

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie

Institutsdirektor Prof. Dr. med. Udo Schumacher

**Knockdown of L1CAM significantly reduces metastasis in a xenograft model of
human melanoma:**

L1CAM is a potential target for anti-melanoma therapy

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Annika Luisa Putscher
aus Bremen

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.01.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Andreas Gocht

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Originalarbeit	1
2. Darstellung der Publikation	20
2.1 Einleitung – Das maligne Melanom.....	20
2.2 Material und Methoden	21
Die Melanomzelllinien MV3 und MeWo	21
Knockdown von L1CAM	22
<i>In vitro</i> Versuche.....	22
Mausmodell mit humanen Tumoren (Xenograft)	23
Quantifizierung der humanen DNA in mauseigenem Gewebe	24
Genexpressionsanalyse	25
Histologie.....	26
3. Diskussion	28
4. Literaturverzeichnis	29
5. Zusammenfassung Deutsch	32
6. Zusammenfassung Englisch	33
7. Erklärung des Eigenanteils	34
8. Danksagung	35
9. Lebenslauf – aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt!	36
10. Eidesstaatliche Versicherung	37

RESEARCH ARTICLE

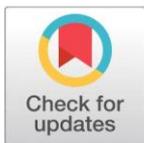
Knockdown of L1CAM significantly reduces metastasis in a xenograft model of human melanoma: L1CAM is a potential target for anti-melanoma therapy

Ann-Kathrin Ernst¹✉, Annika Putscher¹✉, Timur R. Samatov^{2,3}, Anna Suling⁴, Vladimir V. Galatenko^{2,5,6}, Maxim Yu Shkurnikov², Evgeny N. Knyazev², Alexander G. Tonevitsky^{5,7}, Thomas Haalck⁸, Tobias Lange¹, Hanna Maar¹, Jennifer Schröder-Schwarz¹, Kristoffer Riecken⁹, Udo Schumacher¹, Daniel Wicklein^{1*}

1 Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Cancer Center, University Medical-Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, **2** SRC Bioclinicum, Moscow, Russia, **3** Moscow State University of Mechanical Engineering, Moscow, Russia, **4** Department of Medical Biometry and Epidemiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, **5** Moscow State University, Moscow, Russia, **6** National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia, **7** Department of Translational Oncology, National Center of Medical Radiological Research, Obninsk, Russia, **8** Outpatient Center, Department of Dermatology, University Medical-Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, **9** Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

✉ These authors contributed equally to this work.

* d.wicklein@uke.de



OPEN ACCESS

Citation: Ernst A-K, Putscher A, Samatov TR, Suling A, Galatenko VV, Shkurnikov MY, et al. (2018) Knockdown of L1CAM significantly reduces metastasis in a xenograft model of human melanoma: L1CAM is a potential target for anti-melanoma therapy. *PLoS ONE* 13(2): e0192525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525>

Editor: Fabrizio Mattei, Istituto Superiore di Sanità, ITALY

Received: September 12, 2017

Accepted: January 25, 2018

Published: February 12, 2018

Copyright: © 2018 Ernst et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Microarray data can be found at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE84864> (GEO Accession Number: GSE84864). All other relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Grant 14-44-00051). This work was also funded by SRC Bioclinicum, Moscow: The funder provided support

Abstract

Finding additional functional targets for combination therapy could improve the outcome for melanoma patients. In a spontaneous metastasis xenograft model of human melanoma a shRNA mediated knockdown of L1CAM more than sevenfold reduced the number of lung metastases after the induction of subcutaneous tumors for two human melanoma cell lines (MeWo, MV3). Whole genome expression arrays of the initially L1CAM high MeWo subcutaneous tumors revealed unchanged or downregulated genes involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT) except an upregulation of Jagged 1, indicating a compensatory change in Notch signaling especially as Jagged 1 expression showed an increase in MeWo L1CAM metastases and Jagged 1 was expressed in metastases of the initially L1CAM low MV3 cells as well. Expression of 17 genes showed concordant regulation for L1CAM knockdown tumors of both cell lines. The changes in gene expression indicated changes in the EMT network of the melanoma cells and an increase in p53/p21 and p38 activity contributing to the reduced metastatic potential of the L1CAM knockdowns. Taken together, these data make L1CAM a highly interesting therapeutic target to prevent further metastatic spread in melanoma patients.

Introduction

Malignant melanoma is an extremely dangerous disease with high mortality rates due to the aggressive metastatic potential of melanoma cells. Although the development of new therapies

in the form of (part of) the salaries for authors T.S., V.G., M.S. and E.K., but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing interests: Some of the authors were in part employed by SRC Bioclinicum, Moscow. SRC Bioclinicum, Moscow" provided support in the form of (part of) salaries for authors T.S., V.G., M. S. and E.K., but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The authors declare no further competing financial interests.

for patients with already metastasized melanoma over the last few years resulted in prolonged survival, for a considerable number of patients these new therapies still do not achieve stable remission for more than a few months (see [1] for current review). For example, treatment with agents directed against mutated BRAF alone eliminates visible metastases shortly after first administration; however, due to resistance development, metastatic disease reoccurs after 6–8 months [2, 3]. Additionally, BRAF therapy is contraindicated for patients with BRAF wild-type melanoma and thus this treatment is not feasible for roughly half of the patients. Current ideas for better disease control include a combination of treatments. In cases with BRAF mutated melanoma, combining BRAF and MEK inhibitors further delays the development of resistance to about 11 months and patients with metastases at fewer than 3 organ sites and low LDH can even be stabilized for years [2]. Finding additional therapeutic targets on melanoma cells, preferably molecules which play a functional role in metastasis could greatly enhance chances for developing such combination therapies.

