Institut für Pathologie der Universität Ulm

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Analyse von H3K36me3 in *H3F3A*-mutierten Riesenzelltumoren des Knochens

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Jordan Schreiber, geboren in Hannover

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Schultheiß

Tag der Promotion: 13.07.2023

Für Julian, Sebastian und Johannes. Ohne euch wäre das alles viel schneller gegangen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iii

1. Einleitung – Der Riesenzelltumor des Knochens 1

1.1 Definition 1

1.2 Epidemiologie und Lokalisation 1

1.3 Klinik und Therapie 1

1.4 Morphologie und Pathophysiologie 2

1.5 Differentialdiagnose 4

1.6 *H3F3A*-Mutation 4

1.7 Histone und Epigenetischer Code 5

1.8 Histonmethylierung im RZT 6

1.9 Erklärung zu den teilweisen Vorpublikationen 9

1.10 Ziele der vorliegenden Arbeit 9

2. Material und Methoden 10

2.1 Einhaltung ethischer Richtlinien 10

2.2 Riesenzelltumorkollektiv 10

2.3 Prinzip der Tumorforschung mithilfe von Zelllinien 10

2.4 Riesenzelltumorlinien 10

2.5 Vergleichskollektiv 11

2.6 Arbeiten mit Zellen 12

2.6.1 Zellwachstum und Zellkultivierung 12

2.6.2 Zellzählung 12

2.6.3 Einfrieren von Zellen 13

2.6.4 Auftauen von Zellen 13

2.6.5 DNA-Isolation aus Zelllinien 13

2.6.6 Herstellung von Zellblockschnitten 14

2.6.7 *H3F3A*-Mutationsanalyse 14

2.7 Immunchemie 16

2.7.1 Funktionsprinzip der Immunchemie 16

2.7.2 Methoden der Vorbehandlung 16

2.7.3 Immunfärbungen 17

2.7.4 H3K36me3 17

2.7.5 SETD2 17

2.7.6 Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W 19

2.7.7 Gegenüberstellung Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W mit jeweiligen Einzelfärbungen 19

2.7.8 Doppelimmunfluoreszenzfärbung p63 und H3K36me3 19
2.8 LINE-1-Methylierungsanalyse 20
2.8.1 Prinzip der LINE-1-Methylierungsanalyse 20
2.8.2 Methode 21
3. Ergebnisse 22
3.1 Mutationsanalyse des Zelllinienkollektivs 22
3.2 Immunchemie 22
3.2.1 Zelllinienkollektiv, H3K36me3 und SETD2 22
3.2.2 Fallkollektiv, H3K36me3 23
3.2.3 Doppelimmunfluoreszenz H3K36me3 + p63 23
3.2.4 Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W 24
3.3 LINE-1 24
4. Diskussion 28
5. Zusammenfassung 32
6. Literaturverzeichnis 34
Danksagung 39

Abkürzungsverzeichnis

AKZ	Aneurysmatische Knochenzyste
BSA	Bovines Serumalbumin
CD68	Cluster of differentiation 68, Oberflächenmarker u.a. von Riesenzellen
CpG	In der DNA vorhandenes Dinukleotid aus Cytosin und Guanin
DAB	3,3‘-Diaminobenzidin, Substrat der Peroxidase
DAPI	4‘,6-Diamidin-2-phenylindol, ein Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid, ein organisches Lösungsmittel
DNA	Englische Abkürzung für Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ein Komplexbildner, der z.B. Calcium bindet
FCS	Fetales Kälberserum
G34W	Die für den RZT charakteristische Mutation
HeLa	Tumorzelllinie, benannt nach Henrietta Lacks
H3K36me3	Trimethyliertes Lysin an Position 36 von Histon H3
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IMDM	Iscove’s modified Dulcecco’s medium, Nährmedium für Zellkultur
mM	Millimol = 0,001 Mol
PBS	Phosphate Buffered Saline, eine Pufferlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P63	Tumorprotein 63, Oberflächenmarker u.a. für verschiedene Malignome
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin, Aminosäuremotiv in Enzymen
RANKL	Receptor activator of NF-kB-Ligand
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium, Zellkulturmedium
RZT	Riesenzelltumor (des Knochens)
SETD2	SET-Domain containing 2, wobei SET für Suvar3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax steht.
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan, eine Pufferlösung

1. Einleitung – Der Riesenzelltumor des Knochens

1.1 Definition

Der Riesenzelltumor (RZT) des Knochens ist eine seltene semimaligne primäre Neoplasie des Knochens, die mehrheitlich an den epiphysären Enden langer Röhrenknochen auftritt. Er ist auch als Osteoklastom bekannt, wobei der Begriff heute obsolet ist, da die das histologische Bild beherrschenden osteoklastären Riesenzellen nicht die eigentlichen neoplastischen Zellen sind, sondern lediglich von den neoplastisch transformierten Stromazellen induziert werden. In den letzten Jahren konnten betreffs dieser Neoplasie beträchtliche neue molekularpathologische Befunde erhoben werden, die das Verständnis zu diesem Tumor grundlegend geändert haben.

1.2 Epidemiologie und Lokalisation

In westlichen Ländern macht der RZT bei einer Inzidenz von 9/1.000.000 ca. 4% aller primären Knochentumore aus. 70% der Erstdiagnosen werden bei Patienten im Alter zwischen 20 und 40 Jahren gestellt, ein Auftreten des RZT bei Patienten unter 20 sowie über 55 Jahren gilt als unwahrscheinlich. Bei betroffenen Personen unter 20 Jahren handelt es sich meist um Frauen mit abgeschlossenem Knochenwachstum. Der Tumor tritt bei Frauen mit einer Rate von ca. 1.4:1 häufiger auf als bei Männern. In China macht der RZT einen deutlich höheren Anteil der primären Knochentumore aus, wobei hier Männer häufiger als Frauen betroffen sind *(Niu et al. 2012, Niu et al. 2015)*. Prädilektionsstellen für den RZT befinden sich an den epiphysären Enden langer Röhrenknochen wie des Femur, der Tibia und des Radius. Darüber hinaus kann der RZT auch an Knochen der Hand sowie in seltenen Fällen der Wirbelsäule auftreten. Bei einem Vorkommen innerhalb der Ossa Plana ist der RZT in der Regel mit einem Morbus Paget vergesellschaftet *(Czerniak et al., 2016)*

1.3 Klinik und Therapie

Der RZT wird als Neubildung mit unsicherem oder unbekanntem biologischem Verhalten eingestuft (IDC-O M9250/1). Er wächst lokal aggressiv, hat ein malignes Potential und kann im Einzelfall metastasieren, vorzugsweise in die Lunge *(Viswanathan S, Jambhekar NA., 2010)*. In ca. 10% der Fälle kommt es nach chirurgischer Therapie zu Lokalrezidiven

(Kremen et al. 2012). Makroskopisch stellt sich der RZT meist rötlich-bräunlich dar. Eine Invasion des Gelenkknorpels ist selten, dafür ist häufig eine Destruktion der Kortikalis zu beobachten, welche zu pathologischen Frakturen führen kann. Diese stellen nicht selten die klinische Erstmanifestation dar. Weitere mögliche Symptome sind lokale Schmerzen und Schwellungen. Ebenso sind radiologische Zufallsbefunde möglich.
Zur Diagnosesicherung wird üblicherweise biopsiert, sodass der Histopathologie ein hoher diagnostischer Stellenwert zukommt. Das therapeutische Vorgehen ist in aller Regel chirurgisch. Dafür kommen vollständige Exzision oder die Kürettage mit Zementierung (Polymethylmethacrylat) des entstandenen Hohlraumes in Frage. Zur Senkung des Rezidivrisikos werden lokale Verfahren wie die Phenolisation, die Kryochirurgie und die Kauterisierung adjuvant eingesetzt. Lokalrezidive nach einfacher Kürettage sind keine Seltenheit. Der Gebrauch eines oder mehrerer Adjuvanzien kann das Risiko hierfür signifikant senken *(Balke et al. 2008)*. Im seltenen Fall einer Metastasierung wird der RANKL-Antikörper Denosumab als zielgerichtetes Therapeutikum eingesetzt. Auch in Fällen, bei denen der Primärtumor schwierig operabel ist oder eine Operation mit einer deutlich erhöhten Morbidität einherginge, ist Denosumab Bestandteil der Therapie und wird neoadjuvant zur präoperativen Tumorreduktion eingesetzt *(Rutkowski et al. 2015)*. Vereinzelt wird allerdings von Fällen berichtet, in denen sich nach Therapie eines RZT mit Denosumab Osteosarkome entwickelten *(Broehm et al. 2015).*

1.4 Morphologie und Pathophysiologie

Histologisch besteht der RZT aus mindestens drei Zellpopulationen: den mononukleären Stromazellen, die sich aufteilen in eine *H3F3A*-mutierte Population und eine CD68-positive nicht-neoplastische Population sowie den namensgebenden mehrkernigen Riesenzellen vom Osteoklastentyp. Letztere fallen zuerst ins Auge, da sie meist zahlreich sind und in Einzelfällen bis zu 100 Kerne aufweisen. Sie sind, ebenso wie die einkernigen Vorläuferzellen der Riesenzellen, CD68-positiv. Die *H3F3A*-mutierte einkernige Zellpopulation sezerniert RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor kb-Ligand) und führt zur Transformation der CD68-positiven Makrophagen zu osteoklastären Riesenzellen, welche dann für die Destruktion des Knochens verantwortlich sind. Die eigentliche neoplastische Komponente des Tumors sind also die Stromazellen, während der riesenzellbedingte Knochensubstanzverlust die Folge der RANKL-Sekretion darstellt.

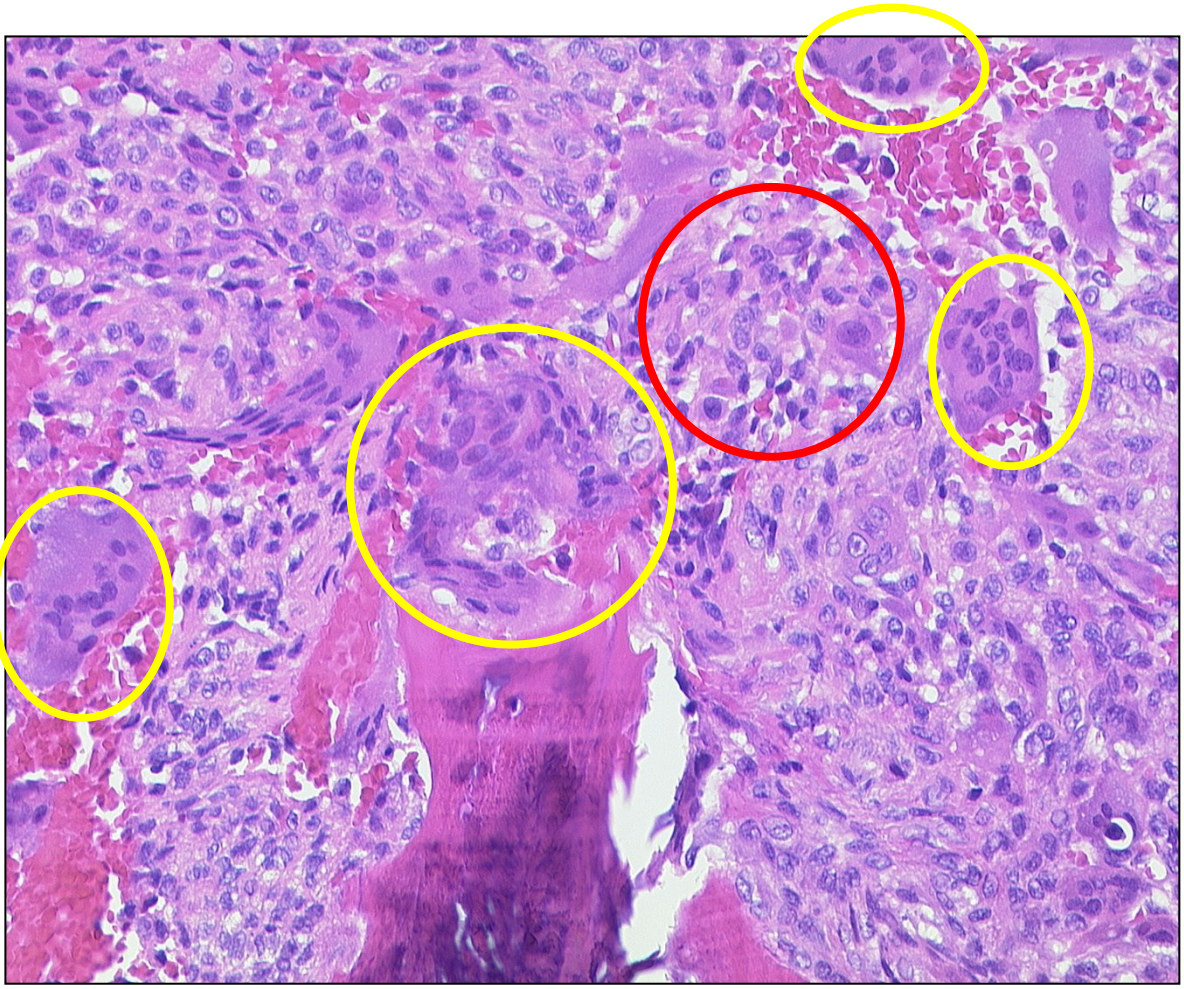


Abb. 1: Histologisches Beispielbild eines Riesenzelltumors
Vier osteoklastäre Riesenzellen sind gelb umrandet. Ein Areal mit mononukleären Stromazellen ist exemplarisch durch den roten Kreis gekennzeichnet. In der Bildmitte liegt eine Riesenzelle in einer Resorptionslakune eines Knochentrabekels.
Mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pathologie der Universität Ulm

