

Anna Katharina Ceranski

Dr. med.

## **Establishment of refined culture conditions with increased physiological relevance for Ewing sarcoma cell lines**

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald

Das Ewing-Sarkom (EwS) ist ein aggressiver maligner Knochen- und Weichteiltumor, der vor allem Kinder und Jugendliche betrifft. Die Pathophysiologie des EwS basiert auf einer Gentranslokation, die Fusionsgene hervorbringt (hauptsächlich EWSR1::ETS), welche als krebsfördernde Transkriptionsfaktoren agieren. Ein großer Teil der EwS Forschung beruht auf *in vitro* Zellkulturmethoden, weil diese technisch simpel, vielseitig einsetzbar und kostengünstig sind. Allerdings spiegeln die Standard-Zellkulturmethoden die physiologischen Bedingungen kaum wider, was die Realitätsnähe dieser EwS Modelle einschränkt. In dieser Arbeit sollten die Standard-Kulturmethoden für EwS Zelllinien für eine größere physiologische Wiedergabetreue verbessert und gleichzeitig möglichst einfach und kostengünstig gehalten werden. Ein weiteres Ziel war, auf Transkriptomebene die EwS Zelllinien und Aktivität der EWSR1::ETS Fusionsgene in den verfeinerten Kulturbedingungen zu charakterisieren.

Zur Etablierung der verfeinerten Kulturbedingungen wurden fünf EwS Zelllinien im physiologischen Medium HPLMax kultiviert, was die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigte, jedoch, wie in *in vitro* Experimenten gezeigt, ihr Wachstum verlangsamte. Weiterhin wurde durch *in vitro* Proliferationsexperimente die minimal nötige Konzentration an fetalem Rinderserum bestimmt, die für die Kultur von EwS Zelllinien nötig ist. Dies zeigte, dass der Zusatz an fetalem Rinderserum um 30% reduziert werden kann, ohne die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zu beeinflussen, was eine Reduzierung des Tierprodukts und der damit verbundenen Nachteile für die verfeinerten EwS Kulturbedingungen ermöglicht. Zuletzt wurde eine Technik für Sphäroidwachstum für die verfeinerten EwS Kulturmethoden implementiert, und nachfolgende histologische Analysen zeigten die architekturelle Ähnlichkeit der EwS Sphäroide mit *in vivo* Xenograft EwS Tumoren. Als nächstes wurde eine Microarray-basierte Transkriptomanalyse von vier EwS Zelllinien, die entweder in den Standard- oder in den verfeinerten Kulturbedingungen gewachsen waren, durchgeführt, wobei die Zellen in beiden Kulturbedingungen mit und ohne einen Knockdown der EWSR1::ETS Fusionen wuchsen. Bioinformatische Analysen zeigten, dass die Zelllinien-Charakteristika in beiden Kulturbedingungen stabil waren, wohingegen transkriptionelle

Programme, die zwischen den Kulturbedingungen verändert waren, auf verlangsamtes Wachstum, veränderte Stoffwechsel- und gesteigerte Translationsaktivität und Hypoxie in den verfeinerten Zellkulturmethoden hinwiesen. Die Veränderungen von Proliferation und Stoffwechsel in den EwS Zelllinien aus den verfeinerten Kulturmethoden stimmen mit Ergebnissen aus der Literatur zur Kultur von Tumorzelllinien in physiologischen Medien überein. Außerdem gilt Hypoxie als ein etablierter Bestandteil der EwS Mikroumgebung. Folglich unterstützen die Daten die Annahme, dass die vorgenommenen Veränderungen die Wiedergabetreue der EwS Zellkultur gesteigert haben. Zuletzt wurden die Transkriptome der EwS Zelllinien mit und ohne Knockdown auf EWSR1::ETS-korrelierte Gene hin untersucht. EWSR1::ETS-korrelierte Gene beider Kulturbedingungen waren in Proliferation und Differenzierung involviert, was mit dem allgemeinen Wissensstand zur EWSR1::ETS-Aktivität übereinstimmt. Allerdings waren unter den EWSR1::ETS-korrelierten Genen in den verfeinerten Kulturbedingungen auch Transmembrantransporter von Aminosäuren, was bemerkenswerterweise nur in diesen Kulturbedingungen festgestellt werden konnte. Eine weitere Validierung von potenziellen metabolischen Zusammenhängen zwischen Aminosäuretransportern und EWSR1::ETS Onkogenen ist notwendig, nichtsdestotrotz deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche therapeutisch-nutzbare Angreifbarkeit sowie auf die Relevanz von realitätsnäheren EwS Zellkulturbedingungen hin.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit EwS Zellkulturbedingungen mit größerer physiologischer Wiedergabetreue vor, die durch eine Transkriptomanalyse von EwS Zelllinien validiert wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Notwendigkeit für eine größere physiologische Wiedergabetreue von *in vitro* EwS Studien, insbesondere für die Entzifferung von metabolischen Zusammenhängen und die Identifizierung von neuen therapeutischen Angriffspunkten.