Originally described to play a major role in nervous system development [4], the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule L1CAM was later reported to be involved in cancer progression and metastasis [5] (see [6] for a current review on all aspects of L1CAM). L1CAM expression is of prognostic value in several cancer entities [7] and is thus considered as a promising target for therapy [8]. As L1CAM expression is associated with metastasis in melanoma patients [9], it could be a target for the combination therapies described above. However, until now it has never been demonstrated that L1CAM has a direct functional role in melanoma metastasis, e.g. by an animal model. Available studies focused on primary tumor development [10] or were *in vitro* [11]. Recently, L1CAM has been suggested to be a key mediator of the pro-metastatic role played by core fucosylation by FUT8 in melanoma [12]. Aim of this study was to investigate whether L1CAM plays this functional role in melanoma metastasis in a model comprising the whole metastatic cascade. For this purpose, we used a spontaneous metastasis xenograft mouse model of human BRAF wildtype melanoma cells with and without RNAi mediated L1CAM knockdown. To our knowledge such a spontaneous metastasis xenograft model (comprising the whole metastatic cascade) on the role of L1CAM had never been carried out for any cancer entity before. Using this model, we could demonstrate a functional role in melanoma metastasis for L1CAM as its knockdown resulted in significantly reduced spontaneous metastasis and also in a reduction of EMT-related gene expression and increased p53/p21 and p38 activity in the xenograft tumors.

Material and methods

Cell culture

MeWo and MV3 cells were obtained and cultivated as previously described [13]. Both cell lines were certified by the DSMZ (Leipzig Institute DSMAZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Cell culture medium for selection and cultivation of transfected cells was additionally supplemented with 0.5 µg / ml puromycin (Life Technologies). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany) and were cultivated in Endothelial Cell Growth Medium and Supplement according to the manufacturer's instructions.

RNAi mediated knockdown of L1CAM

L1CAM knockdown in MeWo and MV3 cells (MeWo and MV3 L1 kd) was achieved by an shRNA mediated approach: A 65 bp DNA oligomer containing a 19 bp anti-L1CAM sequence (GGATGGTGTCCACTTCAAA) [14] was inserted into the pLVX vector (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) according to the manufacturer's instructions. The sequence was

checked for potential off-target effects using NCBI BLAST (plus/plus and plus/minus strands down to an E value of 170) and found none of these off-targets regulated (i.e. none can be found in the S1 and S2 Tables). The same vector containing a sequence against firefly luciferase was used to generate a transfected control cell line (MeWo and MV3 Luc). Viral particles were produced as cell-free supernatants by transient transfection of HEK-293T packaging cells as described [15]. In brief, lentiviral vectors based on pLVX-shRNA1 were packaged using the second-generation packaging plasmid psPAX2 (Addgene #12260, Addgene, Teddington, UK) and phCMV-VSV-G [16] expressing the envelope protein of vesicular stomatitis virus. The supernatant was harvested 24 hours after transfection, 0.45 μm filtered and stored at -80°C . Target cells were plated at 5×10^4 cells in 0.5 ml medium in each well of a 24 well plate. After addition of viral particle containing supernatant to the cells, the medium was replaced the next day and puromycin was added the second day after transduction at a concentration of 1 μg / ml. The puromycin selection was carried out for at least one week. Melanoma cells L1CAM kd and Luc were seeded at 3 cells per well in two 96 well plates each and growing MeWo and MV3 sublines were screened for L1CAM expression using flow cytometry. Sublines with normal (compared with the original cell lines, Luc) and low ($>85\%$ reduced fluorescence signal, L1 kd) L1CAM were pooled and used for further experiments.

Proliferation, invasion, colony forming and laminar flow adhesion *in vitro* assays

The Cell Proliferation Kit II (XTT, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used for *in vitro* proliferation assays according to the manufacturer's instructions with 5×10^4 cells seeded per well and 48 h proliferation time.

Invasive potential was tested *in vivo* using the 8 μm pore size, 24-multiwell BioCoat System (BD) with Calcein AM (eBioscience, Frankfurt, Germany), according to the manufacturer's instructions. 1×10^5 L1 kd or Luc cells were seeded per well and incubated for 24 h. Fluorescence signals were analyzed with a Genios Reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

L1 kd pool or Luc cells (200 / ml) were resuspended in a 1:1 mixture of growth factor reduced matrigel (BD) and complete RPMI1640. 50 μl of the cell suspension were deposited in each well of a 96-well plate. 200 μl complete RPMI were then added to each well and changed twice weekly. Colonies were counted and evaluated using a light microscope after 14 days. Adhesive interactions of melanoma cells with HUVEC were analyzed under physiological shear stress conditions in ibidiTreat μ -slide IV^{0.4} flow chambers with or without pre-incubation of HUVEC with 10ng/ μl rhTNF α for 4h as described (Richter et al., 2011, Lange et al., 2014). Adhesive events were digitally recorded in three regions of interest per flow chamber and the number of events per minute was subsequently analyzed using CapImage Software (Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany).

Flow cytometry

Flow cytometry was performed as described [17]. Briefly, cells were stained with phycoerythrin-labeled mouse anti-human L1CAM (anti-CD171, clone 5G3, eBioscience) or the corresponding isotype control (murine IgG2a-PE, eBioscience). Stained cells were subjected to fluorescence assisted flow cytometry on a FACSCalibur (BD). Files were analyzed using WinMDI 2.9 software.