1.5 Differentialdiagnose

Aufgrund der ähnlichen Morphologie anderer riesenzellhaltiger Läsionen ist die differentialdiagnostische Einordnung des RZT mitunter problematisch. Bereits 1940 wurde ein System der histologischen Einstufung des Tumors postuliert (Jaffe et al., 1940), ebenso existiert ein auf radiologischen Kriterien basierendes Einstufungssystem. Vergleichende Untersuchungen konnten jedoch keinem System einen signifikanten prognostischen Wert attestieren. Die radiologische Einstufung des Tumors korreliert nicht in ausreichendem Maße mit Aggressivität oder der Häufigkeit von Rezidiven bzw. Metastasen *(Wang et al., 2012)*. Differentialdiagnostisch muss der RZT von einer Reihe riesenzellhaltiger Läsionen abgegrenzt werden. Dazu zählen unter anderem das Riesenzellgranulom, der sogenannte braune Tumor bei Hyperparathyreoidismus, die aneurysmatische Knochenzyste und das nicht-ossifizierende Fibrom oder das riesenzellhaltige Osteosarkom. Da die osteoklastische Riesenzelle bei weitem kein Alleinstellungsmerkmal des RZT ist, stellt die korrekte Diagnose auch für geübte Pathologen unter Umständen eine Herausforderung dar.

1.6 *H3F3A*-Mutation

Seit 2013 ist bekannt, dass der RZT in den meisten Fällen durch eine Punktmutation im Gen *H3F3A* charakterisiert ist *(Behjati et al., 2013).* Der Prozentsatz an RZT, die diese Mutation tragen, ist so hoch, dass man von einer Driver-Mutation sprechen kann. Daraus ergibt sich ein hoher diagnostischer Stellenwert. Die Mutation resultiert in einem Aminosäurenaustausch; das Glycin an Position 34 des kodierten Proteins wird durch ein Tryptophan ausgetauscht. Im Folgenden wird diese Mutation als *G34W* bezeichnet, wobei G für Glycin und W für Tryptophan steht. Hierbei muss beachtet werden, dass für dieselbe Mutation auch die Bezeichnung G35W verwendet wird. Grund dafür ist ein Unterschied in der Zählweise von Aminosäuren eines Proteins. Teilweise wird das Methionin zu Beginn einer Aminosäuresequenz mitgezählt, teilweise wird es aber ausgelassen, da es sich am Beginn einer jeden solchen Sequenz befindet. In der vorliegenden Arbeit wird durchgängig die erste Zählweise verwendet, in der die RZT-Mutation als *G34W* benannt wird.

1.7 Histone und Epigenetischer Code

Das Gen *H3F3A*, in dem sich die Mutation G34W befindet, kodiert das Histon H3.3. Histone sind Proteine, die Teil des Chromatins sind und somit eine Verpackungseinheit der DNA darstellen. Je acht Histone bilden mit der um sie in 1,65 Windungen herum gewickelten DNA ein Nukleosom. Die Nukleosomen reihen sich zu Chromatinfasern aneinander, aus welchen wiederum das Chromosom besteht. In jedem Nukleosom sind verschiedene Unterarten von Histonen enthalten, wobei man die Unterarten H1, H2A, H2B, H3 und H4 unterscheidet. Bei H3.3 handelt es sich um eine Variante der Unterart H3. Allen Histonen ist gemeinsam, dass sie einen zentralen kugelförmigen Anteil und einen daraus herausragenden Histonschwanz haben. Die Aminosäuren dieses Schwanzes können von verschiedenen Enzymen modifiziert werden, beispielsweise durch Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung. Diese Modifikationen spielen eine Rolle für den Aufbau der Chromatinstruktur. Die Gesamtheit der Histonschwanzmodifikationen definiert den sogenannten Histoncode. Gemäß der Histon-Code-Hypothese ist dieser für die Kontrolle der DNA-Transkription von Bedeutung. In welcher Weise diese Kontrolle funktionieren könnte, ist bestenfalls im Ansatz verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Dabei ist noch nicht geklärt, ob es tatsächlich einen einheitlichen Code gibt, weswegen man nach wie vor von einer Hypothese sprechen muss. Es konnten jedoch schon vereinzelt Korrelationen zwischen bestimmten Histonmodifikationen und Förderung oder Hemmung der Transkription beobachtet werden.

In dieser Hypothese werden Histonmodifikationen als Teil des sogenannten Epigenoms betrachtet. Ein weiterer Teil ist die Methylierung von DNA, welche die Transkription und damit die genetische Aktivität bestimmter DNA-Bereiche beeinflusst. Beispielsweise konnte festgestellt werden, dass sich die Methylierungsmuster in bestimmten Tumoren von gesundem Gewebe unterscheiden und somit medizinisch relevant sind. Histonmodifikationen und DNA-Methylierung stehen dabei möglicherweise durch nicht vollständig verstandene enzymatische Wechselwirkungen in Zusammenhang.

Ein Beispiel für die korrekte Bezeichnung einer Histonmodifikation sieht wie folgt aus: es werden die Histonunterart, die Aminosäure und die Modifikation angegeben. „H3K36me3“ steht somit für die dreifache Methylierung (me3) des Lysins (K) an Position

36 in Histon H3. H3K36me3 spielt in dieser Arbeit eine wichtige Rolle. Es wird gemeinhin mit transkriptorischer Aktivität assoziiert und mit Prozessen wie DNA-Reparatur in Zusammenhang gebracht *(Li et al. 2013)*. Auch auf einen Zusammenhang zwischen H3K36me3 und DNA-Methylierung im Allgemeinen gibt es Hinweise *(Dhalayan et al. 2010, Morselli et al. 2015)*.

1.8 Histonmethylierung im RZT

Eine mit der RZT-Mutation vergleichbare Mutation findet sich in einem pädiatrischen diffusen high-grade-Gliom, der H3-G34-Mutante des diffusen hemisphärischen Glioms, das nach früherer Nomenklatur zu den sogenannten juvenilen Glioblastomen zählte *(Fontebasso et al. 2013, WHO Classification of Tumours)*. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine Mutation im *H3F3A*-Gen, die in einer vertauschten Aminosäure an Position 34 des Histonschwanzes H3.3 resultiert. Bei der im RZT vorkommenden Mutation G34W wird ein Glycin durch ein Tryptophan ausgetauscht, wohingegen die Glioblastommutation zum Einbau von Valin oder Arginin führt. Experimentell konnte bei Glioblastomzelllinien ein Zusammenhang zwischen G34-Mutationen und fehlender Methylierung an H3K36 nachgewiesen werden *(Lewis et al., 2014)*. Wenn das Wildtyp-Glycin, welches über keinen Aminosäurerest verfügt, durch beispielsweise Tryptophan ersetzt wird, befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Lysins an Position 36 ein großer Aminosäurerest, der Enzyminteraktionen möglicherweise beeinflusst.

Ein Enzym, das mit der betroffenen Stelle interagiert, ist die Histonmethyltransferase SETD2. Sie ist speziell für die Trimethylierung von K36 zuständig *(Edmunds et al, 2008)*. *SETD2*-Mutationen finden sich in mehreren Tumorarten, darunter das klarzellige Nierenkarzinom *(Duns et al. 2012)*, das G34-mutierte diffuse hemisphärische Gliom *(Fontebasso et al. 2013)* oder akute Leukämien *(Zhang et al. 2012, Zhu et al. 2014)*. Das Zusammenspiel von SETD2 und H3K36me3 in Hinsicht auf die Tumorgenese ist bisher nicht vollständig verstanden, sodass sich hierbei keine eindeutig gerichtete Kausalität erkennen lässt, die man auf den RZT übertragen könnte.

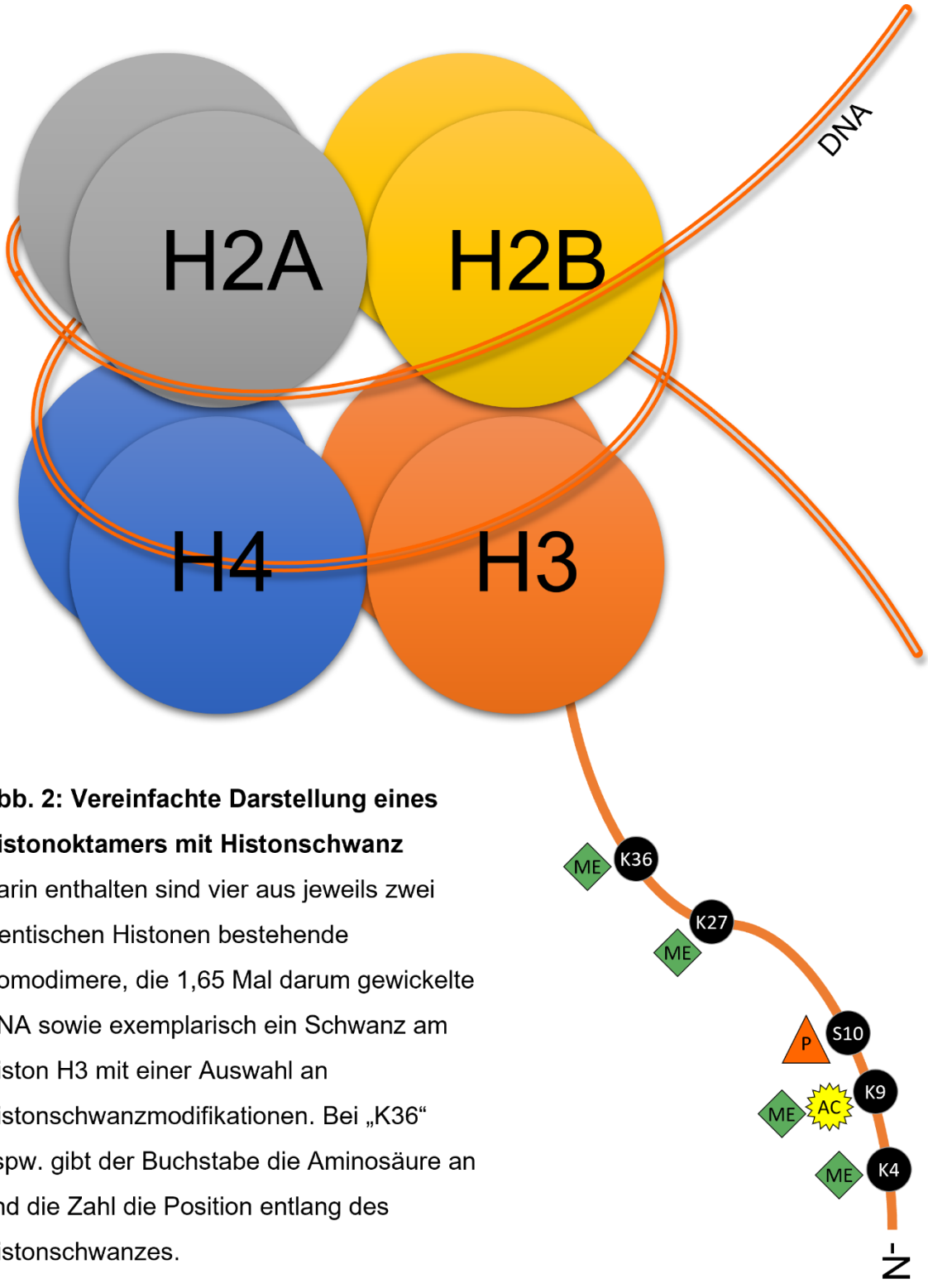


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung eines Histonoktamers mit Histonschwanz

Darin enthalten sind vier aus jeweils zwei identischen Histonen bestehende Homodimere, die 1,65 Mal darum gewickelte DNA sowie exemplarisch ein Schwanz am Histon H3 mit einer Auswahl an Histonschwanzmodifikationen. Bei „K36“ bspw. gibt der Buchstabe die Aminosäure an und die Zahl die Position entlang des Histonschwanzes.

