch-Larven für die medikamentöse Behandlung zur Verfügung. Die Studie etablierte erfolgreich ein Modell zur Bestimmung des Migrationspotentials von Tumorzellen und analysierte eine Vielzahl verschiedener Behandlungskombinationen für die Antitumoraktivität. Insgesamt ermöglicht das hier beschriebene Zebrafisch-Xenotransplantat-Modell von pädiatrischen Tumoren des Nervensystems eine schnelle und zuverlässige Bewertung der Toxizität, sowie des Ansprechens von primären und metastasierten Tumoren auf Behandlungen mit Chemotherapie und neuartigen Arzneimitteln, bevor man zu komplexen Säugetierstudien übergeht.