Xenograft mouse model of human melanoma

The experiment was carried out as previously described [13]. Briefly, 10 (MV3 Luc and L1CAM kd) and 10 (MeWo Luc and L1CAM kd) scid mice in each group received subcutaneous injections of 10^6 melanoma cells with or without L1CAM1 knockdown, respectively. Mice

with ulcerated tumors or tumors with an estimated mass exceeding 10% of the respective animal's weight were euthanized immediately. 3 and 4 animals were lost to murine lymphoma in the L1 kd and Luc group, respectively. Thus, this part of the experiment was repeated with 15 mice per group. This time, 1 and 2 animals were lost to murine lymphoma in the L1 kd and Luc group. In the MV3 group, only one mouse from each group developed lymphoma. Taken together, data from 18 (MeWo Luc), 21 (MeWo L1 kd), 9 (MV3 Luc) and 9 (MV3 L1 kd) animals were included in the further analyses.

The methodology for carrying out the animal experiments was consistent with the UKCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia [18]. The experiment was recommended and supervised by the institutional animal welfare officer and approved by the local licensing authority (Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit, Verbraucherschutz; Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz; Billstr. 80, D-20539 Hamburg, Germany) under the project no. G10/55.

All animals used were pathogen-free Balb/c severe combined immunodeficient (scid) mice aged 9–14 weeks with a weight of 25–30 g at the beginning of the experiments. The mice were housed in filter-top cages, provided food and water ad libitum and their condition was monitored daily. Apart from visible tumors, the general condition of the animals was evaluated by a standardized in house scoring system based on movement/behavior, weight development, food and water intake and fur condition. The mice were killed by cervical dislocation after having been anesthetized by intraperitoneal injection of a weight-adapted dose (10 μ l / g body-weight) of a mixture of 1.2 ml Ketamin (Gräub AG, Bern, Switzerland), 0.8 ml Rompun (Bayer AG, Leverkusen, Germany) and 8 ml saline.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for L1CAM using sections of paraffin-embedded tissues was carried out as previously described [13] [19]. To increase staining intensity, L1CAM staining for the initially L1CAM low melanoma cells MV3 was modified in that the K5005 AP/RED Rabbit/Mouse staining kit (Dako, Copenhagen, Denmark) was used after the primary antibody. Other stainings were carried out as follows: Notch 1 (Abcam, Cambridge, UK; cat. no. ab52627; Clone EP1238Y) at 19.2 μ g / ml; pretreatment steamer at 121 °C for 10 min; citrate buffer pH 6. Jagged 1 (Jag1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; cat. No. HPA021555) at 6 μ g / ml; water bath at 99 °C for 20 min; S1699 retrieval solution pH 6 (Dako). p53 (Dako; cat.no. M7001; clone DO-7) at 1.37 μ g / ml, microwave 2X 4 min at 800 W, citrate buffer pH 6. p21 Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA; cat.no. MS-891-P; clone CP74400) at 1 μ g / ml; steamer at 121 °C for 10 min; S1699 pH6. p38 (Abcam; cat.no. ab38238; clone pohosoha T180 + Y1820) at 2 μ g / ml, steamer at 100 °C for 20 min, S1699 pH6 with K5005 AP/RED treatment after primary antibody.

Stained slides were scanned by a Mirax microscope (Zeiss, Jena, Germany) and the Panoramic Viewer software (3D Histech, Budapest, Hungary) was used to take images.

Quantification of lung metastasis

Lung metastases were quantified as previously described [20]. Briefly, whole paraffin-embedded lungs were cut into serial slices, every tenth slice was HE stained, the number of metastasis counted in 10 slices and total lung metastases were calculated for each animal based on the respective total number of slices.

Nucleic acid extraction and real-time PCR

DNA and RNA extraction from murine blood and tumors as well as quantification of human melanoma cells by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) for human *Alu* sequences was performed as previously described [19].

Statistics

Continuous variables are displayed using boxplots.

In all models the interaction of cell line (MeWo vs. MV3) and group (Luc vs. L1 kd) was tested using a likelihood-ratio test. In case of a significant interaction the group comparison was presented separately for each cell line and in case of insignificance the interaction was excluded from the model and an overall group comparison was presented.

In vitro outcomes (proliferation, invasion, colony forming assay and laminar flow) were analyzed using linear models. Outcomes of the xenograft model were survival, tumor weight, metastases, and number of circulating tumor cells (CTCs; at the time of death in the animals' blood, determined by qRT-PCR). Survival of mice was defined as time until mice were euthanized when the tumor ulcerated or reached an estimated mass exceeding 10% of the respective animal's weight. As no censoring was existent it was analyzed using a linear model which was moreover adjusted for the type of death (ulcerated vs. not ulcerated). Tumor weight was analyzed in an analogous model. Number of metastases was analyzed and evaluated/quantified using a negative binomial regression which was adjusted for survival time and tumor weight and included furthermore CTCs as interesting variable. CTCs as outcome variable were logarithmized and analyzed using a linear model, which was adjusted for survival time and tumor weight. Parameter estimates are presented together with 95% confidence intervals (95%-CI). A two-tailed $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. All analyses were conducted using Stata 14.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

Microarray protocol

Total RNA was extracted from the frozen tumor samples using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer. RNA concentrations were determined by the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA quality was checked using the Experion RNA StdSens Analysis Kit and Experion platform (Bio-Rad, Hemel Hempstead, United Kingdom). For all samples RQI value (RNA Quality Indicator) was greater than 8.

Microarray expression analysis was performed using GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom) as recommended by the manufacturer. Data processing was carried out using Signal Space Transformation–Robust Multi-Array Analysis (SST-RMA) method in Affymetrix Expression Console (version 1.4.1.46). Dispersion analysis (ANOVA) was applied to the logarithmic expression values using Affymetrix Transcriptome Analysis Console (version 3.0.0.466). For p-values correction we used the Benjamini-Hochberg method [21]. Analysis of regulation profiles was performed using Pathway Studio software (Elsevier, Amsterdam, Netherlands).