DNA=Desoxyribonukleinsäure

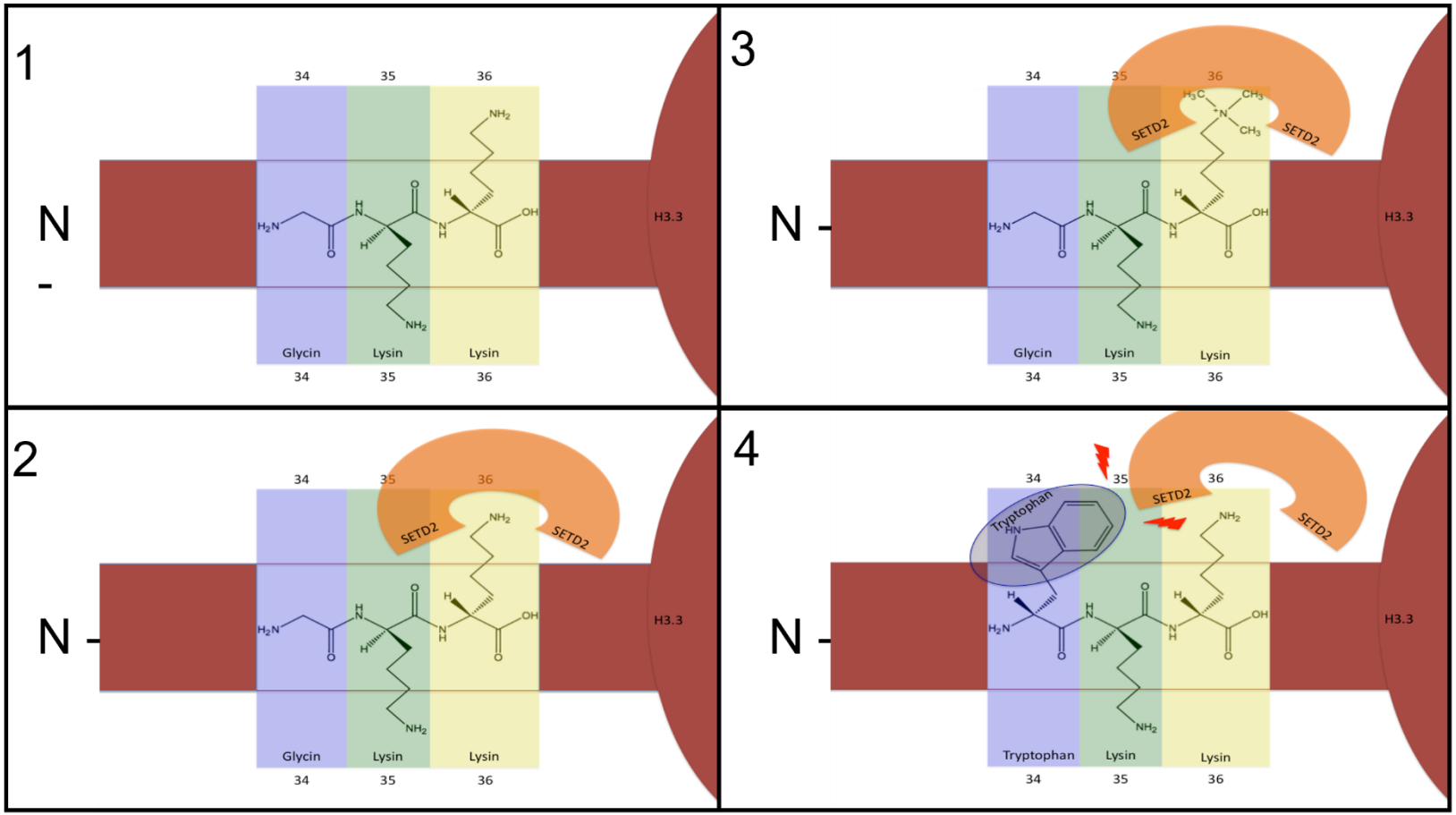


Abb. 3: Schematische Detailansicht des Histonschwanzes von Histon H3

Die Strukturformeln der Aminosäuren an den Positionen 34 bis 36 innerhalb des Histonschwanzes sind als Keilstrichformel dargestellt und einzeln farblich unterlegt. Histonkörper und -schwanz sind dunkelrot.

Bild 1 zeigt die Konfiguration ohne chemische Modifikatoren

Bild 2 stellt zusätzlich in orange die Histonmethyltransferase SETD2 dar.

Bild 3 zeigt SETD2 mit den drei Methylgruppen an Lysin 36

Bild 4 stellt die vermutete sterische Wechselwirkung zwischen dem Tryptophanrest an Position 34 und SETD2 an Position 36 dar, die verhindert, dass das Enzym seine Funktion ausüben kann

1.9 Erklärung zu den teilweisen Vorpublikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:
Lüke J., von Baer A., Schreiber J., Lübbehüsen C., Breining T., Mellert K., Marienfeld R., Schultheiss M., Möller P., Barth T.F.E.: *H3F3A* mutation in giant cell tumour of the bone is detected by immunohistochemistry using a monoclonal antibody against the G34W mutated site of the histone H3.3 variant. Histopathology, 71: 125-133 (2017)
Daneben wurden Teile dieser Dissertation und vier Abbildungen vom Autor bereits auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie in Berlin (2016) als Vortrag mit dem Titel *„H3F3A-Mutationen in Riesenzelltumoren (RZT) des Knochens sind assoziiert mit einem verringerten Nachweis von H3K36me3“* vorgestellt.

1.10 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorgelegte Dissertation hat das Ziel, epigenetischen Fragestellungen zum RZT nachzugehen und einen eventuellen Zusammenhang zur Mutation G34W zu untersuchen. Die Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten für den RZT stellt dabei das übergeordnete Ziel dar. Der wesentliche Fokus der Arbeit liegt auf immunhistochemischer Untersuchung. Darüber hinaus kommen molekularpathologische Methoden zum Einsatz. Es wurden sowohl Zelllinien als auch archivierte Gewebeproben untersucht.
Genauer gesagt geht es um folgende Fragen:
1: Wie ist H3K36me3 im RZT im Vergleich zu anderen Geweben exprimiert?
2: Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Mutation G34W und H3K36me3-Expression auf Proteinebene im RZT?
3: Eignet sich der H3K36me3-Nachweis für die Diagnostik der Mutation G34W?

2. Material und Methoden

2.1 Einhaltung ethischer Richtlinien

Alle für die Erstellung dieser Arbeit notwendigen Materialien bzw. Gewebeproben wurden gemäß der Deklaration von Helsinki behandelt. Die Forschungsarbeiten wurden von der Ethikkommission der Universität Ulm bestätigt (Referenznummer 440/15) und genügen damit den Standards der Zentralen Ethikkommission der Bundesärztekammer.

2.2 Riesenzelltumorkollektiv

Im Zuge vorangegangener Forschungen in unserem Institut war bereits ein Kollektiv von Riesenzelltumoren und anderen riesenzellhaltigen Läsionen (Aneurysmatische Knochenzyste/AKZ, brauner Tumor bei Hyperparathyreoidismus, riesenzellhaltige Osteosarkome) aus der Gewebebank des Instituts für Pathologie der Universität Ulm erstellt worden. Darin wurden neben Diagnosezeitpunkt und klinischen Verlaufsdaten auch Alter und Geschlecht der Patienten festgehalten.
Das Kollektiv wurde stetig um neue in der Universitätsklinik bearbeitete Fälle erweitert. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit befanden sich im Kollektiv 25 *H3F3A*-mutierte RZT sowie 10 zusätzliche riesenzellhaltige Läsionen, wobei neben der Mutationsanalyse alle Fälle erneut mikroskopisch begutachtet worden waren.

2.3 Prinzip der Tumorforschung mithilfe von Zelllinien

Seit der Etablierung der weltweit ersten immortalisierten Tumorzelllinie werden diese aus immortalisierten menschlichen Tumorzellen bestehenden Zelllinien als Modell für Tumore genutzt, da sie leicht verfügbar sind und die experimentelle Forschung wesentlich vereinfachen. Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien aufgelistet.

2.4 Riesenzelltumorlinien

Diese beiden Linien wurden im Vorfeld dieser Arbeit in Ulm etabliert. Dabei wurde mit der Abteilung für Unfallchirurgie der Universitätsklinik zusammengearbeitet, um unmittelbar nach Resektion eines RZT die Weiterverarbeitung des Tumorgewebes zu

einer Zelllinie zu ermöglichen. Das Vorhandensein der *H3F3A*-Mutation wurde dabei mittels Gensequenzierung überprüft.

2.5 Vergleichskollektiv

Im Sinne einer Kontrollgruppe wurde als Vergleich zu den Riesenzelltumorlinien ein Kollektiv aus weiteren Tumorzelllinien zusammengestellt. Die Zusammensetzung des Kollektivs wurde bewusst heterogen gestaltet, um eine möglichst große Bandbreite von Zelllinientypen abzubilden. Die Vergleichslinien wurden ebenfalls mittels Sequenzierung auf ihren *H3F3A*-Status überprüft.

Tabelle 1: Auflistung des Zelllinienkollektivs und der relevantesten Eigenschaften

ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Name	**Zelltyp**	**Ursprung**	***H3F3A*-Status**
U-GCT1	Riesenzelltumor, mononukleäre Komponente	Ulm, 40m, proximale Tibia	*H3F3A*-Mutation pG34W
U-GCT2	Riesenzelltumor, mononukleäre Komponente	Ulm, 17f, proximale Tibia	*H3F3A*-Mutation pG34W
Sk-UT1	Leiomyosarkom	ATCC	*H3F3A*-Wildtyp
Sk-LMS1	Leiomyosarkom	ATCC	*H3F3A*-Wildtyp
U-CH1	Chordom	Ulm, 56m sakral	*H3F3A*-Wildtyp
U-CH12	Chordom	Ulm, 83m sakral	*H3F3A*-Wildtyp
L540	Hodgkin-Lymphom	DSMZ	*H3F3A*-Wildtyp
U-2940	B-Zell-Lymphom	DSMZ	*H3F3A*-Wildtyp
Karpas 1106	B-Zell-Lymphom	Sigma-Aldrich	*H3F3A*-Wildtyp
LCL B-6288	Lymphoblastoide Zelllinie	Institut für Pathologie, Ulm	*H3F3A*-Wildtyp
MCF-7	Mammakarzinom	DSMZ	*H3F3A*-Wildtyp
Cal 51	Mammakarzinom	DSMZ	*H3F3A*-Wildtyp

2.6 Arbeiten mit Zellen

Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO_2-haltiger Luft und 95% Luftfeuchtigkeit expandiert. Wenn die Zellkulturflaschen geöffnet wurden, geschah dies stets in einer laminar-flow-Sicherheitswerkbank (Flow). Im Inneren dieser Flow sorgt Überdruck dafür, dass kontinuierlich Luft nach außen strömt, wodurch eine Kontamination des Innenraumes beispielsweise mit Bakterien oder Pilzen erschwert wird. Vor Beginn und nach Abschluss der Arbeiten wurde die Arbeitsfläche mit 70%-Ethanol gereinigt und über mindestens 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

2.6.1 Zellwachstum und Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem Nährmedium kultiviert (IMDM/RPMI 4:1, 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin 2 mM). Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Vor Erreichen einer zu dichten Bedeckung des Bodens der Kulturflasche (vollständige Konfluenz) wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit auf 37°C erwärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Um die Zellschicht vom Boden abzulösen, wurden anschließend 2,5ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, die Flasche verschlossen und für 2 Minuten zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt. Mit bloßem Auge und unter dem Mikroskop wurde der Grad der Ablösung der Zellen vom Flaschenboden kontrolliert und gegebenenfalls mit Klopfen verbessert, damit alle Bestandteile anschließend im Nährmedium gelöst werden konnten. Je nach Bedarf wurde nun entweder lediglich die Zellzahl auf ein gewünschtes Maß reduziert und der Rest verworfen, oder die Zellsuspension auf zwei Zellkulturflaschen verteilt.

2.6.2 Zellzählung

Die Anzahl der Zellen in einer Kulturflasche wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen erst mithilfe von Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und in Nährmedium gelöst in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen verbracht. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 1000rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben. Darin befinden sich in 8 großen Quadraten jeweils 16 kleinere Quadrate, mit deren Hilfe die Zellen gezählt werden. Multipliziert man die

durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit 10000, erhält man die Anzahl der Zellen in 1ml der verwendeten Zellsuspension.

2.6.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert, zentrifugiert und gezählt. Dann wurden ca. 100 000 Zellen im Einfriermedium (mit DMSO als Frostschutz) resuspendiert und in ein gekühltes Einfrierröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden in ein Einfriergerät gegeben, wo sie mit Schaumstoff und Isopropanol umgeben sind. Das Gerät wurde anschließend in einen Gefrierschrank (bei -80°C) gegeben, wo die Zellen kontrolliert um 1°C pro Stunde bis auf -80°C heruntergekühlt wurden. Nach mindestens drei Tagen wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6.4 Auftauen von Zellen

Das aus dem flüssigen Stickstoff genommene Röhrchen wurde in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten kontinuierlich insgesamt 5ml warmes Nährmedium in die Zellsuspension gegeben. Anschließend wurde die Lösung über 10 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in warmem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Um auch die letzten Reste DMSO aus den Zellen zu eliminieren, wurde nach 24 Stunden das Nährmedium nochmals ausgetauscht.

2.6.5 DNA-Isolation aus Zelllinien

Um die genomische DNA aus den Zelllinien zu gewinnen, wurde das zelluläre Material mittels einer Säulenreinigung aufgetrennt. Die Reinigung wurde mithilfe des QIAmp DNA-Mini-Kits (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben erst gewaschen, trypsiniert und dann mit 10ml Nährmedium in Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach 5 Minuten in der Zentrifuge bei 1000rpm wurde das entstandene Zellpellet gemäß den Herstellerangaben im Kit weiterverarbeitet. Der DNA-Gehalt des entstandenen Lysates wurde photometrisch bei 280nm bestimmt. Die so gewonnenen DNA-Lysate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.6.6 Herstellung von Zellblockschnitten

Zunächst wurde aus den Zellen einer Zellkulturflasche ein Paraffinblock hergestellt. Dazu wurde der Inhalt der Kulturflaschen gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml IMDM resuspendiert und das Röhrchen mit absolutem Ethanol auf 10ml aufgefüllt. Anschließend wurde wieder für fünf Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Tropfen Hämalaun angefärbt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit der Öffnung nach unten auf ein Filterpapier gestellt, bis sich die Flüssigkeit entleert hatte und sich die festen Bestandteile in einem Haufen auf dem Filterpapier befanden. Dieses Papier wurde gefaltet in eine Einbettkassette gelegt und darin in Formalin gelegt. Anschließend wurde mittels der Kassette ein standardmäßiger Paraffinblock hergestellt. Von diesem konnten dann 2-5µm dicke Leerschnitte zur weiteren Verwendung hergestellt werden.

2.6.7 *H3F3A*-Mutationsanalyse

Die Analyse von Zelllinien-DNA auf die charakteristische Punktmutation des Riesenzelltumors erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Diese Methode kommt institutsintern standardmäßig zur diagnostischen Mutationsanalyse zum Einsatz. Als Ausgangsmaterial wurde die wie oben beschrieben aus Zelllinien gewonnene DNA verwendet. Die für die Mutationsanalyse relevante DNA-Sequenz wurde zunächst mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) amplifiziert. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

PCR-Protokoll

25µl Master Mix S

0,5µl Primer Mix (jeweils 25pmol/Primer)

21,5µl H_2O

3µl DNA-Template (Analysematerial, Positiv- oder Negativkontrolle)

95°C 5 min

2x [95°C 30 sec; 62°C 30 sec; 72°C 30 sec]

2x [95°C 30 sec; 60°C 30 sec; 72°C 30 sec]

37x [95°C 30 sec; 58°C 30 sec; 72°C 30 sec]

72°C 10 min

10°C ∞

Primer

Forward: 5'-cgt tgt aaa acg acg gcc agt gaa ttg tca tgg ctc gta caa agc aga -3'

Reverse: 5'-gca aaa agt ttt cct gtt atc ca-3'

Hersteller: Biomers, Ulm, Deutschland

Danach wurden die PCR-Produkte in einem 1,5%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt (U=120V). Nach der Auftrennung werden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten, um sie von eventuell die Sequenzierung beeinträchtigenden Primern und anderen Verunreinigungen zu befreien. Dazu wurde eine UV-Werkbank benutzt. Die DNA aus der ausgeschnittenen Bande wurde mithilfe des peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (VWR International, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben gewonnen.
Anschließend wurden die Sequenzierungsprodukte mit SPRI CleanSEQ Magnetic Beads (Beckman-Coulter, Brea, Kalifornien, USA) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Auftrennung und Einlesung der finalen Produkte erfolgte mit dem GeXP Kapillar-Sequenzer derselben Firma. Die Sequenzen wurden mit der Software FinchTV ausgewertet.

2.7 Immunchemie

2.7.1 Funktionsprinzip der Immunchemie

Bei diesem Verfahren werden zelluläre Proteine in einem Gewebeschnitt mithilfe von Antikörpern angefärbt und so sichtbar gemacht. Die dafür üblicherweise verwendeten Antikörper werden über die Immunisierung von Wirtstieren (z.B. Maus, Hase) gewonnen. Bevor diese Antikörper in bereits paraffinfixiertem Gewebe binden können, muss das Gewebe bestimmten Vorbehandlungen unterzogen werden, da durch die Fixierung chemische Denaturierungsvorgänge die Proteinstrukturen verändern und eine verlässliche Antikörperbindung zumindest erschweren, wenn nicht gar unmöglich machen. Es stehen verschiedene etablierte Vorbehandlungsmethoden zur Verfügung, um die Antigene im Gewebe zu „demaskieren“. Die bestgeeignete Art der Vorbehandlung muss für gewöhnlich im Einzelfall mit Versuchsreihen bestimmt werden, wobei nicht selten der Hersteller hierfür einen Vorschlag liefert. Im Folgenden werden die für diese Arbeit eingesetzten Vorbehandlungsmethoden aufgelistet. Allen Vorbehandlungen ging die Entparaffinierung der 2µm dicken Leerschnitte mithilfe von Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe voraus.

2.7.2 Methoden der Vorbehandlung

1) Vorbehandlung im Dampfgarer (Steamer): die Objektträger wurden für 20 Minuten in einer Küvette mit vorbereitetem Citratpuffer (pH 6,1) bzw. Tris/EDTA-Puffer (pH 8,0 oder 9,0) bei 98°C inkubiert. Danach wurde die Küvette in Eiswasser für 10 Minuten abgekühlt und die Objektträger zum Schluss in Aqua dest. gespült.

2) Vorbehandlung in der Mikrowelle: die Objektträger wurden in einer Küvette bei 600 Watt in der Mikrowelle für 20 Minuten in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) erhitzt, die Küvette unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und die Objektträger in Aqua dest. gespült.

3) Vorbehandlung im Schnellkochtopf: die Objektträger wurden bei 150°C für 20 Minuten im Schnellkochtopf bei geschlossenem Deckel und höchster Druckstufe in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert. Anschließend wurden sie bei geöffnetem Deckel abgekühlt und zum Schluss mit Aqua dest. gespült.

2.7.3 Immunfärbungen

Der einzufärbende Bereich auf dem vorbehandelten Leerschnitt wurde mit einem Fettstift eingekreist, um zu verhindern, dass die Reagenzien aus dem relevanten Bereich des Objektträgers laufen. Danach wurde der Schnitt im PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden nacheinander der Primärantikörper, der biotinylierte Sekundärantikörper und Streptavidin auf das Präparat pipettiert, jeweils 30 Minuten inkubiert und nochmals gespült. Nach Inkubation der verschiedenen Antikörper wurde die Dako REAL Detection System Alkaline Phosphatase bzw. RED-Mischung (DAKO, Glostrup, Dänemark) gemäß Herstellerangaben hergestellt und 16 Minuten auf dem Präparat inkubiert. Anschließend wurde nochmals im Puffer gespült und Hämalaun als Gegenfarbe für fünf Minuten angewendet. Zum Schluss wurde der Schnitt in Leitungswasser gespült, mit dem Eindeckmedium Aquatex und einem Deckglas eingedeckt und zum Trocknen ausgelegt.

2.7.4 H3K36me3

Um herauszufinden, ob sich der H3K36me3-Antikörper als Surrogatmarker für die G34W-Mutation eignet, wurde das gesamte Ulmer Riesenzelltumorkollektiv sowie das Zelllinienkollektiv mithilfe dieses Antikörpers immunhistologisch untersucht. Der Antikörper kam in den Verdünnungen 1:8000 bzw. 1:15000 zum Einsatz. Für diese Färbung kam die Vorbehandlungsmethode im Steamer mit EDTA-Puffer (pH 9) zum Einsatz.

Bei der Auswertung wurde das Kollektiv ohne Kenntnis der jeweiligen Diagnose (blind) gesichtet und auf Grundlage der semiquantitativ ermittelten Expression von H3K36me3 entweder als „Mutierter Riesenzelltumor“ oder „Nicht mutierte riesenzellhaltige Läsion“ eingestuft. Diese Diagnose wurde festgehalten und mit der bereits in der Routinediagnostik erfolgten Mutationsanalyse nach PCR-Verfahren verglichen.

2.7.5 SETD2

Die Expression der Histonmethyltransferase SETD2 wurde ebenfalls mittels Immunfärbung überprüft. Der Antikörper kam dabei in einer Verdünnung von 1:75 nach Vorbehandlung im Schnellkochtopf zum Einsatz. Diese Färbung wurde sowohl für das RZT-Kollektiv als auch für die Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse der H3K36me3-Färbung und der SETD2-Färbung wurden verglichen.

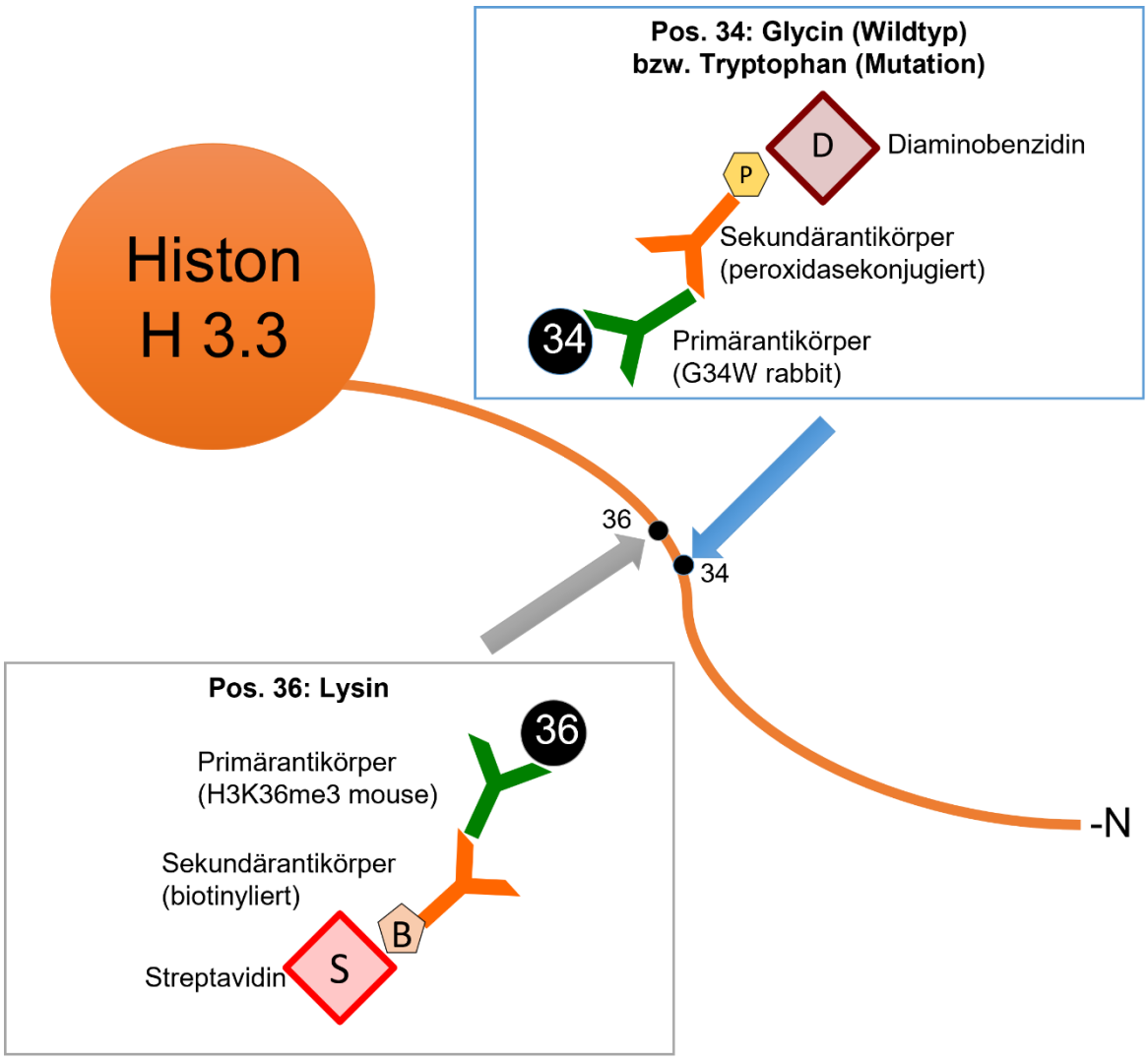


Abb. 4: Immunhistochemie

Schematische Darstellung der Immundoppelfärbung mit H3K36me3 und G34W.