Results

Knockdown of L1CAM

The newly generated sublines were analyzed for L1CAM expression by flow cytometry.

Sublines with more than 85% (MeWo) and 75% (MV3) reduced L1CAM expression were pooled and used for all further experiments (designated MeWo and MV3 L1 kd). MeWo Luc and MV3 Luc cells with unchanged L1CAM expression, but with puromycin resistance were used as controls (Fig 1A).

In vitro proliferation and migration

In an XTT assay, MeWo L1 kd cells showed a significant increase in proliferation (+0.07, 95%-CI [0.04;0.10]; $p < 0.001$) compared with the MeWo Luc controls with unchanged surface

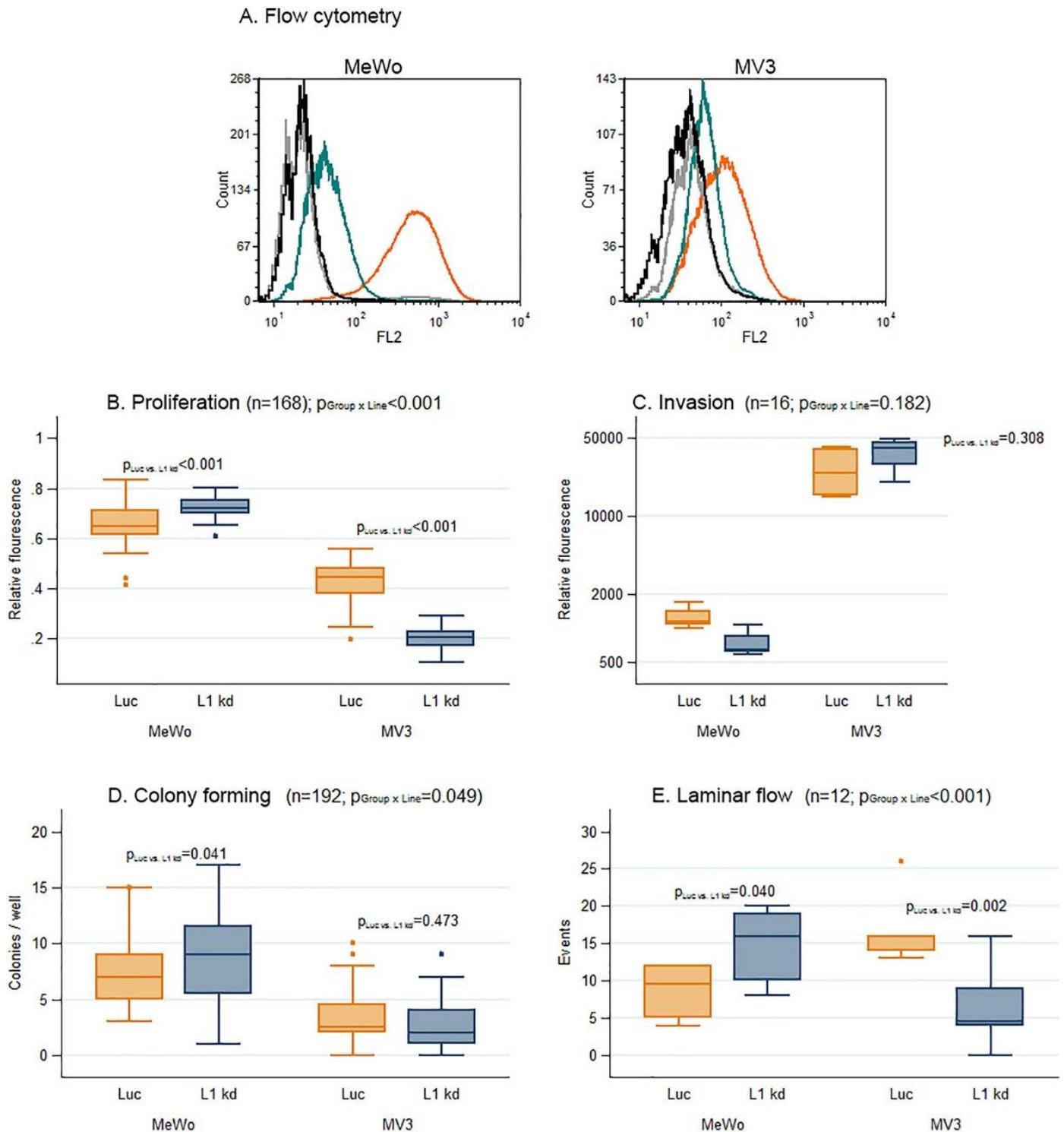


Fig 1. In vitro experiments yielded inconclusive results for predicting in vivo metastatic potential of L1CAM knockdown melanoma cells. Statistics: All numbers n represent the total number of individual samples (each from one individual animal) of the respective experiment. All values of P are derived from linear models. If $P_{\text{Group} \times \text{Line}}$ is below 0.05 (i.e. if L1CAM knockdown displays different effects for cells from the two lines), a separate $P_{\text{Luc vs. L1kd}}$ is given for each cell line. Flow Cytometry: Staining of MeWo Luc and L1CAM knockdown (L1 kd) (left panel) and MV3 Luc and L1 kd (right panel) for L1CAM. In contrast to the Luc controls, surface L1CAM1 is reduced by more than 85% (MeWo) and approximately 75% (MV3) on the L1 kd cells (A). Proliferation assay: 5×10^4 cells seeded per well and incubation for 48 h: Significant increase in proliferation for MeWo with L1CAM knockdown (L1 kd) compared with the MeWo Luc controls with unchanged surface