G34W erzeugt ein braunes Farbsignal, während H3K36me3 ein rotes Signal erzeugt.

2.7.6 Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W

Wie bei der einfachen Immunfärbung wurde der Schnitt mit dem PAP-Pen markiert und im PBS-Puffer gespült. Die Schritte der einfachen Immunfärbung inklusive Vorbehandlung im Steamer bei pH 9 wurden bis einschließlich zur Färbung mit der RED-Detektionslösung durchgeführt. Dabei wurde als erster Primärantikörper der H3K36me3-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Im Fall, dass beide Primärantikörper von der gleichen Spezies stammen, müssen vor dem Auftragen des zweiten Primärantikörpers die Bindungsstellen erneut freigelegt werden. Das geschieht durch Erhitzen des Schnittes auf 90°C für 10 Minuten.

Für die Sichtbarmachung des zweiten Primärantikörpers (G34W, 1:50) kam das EnVision Detection System (DAKO, Glostrup, Dänemark) mit einem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper und einem auf Diaminobenzidin (DAB) basierenden chromogenen Detektionssubstrat gemäß Herstellerangaben zum Einsatz.

Zum Schluss wurde für fünf Minuten mit Hämalaun gegengefärbt, der Schnitt in Leitungswasser gespült, in Aquatex eingedeckt und getrocknet.

2.7.7 Gegenüberstellung Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W mit jeweiligen Einzelfärbungen

Um die Expressionen von H3K36me3 und G34W direkt miteinander zu vergleichen, wurde die doppelte Immunfärbung mit beiden entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Der H3K36me3-Antikörper wurde dabei 1:2000 verdünnt, der G34W-Antikörper 1:50. Exemplarisch wurden von einem mutierten RZT, einer mutierten RZT-Zelllinie und einem braunen Tumor bei Hyperparathyreoidismus (*H3F3A*-Wildtyp) jeweils einzelne Färbungen mit beiden Antikörpern durchgeführt und die drei Färbungen gegenübergestellt.

2.7.8 Doppelimmunfluoreszenzfärbung p63 und H3K36me3

Um die Expression von p63 und H3Ke6me3 gegenüberzustellen, wurde auch eine Doppelfärbung mit beiden Antikörpern durchgeführt. P63 wird typischerweise in der stromalen Komponente des RZT nukleär exprimiert. Die Färbungen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Schnitte wurden zuerst wie oben beschrieben entparaffiniert und dann im Steamer bei pH9 vorbehandelt, danach wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mithilfe von BSA blockiert. Anschließend wurde der erste

Antikörper (H3K36me3, 1:4000) eine Stunde inkubiert. Die nachfolgenden Schritte (auch alle Waschschritte, die wie bei der einfachen Färbung ablaufen) erfolgten in einem abgedunkelten Raum. Als nächstes wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Goat F(ab')2 anti-Mouse IgG (H+L)-Biotin, 1:400) (Dianova, Hamburg) für 30 Minuten inkubiert, danach das Streptavidin mit grün fluoreszierendem Marker (Streptavidin 488 Alexa Fluor conjugate, 1:800) (Thermofisher, Waltham, USA) für ebenfalls 30 Minuten. Bevor der nächste Primärantikörper inkubiert werden konnte, war hier ein Denaturierungsschritt bei 90°C über 10 Minuten auf einer Heizplatte erforderlich, da beide Primärantikörper von der Spezies Maus stammen. Nach diesem Schritt wurde p63 (1:50) für eine Stunde inkubiert, anschließend ein mit rot fluoreszierendem Marker kombinierter Sekundärantikörper (Cy3 anti-mouse, 1:200). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden die Schnitte noch 30 Minuten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Vectashield Antifade Mounting Medium eingedeckt.

2.8 LINE-1-Methylierungsanalyse

2.8.1 Prinzip der LINE-1-Methylierungsanalyse

Die LINE-1-Methylierungsanalyse dient als Surrogat für eine Methylierungsanalyse der kompletten genomischen DNA. LINE steht für „long interspersed nuclear element" und bezeichnet eine Gruppe von hochrepetitiven Retrotransposons (genetische Elemente mit flexibler Position im Genom), die bei vielen Eukaryoten vorkommen und beim Menschen ca. 20% des Genoms ausmachen. LINE-1 ist die mit Abstand größte und die einzige beim Menschen aktive Untergruppe. Die große Mehrheit aller LINEs ist durch Methylierung von CpG-Elementen in ihren Promoterregionen inaktiviert. Ein Verlust dieser Methylierung spielt möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen wie Kolonkarzinomen (Shigaki et al., 2013). Aufgrund der Tatsache, dass LINEs einen so großen Teil des menschlichen Genoms ausmachen, wird die Methylierung bestimmter LINE-Promoterregionen als Surrogat für die gesamtgenomische DNA-Methylierung eingesetzt. Für die Methode kommt neben Bisulfitkonvertierung von DNA und PCR ein Pyrosequenzierungs-Assay zum Einsatz. Als Ergebnis werden die methylierten Anteile von drei LINE-Promoterregionen in Prozent angegeben, woraus wiederum ein Mittelwert gebildet wird. Null und hundert Prozent wurden dabei festgelegt, indem zwei vom

Hersteller mitgelieferte Standards analysiert wurden. Das gesamte Zelllinienkollektiv wurde mit dieser Methode untersucht.

2.8.2 Methode

Für die repräsentative LINE-1-DNA-Methylierungsanalyse muss die DNA in bisulfitkonvertierter Form vorliegen. Bei dieser Methode wird jedes unmethylierte Cytosin in Uracil umgewandelt, die methylierten Cytosine dagegen bleiben unverändert. Dafür wurde das EZ DNA Methylation-Gold Kit von Zymo Research (Irvine, Kalifornien, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet, um die aus dem Zelllinienkollektiv extrahierte DNA zu konvertieren.
Die konvertierte DNA wurde mittels folgender PCR amplifiziert:

PCR-Protokoll

12,5µl Master Mix S
5µl Primer Mix (jeweils 10pmol/Primer)
6,5µl H_2O
1µl DNA-Template (Analysematerial, Positiv- oder Negativkontrolle)

95°C 15 min
45x [95°C 20 sec; 50°C 20 sec; 72°C 20 sec]
72°C 5 min
10°C ∞

Schließlich wurde die bisulfitkonvertierte und amplifizierte DNA mithilfe des PyroMark Q24 CpG LINE-1-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse des Zelllinienkollektivs

Die *H3F3A*-Mutationsanalyse ergab, dass nur die beiden RZT-Linien U-GCT 1 und U-GCT 2 die Mutation G34W tragen. Bei den restlichen Linien konnte diese Mutation nicht nachgewiesen werden, somit sind sie *H3F3A*-Wildtyp.

3.2 Immunchemie

3.2.1 Zelllinienkollektiv, H3K36me3 und SETD2

Tabelle 2: Semiquantitative Auswertung der Immunfärbungen des Zelllinienkollektivs

Auflistung der Zelllinien und Angabe der Häufigkeit des Signals in Zellkernen und Zytoplasma

	H3K36me3		SETD2	
	nukleär	zytoplasmatisch	nukleär	zytoplasmatisch
U-GCT 1	<10%		<10%	
U-GCT 2	<10%	90%	>90%	>90%
Sk-UT 1	15%		90%	
Sk-LMS 1	10%		35%	>90%
U-CH 1	<10%		10%	90%
U-CH 12	60%		80%	
L 540	75%		60%	
U-2940	20%		75%	40%
Karpas 1106	35%		25%	
LCL B6288	60%			
MCF 7	<10%		15%	90%
Cal 51	25%		20%	>90%
U-MM 2	65%		80%	

In der ersten RZT-Linie U-GCT 1 zeigte sich kein positives Signal für H3K36me3, obwohl eine Mutation nachgewiesen worden war. Das gleiche galt für U-GCT 2, die ein diffuses zytoplasmatisches Signal zeigte, während die Zellkerne jedoch alle negativ waren. GCT 1 zeigte kein Signal für SETD2, wohingegen GCT 2 stark nukleär positiv für SETD2 war. Von den Kontrolllinien zeigten sich sechs nukleär positiv für H3K36me3, drei schwach positiv

und zwei negativ. SETD2 war zytoplasmatisch positiv in sieben der Kontrolllinien und schwach nukleär positiv in drei. Eine Linie konnte in dieser Immunfärbung nicht ausgewertet werden. Neben dem Signal im Zellkern war in einigen Fällen auch ein Signal im Zytoplasma der untersuchten Zellen zu beobachten, wobei dies bis auf eine Ausnahme nur in der SETD2-Färbung auftrat.

3.2.2 Fallkollektiv, H3K36me3

In den *H3F3A*-mutierten RZT konnte in der Immunfärbung gegen H3K36me3 ein charakteristisches Mischbild aus H3K36me3-positiven und -negativen Zellen im Sinne einer Minderexpression festgestellt werden. Als Vergleich wurden die anderen riesenzellhaltigen, aber nicht *H3F3A*-mutierten Läsionen aus dem Fallkollektiv herangezogen.

Das gesamte Kollektiv wurde in der HeK36me3-Färbung einem erfahrenen Pathologen vorgelegt, um die Diagnose „*H3F3A*-mutierter RZT“ auf Grundlage der Färbung zu überprüfen. Die durch diesen Test gewonnen Diagnosen wurden mit den Ergebnissen der vorher durchgeführten molekularpathologischen Diagnostik verglichen. Von den 25 mutierten RZT wurden 23 als vermindert H3k36me3 exprimierend erkannt und somit als mutierter RZT eingestuft. Von den 10 anderen riesenzellhaltigen Läsionen wurden 4 als hoch H3K36me3 exprimierend und somit als nicht mutierter Tumor eingestuft. Somit ergab sich für diesen Test eine Sensitivität von 92% bei einer Spezifität von 40%.

3.2.3 Doppelimmunfluoreszenz H3K36me3 + p63

In der Fluoreszenzfärbung mit H3K36me3 und p63 ließen sich einige Befunde aus der vorausgegangenen Immunfärbung mit H3K36me3 replizieren. Als Marker für die Aussagekraft der Färbung dienten die Riesenzellen mit ihrer charakteristischen Morphologie. Diese zeigten sich hier typischerweise nukleär positiv für H3K36me3 und nukleär negativ für p63. Die Zellkerne der mononukleären Zellen in Nachbarschaft der Riesenzellen wiesen hinsichtlich der Reaktion auf den H3K36me3-Antikörper ein Mischbild auf, ähnlich dem in den einfachen Immunfärbungen gegen H3K36me3 beobachteten Muster. In unmittelbarer Nachbarschaft der Zellkerne dieser Zellen ließ sich in über 95% der Fälle eine positive Reaktion auf den p63-Antikörper beobachten. Diese war jedoch nur in einem Teil der Fälle als nukleäre Reaktion zu beobachten, häufiger fand

sich das entsprechende Signal neben dem Zellkern. Zusammengefasst bestand die mononukleäre Tumorkomponente zum allergrößten Teil aus Zellen, die entweder nur eine Positivität für p63 im Zellkern aufwiesen, oder sich sowohl für H3K36me3 als auch für p63 anfärbten.

3.2.4 Immundoppelfärbung H3K36me3 + G34W

Die oben genannten Färbungen an den verschiedenen Präparaten wurden gegenübergestellt. In der G34W-Einzelfärbung zeigten sich viele positive Zellen im mutierten Riesenzelltumor, fast ausschließlich positive Zellen in der Riesenzelltumorlinie und vereinzelt positive Zellen neben einem unspezifischen zytoplasmatischen Signal im nicht *H3F3A*-mutierten braunen Tumor.
In der H3K36me3-Färbung zeigten sich im G34W-mutierten RZT zu 25% positive und 75% negative Zellkerne, in der RZT-Linie vereinzelt positive Zellen und im braunen Tumor 60% positive und 40% negative Zellkerne.
In der Doppelfärbung wurde G34W mittels eines braun färbenden Reagenzes detektiert und H3K36me3 mit einem rot färbenden. Im G34W-mutierten RZT zeigten sich mehrheitlich braun färbende mit einer geringen Anzahl rot färbender Zellkerne. Die RZT-Linie zeigte mehrheitlich braun färbende mit einigen wenigen doppelt positiven Zellen. Der braune Tumor zeigte mehrheitlich rote Zellen mit vereinzelt braunem Farbsignal im Hintergrund.

3.3 LINE-1

Die LINE-1-Analye des Zelllinienkollektivs zeigte ein heterogenes Bild. Die beiden RZT-Linien rangierten mit Mittelwerten von 40% bzw. 53% im unteren Mittelfeld. Zwei Kontrolllinien zeigten Methylierungswerte unterhalb der gegebenen Standards. Zwei weitere Linien zeigten mit den RZT-Linien vergleichbare Mittelwerte, während bei den restlichen sechs Linien deutlich höhere Methylierungswerte gemessen wurden. Allgemein fiel auf, dass der Wert für Position 1 jeweils der niedrigste der drei gemessenen war.
Der Vergleich der LINE-1-Werte mit den zuvor semiquantitativ gemessenen Werten aus den Immunfärbungen gegen H3K36me3 sowie SETD2 zeigte keine offensichtliche Korrelation, die sich auf das gesamte Kollektiv übertragen ließe.

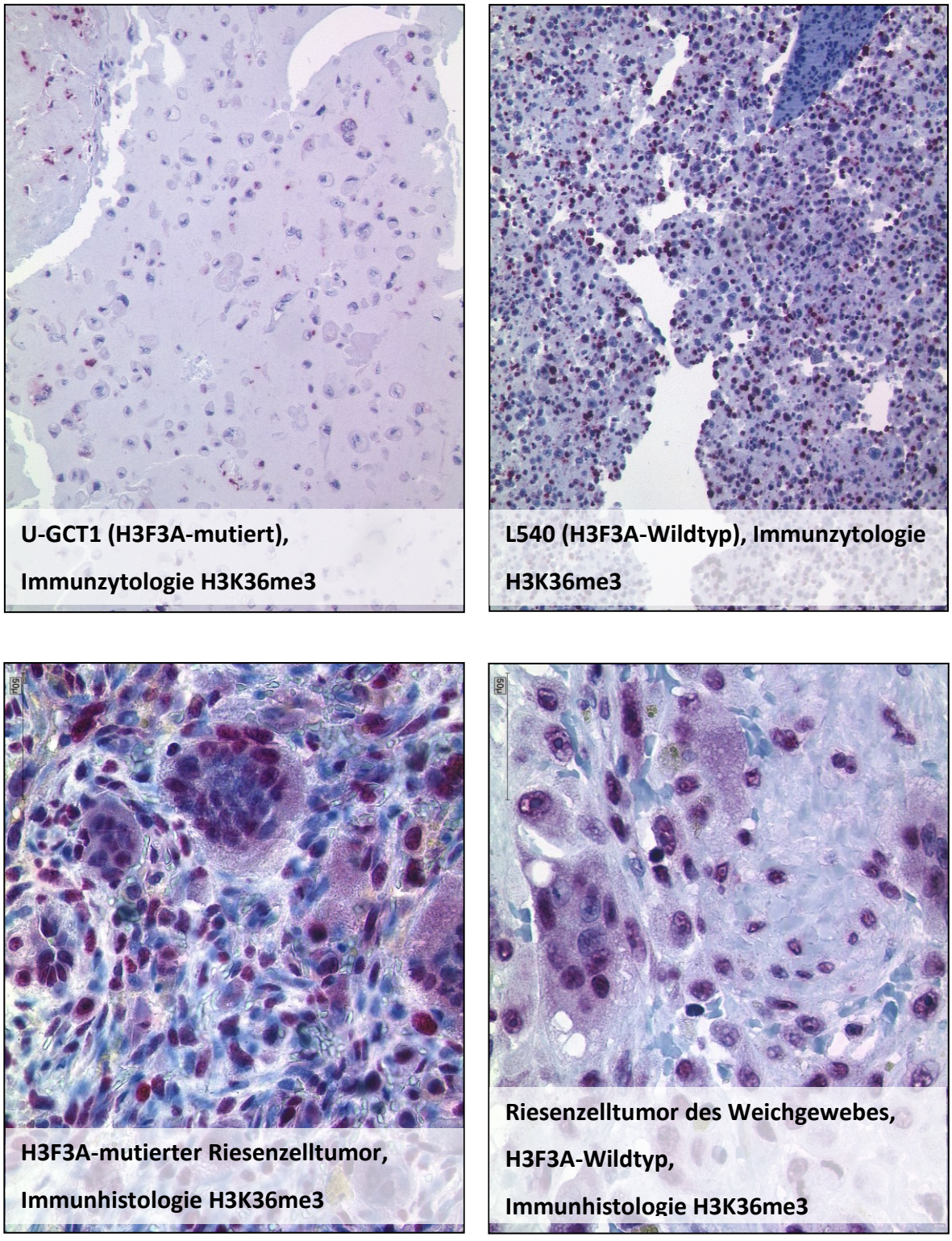


Abb. 5: H3K36me3-Färbungen

Gegenüberstellung verschiedener Schnitte mit H3K36me3-Immunfärbung

Oben links ausschließlich H3K36me3-defiziente Zellen, oben rechts positive und negative Zellen.

Unten links ein Mischbild aus positiven und negativen Zellen, unten fast nur positive Zellen.

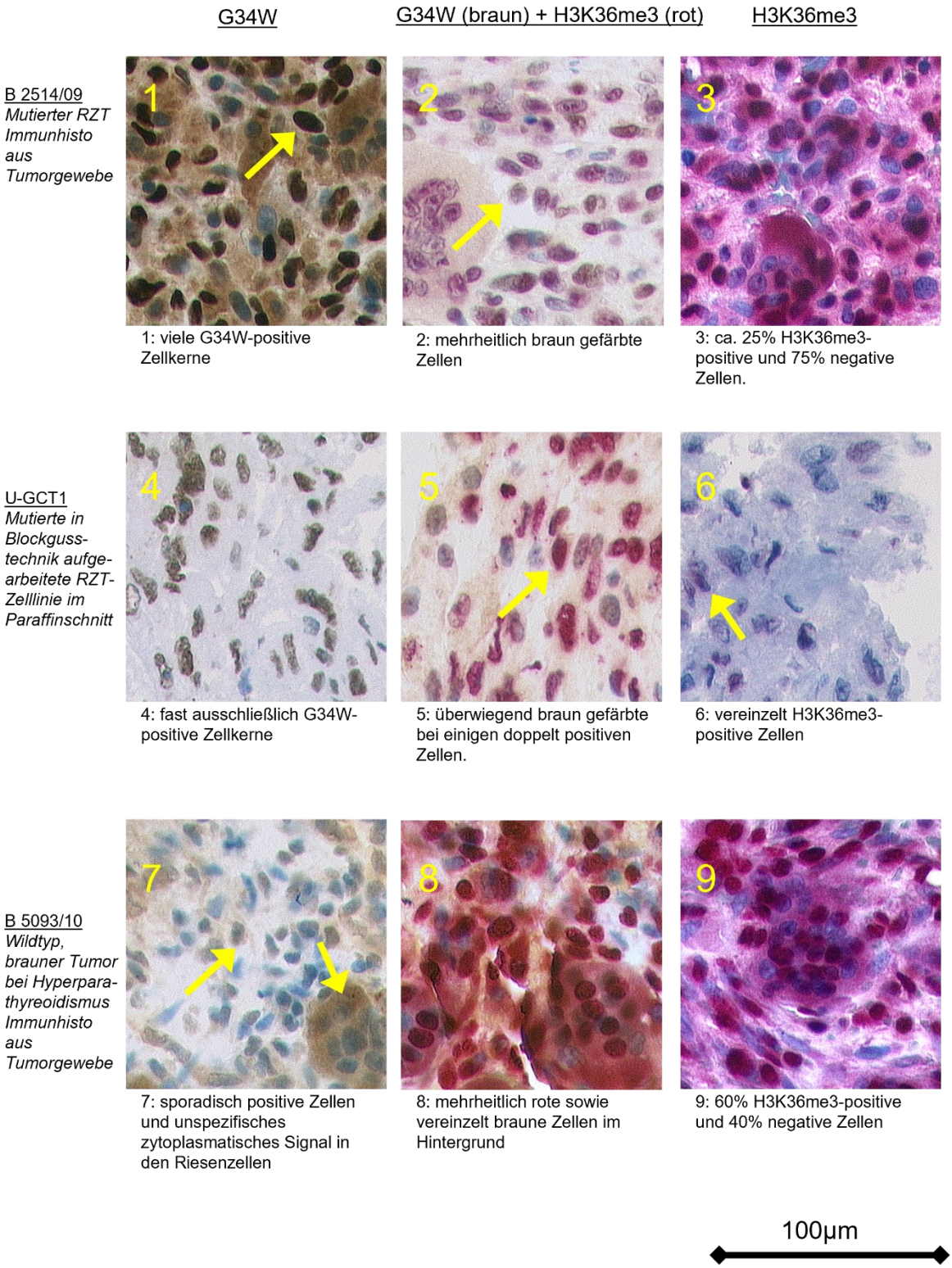


Abb. 6: Immundoppelfärbung G34W und H3K36me3

RZT=Riesenzelltumor des Knochens

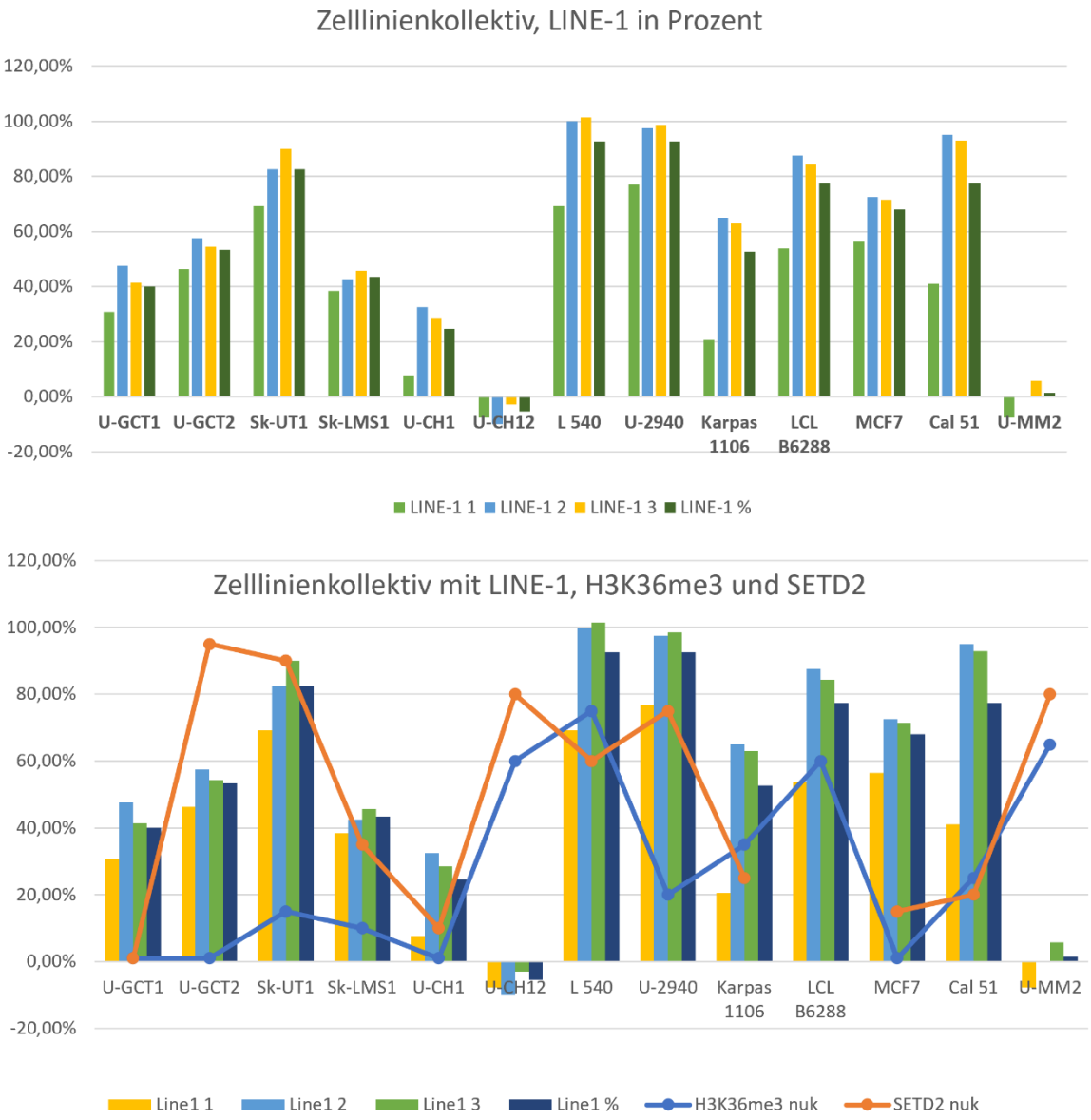


Abb. 7: Zusammenfassende Darstellung der LINE-1-Ergebnisse

Die Ergebnisse der LINE-1-Untersuchung der DNA-Methylierung sind in Prozent angegeben und als Säulendiagramm dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind im zweiten Diagramm zusätzlich die Ergebnisse der Immunfärbungen derselben Linien gegen H3K36me3 und SETD2 eingetragen. Letztere sind ebenfalls in Prozent angegeben, jedoch als Linie eingetragen, um zu verdeutlichen, dass es sich um verschiedene Untersuchungsmethoden handelt.