L1CAM and significant decrease for MV3 L1 kd compared with MV3 Luc (B). Invasion assay: 1×10^5 cells were seeded per well and incubated for 24 h: No significant change in the L1 kd knockdown cells' ability for invasion (C). Colony forming assay: Cells were seeded in matrigel / culture medium in a 96-well plate; colonies were counted and evaluated using a light microscope after 14 days: Significant increase in colony numbers for MeWo L1 kd cells against MeWo Luc and no significant difference in colony numbers between MV3 L1 kd cells and MV3 Luc controls was observed ($n = 48$, each) (D). Laminar flow adhesion assay on activated endothelium: Interactions of melanoma cells suspended in culture medium with a HUVEC monolayer under laminar flow. The number of events (only adherence and tethering, no rolling events) increased significantly for MeWo L1 kd against MeWo Luc cells and decreased significantly for MV3 L1 kd against MV3 Luc cells (E).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g001>

L1CAM. For MV3 L1 kd there was a decrease in proliferation (-0.22 , 95%-CI $[-0.24; -0.19]$; $p < 0.001$) in comparison to MV3 Luc controls (Fig 1B).

We found no significant overall influence of L1CAM knockdown on the cells' ability for *in vitro* invasion in a transwell assay ($p = 0.308$; Fig 1C).

In a colony forming assay in matrigel, a significant increase of colony numbers for MeWo L1 kd cells in comparison to Luc controls was observed ($+1.25$, 95%-CI $[0.05; 2.45]$; $p = 0.041$) while there was no significant difference in colony numbers between L1 kd cells and Luc controls for MV3 ($p = 0.473$; Fig 1D).

In laminar flow assays measuring adherence, tethering and rolling on activated endothelial cells (HUVEC), the number of events increased significantly for MeWo L1 kd cells ($+6.17$, 95%-CI $[0.32; 12.02]$; $p = 0.040$) while it decreased for MV3 L1 kd cells (-10.67 , 95%-CI $[-16.80; -4.53]$; $p = 0.002$; Fig 1E).

Summarized, knockdown of L1CAM *in vitro* displayed different effects (proliferation, colony forming and laminar flow adhesion) or no effect at all (invasion) for both human melanoma cell lines used. These *in vitro* results do not reflect the *in vivo* results from the following xenograft model (see below).

L1CAM knockdown decreases lung metastasis by the factor 7.26 in a xenograft model of human melanoma

All animals developed subcutaneous tumors at the injection site and were euthanized when the tumor ulcerated or reached an estimated mass exceeding 10% of the respective animal's weight. The time span between injections of melanoma cells until euthanization will subsequently be referred to as survival time.

L1CAM knockdown did not significantly change the animals' survival time in MeWo and MV3 ($p = 0.798$; Fig 2A).

Within the MV3 cell line the size of the L1CAM knockdown tumors was significantly greater ($+0.83g$, 95%-CI $[0.30; 1.37]$; $p = 0.003$) in comparison to the MV3 control tumors. The size of the MeWo L1CAM knockdown tumors was not significantly different from the control tumors ($p = 0.473$; Fig 2B).

Metastatic spread of the human melanoma cells was exemplarily studied in the animals' lungs. All control (Luc) metastases displayed high (MeWo) or low (MV3) L1CAM expression and even most L1 kd metastases still showed weak (MeWo) or very weak (MV3) L1CAM expression (Fig 3, please note that staining was intensified for the MV3 samples). Metastasis (adjusted for survival time and tumor weight) was 7.26 times higher in the MeWo and MV3 Luc group in comparison to the L1CAM knockdown group (95%-CI $[3.10; 17.00]$; $p < 0.001$; Fig 2C). Survival time also showed a significant influence on lung metastasis. With each day of survival, metastatic spread increased by 6.83% (95%-CI $[2.94; 10.86]$; $p < 0.001$). Tumor weight and number of CTCs showed no influence on the number of metastases ($p = 0.070$ and $p = 0.436$ respectively).

Melanoma cell numbers (determined by RT-qPCR) in the bone marrow of the animals were low: most of the samples showed no values above background, thus only samples with at least 1 melanoma cell per 10^6 bone marrow cells were considered positive. Despite the low