DNA=Desoxyribonukleinsäure; LINE-1=long interspersed nuclear element 1

4. Diskussion

Die Funktion von H3K36me3 steht maximal im Fokus aktueller Forschung, da diesem Molekül möglicherweise eine Schlüsselbedeutung in der Pathophysiologie des RZT zukommt. Es gibt Hinweise dafür, dass es sich um einen transkriptionsfördernden Faktor handelt, andererseits kann H3K36me3 aber auch repressiv auf Transkription wirken und wird darüber hinaus mit DNA-Reparatur und einer Vielzahl weiterer Prozesse in der Genregulation in Zusammenhang gebracht (*Li et al. 2013, Dhalayan et al. 2010, Morselli et al.*). Um die Expression von H3K36me3 im RZT mit der in anderen Geweben zu vergleichen, muss neben den RZT-Zelllinien anderes geeignetes Vergleichsmaterial verwendet werden. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kollektiv aus weiteren Tumorzelllinien wie Lymphom- und Mammakarzinomlinien, welche eine große Bandbreite an Zellen aus diversen Geweben abbilden sollen, stellt in dieser Hinsicht einen validen Ansatz dar.

Im Zelllinienmodell zeigten sich die beiden mutierten RZT-Linien in der H3K36me3-Färbung nukleär negativ. Von neun untersuchten nicht-RZT-Zelllinien zeigten sieben eine deutliche Expression von H3K36me3. Zwei andere Linien zeigten jedoch eine vergleichbar niedrige Expression von H3K36me3, somit kann allein mit den Ergebnissen dieses Versuches kein eindeutiger Zusammenhang zwischen G34W-Mutation und H3K36me3-Expression hergestellt werden.

Grundsätzlich ist zu bedenken, dass es sich beim Ausgangsgewebe aller verwendeten Zelllinien um Tumorgewebe handelt. Somit kann nicht von einer Vergleichbarkeit mit nicht neoplastischem Gewebe ausgegangen werden. H3K36me3 kann in den Zellen verschiedener Tumorarten wie dem klarzelligen Nierenkarzinom (*Duns et al. 2012*) oder dem juvenilen Glioblastom (*Fontebasso et al., 2013*) erniedrigt sein.

Die Arbeit von *Lewis et al. (2013)* legt in G34-mutierten diffusen hemisphärischen Gliomen einen Zusammenhang zwischen G34-Mutation und fehlender Methylierung an K36 nahe, was einen Hinweis für H3K36me3 als Surrogatmarker für eine Mutation an dieser Stelle hindeutet. Ursächlich für eine aberrante Methylierung von H3K36 könnte bspw. eine sterische Inhibition der Methyltransferase SETD2 sein.

Wir haben in der vorgelegten Arbeit die H3K36me3-Expression in einem RZT-Fallkollektiv beurteilt mit dem Ziel, diesen Marker als diagnostisches Werkzeug zu verwenden, um G34W-mutierte RZT zu erkennen. Bei einer Fallzahl von 25 mutierten RZT und 10

weiteren riesenzellhaltigen Läsionen wurden mutierte RZT mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von 40% erkannt.
Die exemplarischen Doppelfärbungen (Immunhistologie mit G34W und H3K36me3) zeigten G34W-mutierte Zellen in direkter Gegenüberstellung mit H3K36me3 exprimierenden Zellen, um eine mögliche Kolokalisation zu belegen. Ein eindeutiges Überwiegen von G34W-mutierten, aber nicht H3K36me3 exprimierenden Zellen im mutierten RZT bei einem gleichzeitigen Überwiegen H3K36me3 exprimierender nicht G34W-mutierter Zellen im z.B. braunen Tumor (*H3F3A*-Wildtyp) hätte für eine Verwendbarkeit von H3K36me3 als Surrogatmarker in der Diagnostik *H3F3A*-mutierter RZT gesprochen. Ein solch eindeutiger Befund konnte in dieser Analyse jedoch nicht erhoben werden.
Versuchsweise wurde, basierend auf einem früheren Versuch vor Beschreibung des G34W-Antikörers der Marker p63 als Surrogatmarker für die G34W-mutierten Zellen eingesetzt. Hierbei wurden von uns ähnliche Ergebnisse erzielt.
Es konnte auch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von H3K36me3 und SETD2 im Zelllinienmodell festgestellt werden, obwohl von den untersuchten 13 Zelllinien 9 SETD2 in einer mit der H3K36me3-Expression vergleichbaren Größenordnung exprimierten.
Aufgrund dieser nicht eindeutigen Befunde für die G34W-mutierten RZT ist nicht von einer diagnostischen Verwendung von H3K36me3 auszugehen. Die mitunter schwierige diagnostische Abgrenzung des *H3F3A*-mutierten RZT von anderen riesenzellhaltigen Läsionen ist mit der Etablierung der entsprechenden Sequenzierung sowie des Antikörpers in die Routinediagnostik erheblich erleichtert worden (*Lüke et al., 2017*). Mit diesen unkomplizierten und damit in der Breite verfügbaren Methoden kann der Verdacht auf einen Riesenzelltumor einfach immunhistologisch verifiziert werden. Durch diesen Schritt können zum einen das riesenzellhaltige Osteosarkom aber auch eine aneurysmatische Knochenzyste, das nicht ossifizierende Fibrom oder auch ein brauner Tumor im Rahmen eines Hyperparathyreoidismus als Differentialdiagnose definitiv ausgeschlossen werden.
Obwohl die Entwicklung des mutationsspezifischen G34W-Antikörpers die Frage nach H3K36me3 als möglichem Surrogatmarker für die RZT-spezifische *H3F3A*-Mutation obsolet macht, bleibt H3K36me3 aufgrund der oben genannten Implikationen in anderen

Tumoren und genetischen Prozessen als Forschungsziel interessant. Weitere Versuche sind erforderlich, um den Status von H3K36me3 im RZT eindeutig zu klären.
So wurde bereits durch einen Knock-Down-Versuch *in vitro* gezeigt, dass die Mutation G34W maßgeblich für Wachstum der neoplastischen mononukleären Stromazellen im RZT verantwortlich ist (*Fellenberg et al., 2019*). Ein ähnlicher Versuch wäre für H3K36me3 denkbar. Hierbei müsste G34W in mutierten RZT-Zelllinien mittels Knock-downs inaktiviert werden und in der Umkehr die Mutation G34W in andere Zelllinien eingebracht werden, um im Anschluss in allen Linien die Expression von H3K36me3 zu untersuchen. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob die Mutation unabhängig vom ursprünglichen Gewebe des RZT Einfluss auf H3K36me3 nimmt. Weiterhin wäre es zu empfehlen, den in der vorliegenden Arbeit benutzten immunhistochemischen Nachweis von H3K36me3 durch einen direkten Proteinnachweis zu ergänzen, beispielsweise durch eine Überprüfung im Western Blot. Durch einen Vergleich der Ergebnisse dieses Versuches mit einem direkten Proteinnachweis in den ursprünglichen Zelllinien wäre es möglich, einen etwaigen Zusammenhang zwischen G34W und H3K36me3 aus mehreren Blickwinkeln zu überprüfen.
Argumente dafür sind die Daten der Arbeit von *Lutsik et al.* (*2020*), in denen gezeigt wird, dass es beim RZT zu Veränderungen der Expression von H3K36me3 kommt, die jedoch von eher diskreter Ausprägung und daher unter Umständen schwieriger nachzuweisen sind, was im Einklang mit unseren Daten steht. Eine eventuelle, durch die G34W-Mutation bedingte Minderexpression von H3K36me3 schlägt sich möglicherweise nicht wesentlich in der globalen Expression von H3K36me3 nieder, da die Mutation des Gens *H3F3A* nur eine Unterart des Histons H3 betrifft. Diese Unterart ist bevorzugt in transkriptorisch aktiven Genregionen sowie Telomeren und in der Nähe der Zentromere zu finden (*Wirbelauer et al. 2005, Wong et al. 2009, Dunleavy et al. 2011*). Darüber hinaus wären Veränderungen nur im mutierten Allel feststellbar und hätten keine Auswirkung auf die Expression im korrespondierenden zweiten Allel.
Mit der in dieser Arbeit verwendeten LINE-1-Analyse des gesamten Zelllinienkollektivs konnte nicht eindeutig ermittelt werden, ob eine globale DNA-Hypomethylierung vorliegt. Allerdings geben die Daten aus der oben genannten Arbeit von *Lutsik et al.* in Untersuchungen mittels des HumanMethylation450 Array Hinweise darauf, dass die G34W-Mutation *in vitro* mit einer veränderten globalen DNA-Methylierung

zusammenhängt. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte methodischer Natur sein, da in der hier eingesetzten LINE-1-Methode nur drei für die gesamte DNA-Methylierung repräsentative Marker analysiert werden. Histonmodifikationen spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation von Chromatinstrukturen. Dabei interagieren sogenannte Reader-Enzyme wie PWWP-Domain-Enzyme mit Histonmodifikationen. Ein Beispiel ist die DNA-Methyltransferase Dnmt3a, welche über ihre PWWP-domain spezifisch mit H3K36me3 interagiert (*Dhayalan et al, 2010*). H3K36me3 wird allgemein mit Prozessen wie Splicing, DNA-Replikation sowie -Reparatur in Verbindung gebracht (*Pfister et al. 2014, Carvalho et al. 2014*). Bislang konnte allerdings aufgrund der offenbar vielfältigen Wechselwirkungen keine eindeutige Funktion der genannten Histonmodifikation ausfindig gemacht werden.
Lutsik et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Hypomethylierung der DNA in RZT-Linien vorliegt. Diese zeigte sich stärker ausgeprägt als bei zum Vergleich erstellten HeLa-Zellen mit G34W-Knock In. Ein weiterer Aspekt ist, dass G34W-mutierte RZT-Stromazellen ein Expressionsprofil aufweisen, welches näher an Osteoblastenvorläuferzellen liegt und so auf einen möglichen Ursprung des RZT von Osteoblasten hinweist. Welchen Einfluss die entwicklungsgeschichtliche unterschiedliche Herkunft von RZT- sowie HeLa-Zellen hat, ist ebenfalls unklar. Andere noch unbekannte Faktoren können bei epigenetischen Veränderungen im RZT also ebenfalls eine Rolle spielen, sodass hier von wissenschaftlicher Seite letztendlich weiterer Klärungsbedarf besteht. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Regulation der Methylierung in RZT möglicherweise sehr viel komplexer ist als initial angenommen. Allerdings sind unsere Ansätze die logische Konsequenz aus der wissenschaftlichen Datenlage gewesen und sind folglich als weiterer Baustein im Verständnis der Biologie des RZT zu sehen.

5. Zusammenfassung

Der Riesenzelltumor des Knochens ist eine ossäre Neoplasie mit semimalignem Charakter. In aller Regel wächst der Tumor lediglich lokal aggressiv, es gibt jedoch Einzelfälle mit malignen Verläufen und Metastasierung, beispielsweise in die Lunge. Der RZT (Riesenzelltumor des Knochens) weist histomorphologische Ähnlichkeiten mit anderen riesenzellhaltigen Läsionen auf, wie zum Beispiel der aneurysmatischen Knochenzyste, dem riesenzellhaltigen Osteosarkom oder Chondrosarkom oder dem sogenannten braunen Tumor bei Hyperparathyreoidismus. Diese Ähnlichkeit führt mitunter dazu, dass die korrekte histopathologische Diagnose dieser Erkrankungen erschwert wird. Jedoch werden auf Grundlage dieser Diagnostik therapeutische Entscheidungen von großer Wichtigkeit getroffen. Charakteristisch für die überwiegende Mehrheit der RZT ist eine Driver-Mutation im *H3F3A*-Gen. Der Nachweis dieser Mutation wird seit einigen Jahren zur Sicherung der histopathologischen Diagnose mittels eines mutationsspezifischen Antikörpers eingesetzt oder die Mutation wird mithilfe von DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenzierungsmethoden detektiert. Diese Mutation sorgt für den Austausch einer Aminosäure an Position im Histonschwanz der Histonunterart H3.3. Ein Austausch an dieser Position kann ebenfalls bei G34-mutierten diffusen hemisphärischen Gliomen auftreten und führt möglicherweise zu einer Veränderung der Methylierung der Aminosäure an Position 36, was die Frage aufwirft, ob diese Veränderung auch beim RZT auftritt und ob die Diagnostik dadurch vereinfacht werden kann.