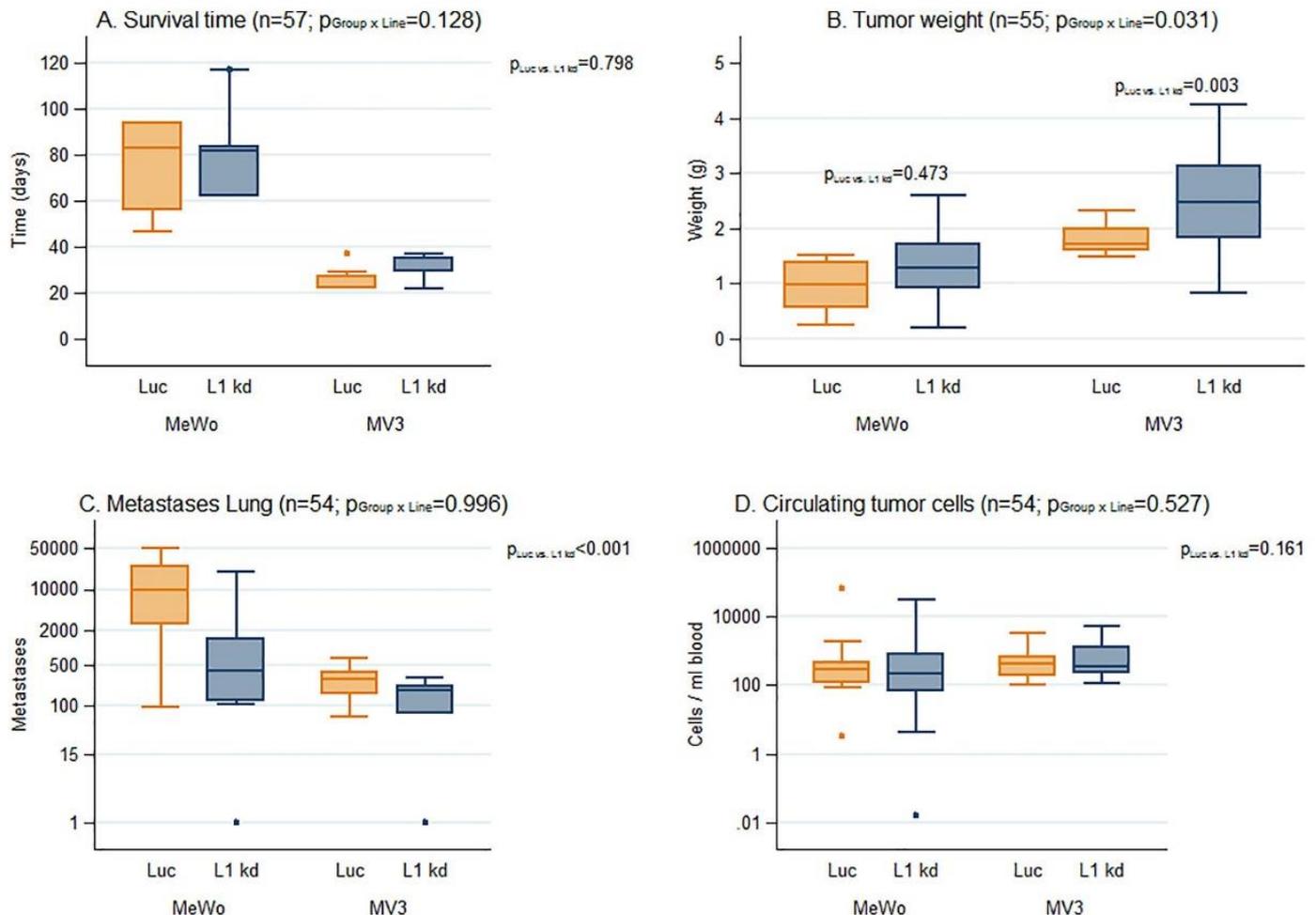


Fig 2. Xenograft spontaneous metastasis model of human melanoma cells with high L1CAM expression (MeWo) in scid mice. L1CAM knockdown reduces metastasis by more than 80%. Statistics: All numbers n represent the total number of individual samples of the respective experiment. Survival of mice was analyzed using a linear model which was moreover adjusted for the type of death (ulcerated vs. not ulcerated). Tumor weight was analyzed in an analogous model. Number of metastases was analyzed and evaluated/quantified using a negative binomial regression which was adjusted for survival time and tumor weight and included furthermore CTCs as variable. CTCs as outcome variable were logarithmized and analyzed using a linear model, which was adjusted for survival time and tumor weight. If P_{Group X Line} is below 0.05 (i.e. if L1CAM knockdown displays different effects for the two cell lines), a separate P_{Luc vs. L1kd} is given for each cell line. Animals' survival after subcutaneous injection of 10⁶ melanoma cells: L1CAM knockdown did not significantly change the animals' survival time (A). The weight of the MeWo L1 kd tumors was not significantly different from the MeWo Luc control tumors, the weight of the MV3 L1 kd tumors was significantly higher than the tumor weight of the MV3 Luc control tumors (B). The number of lung metastases was significantly lower (reduced 7.26 fold) in the L1 kd than in the Luc control groups both for MeWo and MV3 (C). The numbers of circulating tumor cells (CTC) in the animals' blood were not significantly altered by L1CAM knockdown both for MeWo and for MV3 (D).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g002>

melanoma cells numbers, results for disseminated melanoma cells (DMCs) in the bone marrow show a tendency towards the results for the animals' lungs: In the MeWo luc group 33.3% of the animals were positive for DMCs, 23.8% were positive in the MeWo L1 kd group. For MV3, 55.6% were positive for DMCs in the Luc group and 22.2% in the L1 kd group.

Regarding influence factors on the number of CTCs we found the mass of the primary tumor to be significant: CTC numbers increased by the factor 3.33 per 1 g increase of the primaries (95%-CI [1.56; 7.09]; p = 0.002). Survival time and L1CAM knockdown showed no significant influence on CTC numbers (p = 0.454 and p = 0.161 respectively) (Fig 2D).

Summarized, in a melanoma xenograft model, L1CAM knockdown reduced lung metastasis by the factor 7.26. This reduction is probably not caused by a less aggressively growing

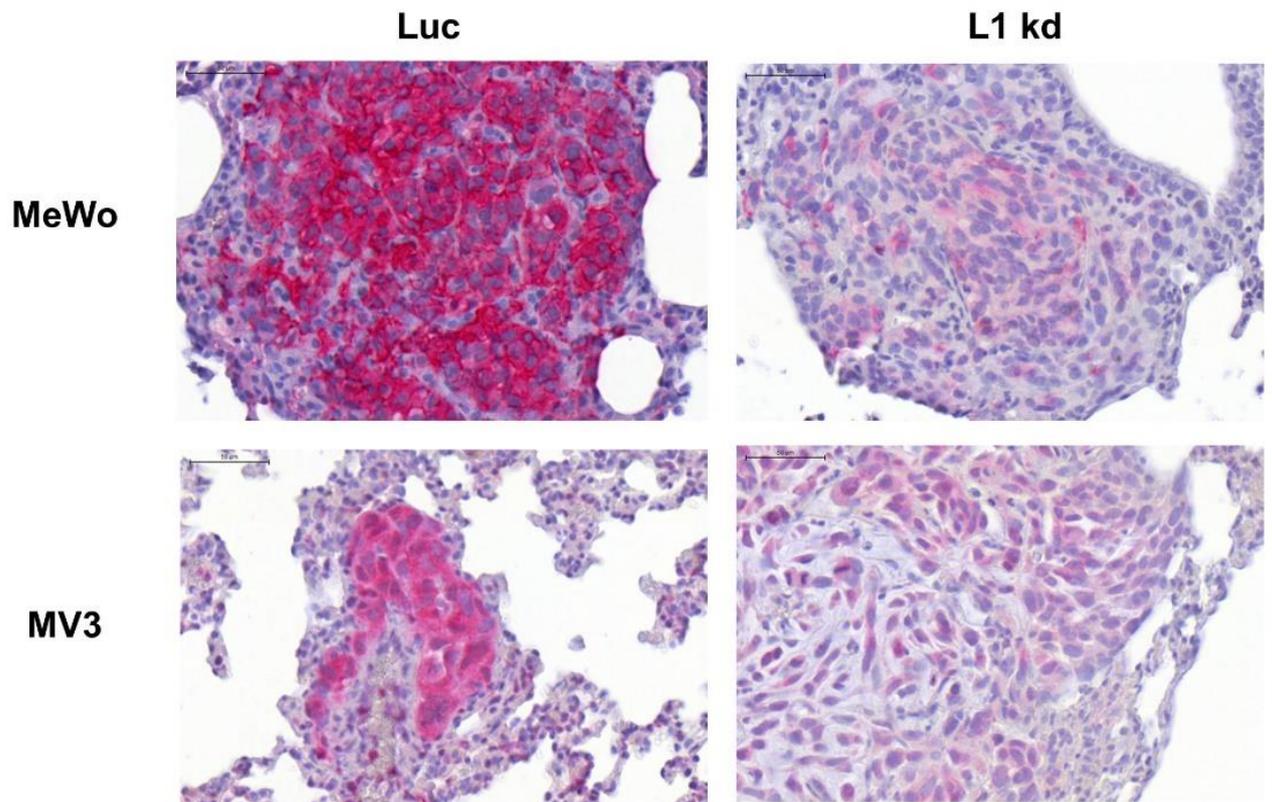


Fig 3. LICAM expression in lung metastases from human melanoma xenograft as detected by immunohistochemical analysis. Immunohistochemical staining for LICAM expression (red) in lung metastases of melanoma cells MeWo (upper panels) and MV3 (lower panels) with unchanged LICAM expression (Luc, right panels) and LICAM knockdown (L1 kd, left panels). All scale bars: 50 µm. Please note that staining was amplified for MV3.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g003>

primary tumors, a change in survival time or a decrease in CTC number, as all these parameters remain unaltered by L1CAM knockdown in the human melanoma cells.

Comparison of gene expression of L1CAM knockdown tumors with controls

To gain some insight into how the L1CAM knockdown might cause the drastic reduction in metastasis observed in the xenograft model, we performed a whole (human) genome expression analysis starting with the corresponding primary xenograft tumors of the initially L1CAM high cell line MeWo (MV3 microarray data see below).

Considering all genes with a significant (ANOVA p-value and adjusted p-value below 0.05) expression fold change of at least 1.51, in the xenograft tumors formed by the originally L1CAM high MeWo cells, the expression of 981 genes was up- and of 1000 (excluding L1CAM itself) downregulated (S1 Table). Analysis of this regulation profile using the Pathway Studio software suggests a central role of Tumor Growth Factor β (TGFB1, which itself shows a 5.06 fold downregulation in the L1CAM knockdown tumors) as many genes that have been reported to be directly or indirectly regulated by TGFB display a respective up- or downregulation in the L1 kd tumors (Fig 4).

As metastasis is often associated with Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) regulated genes were screened for EMT related genes: The phenotype of the L1CAM knockdown