Es wurden Untersuchungen an einem Ulmer Kollektiv aus riesenzellhaltigen Läsionen durchgeführt. Neben dem Mutationsstatus wurde auch die Expression von H3K36me3 mithilfe von immunhistochemischen Methoden überprüft. Exemplarisch wurde diese mit einem mutationsspezifischen G34W-Antikörper sowie der immunhistologisch nachgewiesenen Histonmethyltransferase SETD2 verglichen. Zudem wurde in einem Blindversuch die Eignung des Antikörpers gegen H3K36me3 als Surrogatmarker für die G34W-Mutation auf die Probe gestellt.

Weiterhin wurde ein Kollektiv aus immortalisierten Tumorzelllinien erstellt, um zwei in Ulm etablierte RZT-Zelllinien mit anderem menschlichem Gewebe zu vergleichen. Die Linien wurden ebenfalls in Hinblick auf ihren Mutationsstatus sowie H3K36me3 und

SETD2 untersucht. Weiterhin wurde die gesamtgenomische DNA-Methylierung mittels der LINE-1-Methode (long interspersed nuclear element 1) untersucht.
Es konnte gezeigt werden, dass der verminderte, Antikörper-geführte Nachweis von H3K36me3 ein sensitives Werkzeug für die Detektion von G34W-mutierten RZT sein kann. Gleichzeitig konnte bestätigt werden, dass der mutationsspezifische G34W-Antikörper eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität für die Diagnose eine RZT hat.
Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen G34W-Mutation und verminderter Expression von H3K36me3 im RZT konnte mit den hier verwendeten Methoden nicht gezeigt werden. In den Zelllinien lagen unterschiedliche Expressionslevel von H3K36me3 vor. In mehreren Linien, darunter den beiden RZT-Linien, gab es eine Defizienz dieses epigenetischen Markers, was auf eine Rolle des Markers in diesen Linien hinweist. Die Generierung der vorliegenden Ergebnisse ist die logische Konsequenz der wissenschaftlichen Datenlage und stellt die Basis für weitere Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Epigenetik dar, da die Funktion der Methylierung von H3K36 weiterhin nicht geklärt werden konnte, es aber zusätzlich Hinweise gibt, dass dieses Molekül auch außerhalb der RZT eine Rolle zu spielen scheint.

6. Literaturverzeichnis

1: Baba Y., Yagi T., Sawayama H., Hiyoshi Y., Ishimoto T., Iwatsuki M., Miyamoto Y., Yoshida N and Baba H.: Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers. Digestion 97: 26-30 (2018)

2: Balke M., Schremper L., Gebert C., Ahrens H., Streitbuerger A., Koehler G., Hardes J. and Gosheger G.: Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. Journal of cancer research and clinical oncology 134: 969-978 (2008)

3: Behjati S., Tarpey P.S., Presneau N., Scheipl S., Pillay N., Van Loo P., Wedge D.C., Cooke S.L., Gundem G., Davies H., Nik-Zainal S., Martin S., McLaren S., Goody V., Robinson B., Butler A., Teague J.W., Halai D., Khatri B., Myklebost O., Baumhoer D., Jundt G., Hamoudi R., Tirabosco R., Amary M.F., Futreal P.A., Stratton M.R., Campbell P.J., Flanagan A.M.: Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. Nature Genetics 45: 1479–1482 (2013)

4: Broehm C.J., Garbrecht E.L., Wood J. and Bocklage T.: Two Cases of Sarcoma Arising in Giant Cell Tumor of Bone Treated with Denosumab. Case reports in medicine 2015: 767198 (2015)

5: Carvalho S., Vítor A.C., Sridhara S.C., Martins F. B., Raposo An. C., Desterro J.M., Ferreira J., de Almeida S.F.: SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. eLife 3: e02482 (2014)

6: Czerniak, B.: Giant cell lesions. in: Czerniak B (Hrsg) Dorfman and Czerniak's bone tumors, second edition, Elsevier, Kapitel 10, Seiten 692-759 (2016)

7: Dhayalan A., Rajavelu A., Rathert P., Tamas R., Jurkowska R.Z., Ragozin S. and Jeltsch A.: The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. Journal of Biological Chemistry 285: 26114-26120 (2010)

8: Dunleavy E. M., Almouzni G.,Karpen G.H.: H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. Nucleus 2: 146–157 (2011)

9: Duns G., Hofstra R.M., Sietzema J.G., Hollema H., van Duivenbode I., Kuik A., Giezen C., Jan O., Bergsma J.J., Bijnen H., van der Vlies P., van den Berg E. and Kok K.: Targeted exome sequencing in clear cell renal cell carcinoma tumors suggests aberrant chromatin regulation as a crucial step in ccRCC development. Human Mutation 33: 1059-1062 (2012)

10: Edmunds J.W., Mahadevan L.C. and Clayton A.L.: Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. The EMBO Journal 27: 406-420 (2008)

11: Fellenberg J., Sähr H., Mancarella, D.C., Plass D. C., Lindroth A. M., Westhauser F., Lehner B., Ewerbeck V.: Knock-down of oncohistone H3F3A-G34W counteracts the neoplastic phenotype of giant cell tumor of bone derived stromal cells. Cancer Letters 448: 61-69 (2019)

12: Fontebasso A.M., Schwartzentruber J., Khuong-Quang D.A., Liu X.Y., Sturm D., Korshunov A., Jones D.T., Witt H., Kool M., Albrecht S., Fleming A., Hadjadj D., Busche S., Lepage P., Montpetit A., Staffa A., Gerges N., Zakrzewska M., Zakrzewski K., Liberski P.P., Hauser P., Garami M., Klekner A., Bognar L., Zadeh G., Faury D., Pfister S.M., Jabado N., Majewski J.: Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. Acta Neuropathologica 125: 659-669 (2013)

13: Kremen, T.J., Bernthal, N.M., Eckardt, M.A. and Eckardt, J.J.: Giant Cell Tumor of Bone: Are We Stratifying Results Appropriately? Clinical Orthopedics and related Research 470: 677–683 (2012)

14: Jaffe H. L., Lichtenstein L., Portis R. B.: Giant cell tumor of bone: it's pathological appearance, grading, supposed variants and treatment. Arch. Pathol. 30: 993-1031 (1940)

15: Lewis P.W., Muller M.M., Koletsky M.S., Cordero F., Lin S., Banaszynski L.A., Garcia B.A., Muir T.W., Becher O.J., Allis C.D.: Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. Science (New York, N.Y.) 340: 857-861 (2013)

16: Li F., Mao G., Tong D., Huang J., Gu L., Yang W. and Li G.M.: The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSα. Cell 153: 590-600 (2013)

17: Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I. A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H.K., Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., von Deimling A., Ellison D.W.: The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro-Oncology 23: 1231–1251 (2021)

18: Lüke J., von Baer A., Schreiber J. Lübbehüsen C., Breining T. Mellert K., Marienfeld R., Schultheiss M., Möller P., Barth T.F.E.: H3F3A mutation in giant cell tumour of the bone is detected by immunhohistochemistry using a monoclonal antibody against the G34W mutated site oft he histone H3.3 variant. Histopathology 71: 125-133 (2017)

19: Lutsik P., Baude A., Mancarella D., Öz S., Kühn A., Toth R., Hey J., Toprak U.H., Lim J., Nguyen V.H. Mayakonda A., Hartmann M., Rosemann F., Breuer K., Vonficht D., Grünschläger F., Lee S., Schuhmacher M.K., Kusevic D., Jauch A., Weichenhan D., Zustin J., Schlesner M., Haas S., Park J.H., Park Y.J., Oppermann U., Jeltsch A., Haller F., Fellenberg J., Lindroth A.M., Plass C.: Globally altered epigenetic landscape and delayed osteogenic differentiation in H3.3-G34W-mutant giant cell tumor of bone. Nature Communications 11: 5414 (2020)

20: Morselli M., Pastor W.A., Montanini B., Nee K., Ferrari R., Fu K., Bonora G., Rubbi L., Clark A.T., Ottonello S., Jacobsen S.E. and Pellegrini M.: In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. eLife 4: e06205 (2015)

21: Niu X., Xu H., Inwards C.Y., Li Y., Ding Y., Letson G.D. and Bui M.M.: Primary Bone Tumors: Epidemiologic Comparison of 9200 Patients Treated at Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing, China, With 10 165 Patients at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 139: 1149-1155 (2015)

22: Niu X., Zhang Q., Hao L., Ding Y., Li Y., Xu H. and Liu W.: Giant cell tumor of the extremity: retrospective analysis of 621 Chinese patients from one institution. The Journal of bone and joint surgery. American volume 94: 461-467 (2012)

23: Pfister S.X., Ahrabi S., Lykourgos-Panagiotis Z., Sarkar S., Aymard F., Bachrati C.Z., Helleday T., Legube G., La Thangue N.B., Porter A.C.G., Humphrey T.C.: SETD2-Dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. Cell Reports 7: 2006-1018 (2014)

24: Rutkowski P., Ferrari S., Grimer R.J., Stalley P.D., Dijkstra S.P., Pienkowski A., Vaz G., Wunder J.S., Seeger L.L., Feng A., Roberts Z.J., and Bach B.A..: Surgical downstaging in an open-label phase II trial of denosumab in patients with giant cell tumor of bone. Annuals of surgical Oncology 22: 2860–2868 (2015)

25: Shigaki H., Baba Y., Watanabe M., Murata A., Iwagami S., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M. and Baba H.: LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. Gastric Cancer 16: 480-487 (2013)

26: Simon J.M., Hacker K.E., Singh D., Brannon A.R., Parker J.S., Weiser M., Ho T.H., Kuan P.F., Jonasch E., Furey T.S., Prins J.F., Lieb J.D., Rathmell W.K. and Davis I.J.: Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. Genome Research 24: 241-250 (2014)

27: Viswanathan S. and Jambhekar N.A.: Metastatic giant cell tumor of bone: are there associated factors and best treatment modalities? Clinical Orthopaedics and Related Research 468: 827–833. (2010)

28: Wang H., Wan N. and Hu Y.: Giant cell tumour of bone: a new evaluating system is necessary. International Orthopaedics 36: 2521–2527 (2012)

29: Wirbelauer C., Bell O., Schübeler D.: Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. Genes & Development 19: 1761-1766 (2005)

30: Wong L.H., Ren H., Williams E., McGhie J., Ahn S., Sim M., Tam A, Earle E., Anderson M.A., Mann J., Choo K.H.A: Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. Genome Research 19: 404–414 (2009)

31: Zhang J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G., Heatley S.L., Payne-Turner D., Easton J., Chen X., Wang J., Rusch M., Lu C., Chen S.C., Wei L., Collins-Underwood J.R., Ma J., Roberts K.G., Pounds S.B., Ulyanov A., Becksfort J., Gupta P., Huether R., Kriwacki R.W., Parker M., McGoldrick D.J., Zhao D., Alford D., Espy S., Bobba K.C., Song G., Pei D., Cheng C., Roberts S., Barbato M.I., Campana D., Coustan-Smith E., Shurtleff S.A., Raimondi S.C., Kleppe M., Cools J., Shimano K.A., Hermiston M.L., Doulatov S., Eppert K., Laurenti E., Notta F., Dick J.E., Basso G., Hunger S.P., Loh M.L., Devidas M., Wood B., Winter S., Dunsmore K.P., Fulton R.S., Fulton L.L., Hong X., Harris C.C., Dooling D.J., Ochoa K., Johnson K.J., Obenauer J.C., Evans W.E., Pui C.H., Naeve C.W., Ley T.J., Mardis E.R., Wilson R.K., Downing J.R. and Mullighan C.G.: The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nature 481: 157-163 (2012)

32: Zhu X., He F., Zeng H., Ling S., Chen A., Wang Y., Yan X., Wei W., Pang Y., Cheng H., Hua C., Zhang Y., Yang X., Lu X., Cao L., Hao L., Dong L., Zou W., Wu J., Li X., Zheng S., Yan J., Zhou J., Zhang L., Mi S., Wang X., Zhang L., Zou Y., Chen Y., Geng Z., Wang J., Zhou J., Liu X., Wang J., Yuan W., Huang G., Cheng T. and Wang Q.F.: Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. Nature Genetics 46: 287-293 (2014)

Danksagung

Ich danke allen Menschen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit in jedweder Form unterstützt haben. Dazu zählen selbstverständlich die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Pathologie und Molekularpathologie der Universität Ulm, von denen die unermüdliche Juliane Nell hier exemplarisch genannt sei. Weiterhin schließt das diejenigen mit ein, die Unterstützung vor allem in Form von Motivationsarbeit beigetragen haben. Hier sind meine Eltern Christiane und Hartwig Schreiber an erster Stelle zu nennen, wie auch meine liebe Kari-Linn.

Unschätzbare Beiträge in allen Bereichen hat jedoch vor allem mein Doktorvater, Prof. Dr. med. Thomas Barth geleistet, ohne den dieses Projekt weder zustande noch zum Abschluss gekommen wäre.