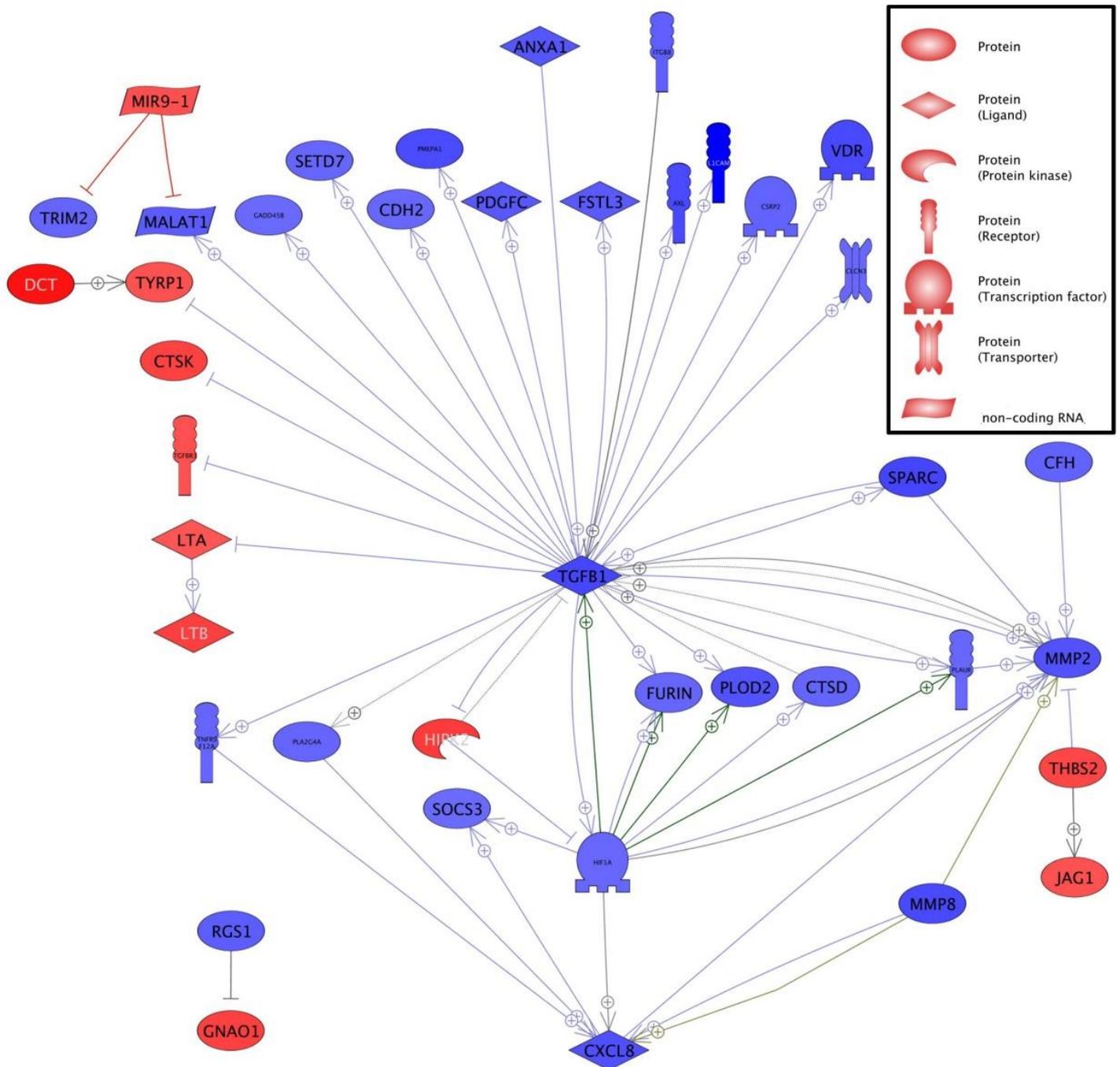


Fig 4. Comparison of the gene expression of subcutaneous MeWo tumors with L1CAM knockdown with expression of MeWo Luc control tumors. Analysis revealed a central role for TGFβ. Analysis of the regulation profile in L1CAM knockdown tumors compared with Luc control tumors using the Pathway Studio software including all genes which display a respective 1.5 fold up- or downregulation in expression in the L1 kd tumors. Gene expression upregulated in the L1kd tumors is given in red, downregulated expression in blue.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g004>

tumors appeared less mesenchymal than the control tumors'; e.g. significant reduction of N-cadherin (CDH2), Tyrosine-protein kinase receptor UFO (AXL), Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2), TGFβ1 and Secreted Protein Rich in Cysteine (SPARC) expression. An exception

from this reduction of EMT related gene expression, however, was an increased expression of the NOTCH ligand JAG1 (Jagged 1) in the L1CAM knockdown tumors. As this gene was the sole exception among the EMT related genes, we chose JAG1 to exemplarily verify the array results. Interestingly, the increase in JAG1 expression was accompanied by a significant increase in NOTCH1 and 2 expressions, albeit only 1.40 and 1.41 fold, respectively, and a significant increase in NOTCH signaling activator Contactin 1 (CNTN1) expression. With CCNC (Cyclin-C), HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1- α) and KAT2B (K acetyltransferase 2B) three other genes involved in NOTCH signaling are downregulated.

On protein level, a tendency towards increased Jagged 1 (Fig 4A) and Notch 1 (Fig 4B) expression in the L1 kd tumors could be verified via immunohistochemistry. Additionally, Notch 1 and Jagged 1 expression could be demonstrated in lung metastases with a higher Jagged 1 expression in the few L1 kd metastases (Fig 5A, Fig 5B).

As L1CAM knockdown also resulted in a reduction in metastasis for the initially L1CAM low MV3 cells, an additional whole genome expression analysis of the corresponding MV3 primary xenograft tumors was performed (S2 Table). Genes with concordant regulation (up or down, respectively) for both groups of xenograft tumors (MeWo and MV3) were determined (adjusted p-value below 0.05 and at least 1.5 fold regulation): Excluding L1CAM, 17 genes were found to be regulated in both L1 kd groups (all genes see Table 1, analysis see Fig 6). Immunohistochemical stainings showed clear Jagged 1 (Fig 5C) and Notch 1 expression in the subcutaneous MV3 tumors and lung metastases, however, we did not see a tendency towards higher or lower expression in the L1 kd tumors or metastasis compared with the Luc controls which already displayed a higher Jagged 1 expression than the MeWo Luc tumors (Fig 5A). This lack of difference for MV3 is in line with the results on RNA level as no significant difference in Jagged 1 and Notch was detected by analysis of the arrays as well.

Of the genes regulated in the L1 kd tumors of both the initially L1CAM high (MeWo) and L1CAM low (MV3) cell lines (Fig 6), up-regulation of RFW2 (RING finger and WD repeat domain 2, also COP1) in the L1 kd tumors should lead to an increase in p53/p21 pathway activity. This could be verified for the subcutaneous tumors of both cell lines using immunohistochemistry; however, there was a difference between the two cell lines: The L1CAM wild-type MeWo Luc tumors showed no p53 and low p21 expression but the respective L1CAM knockdown tumors displayed clear p53 and p21 expression. In contrast to the MeWo Luc tumors, a pronounced p53 expression was found for the MV Luc tumors which did not change for in the L1 kd tumors. However, as for the MeWo tumors, p21 expression did increase in the MV3 L1 kd tumors (S1 Fig). According to the presumption that tumor cells with increased p53/p21 pathway activity should display a marked reduction in their metastatic potential, the remaining metastasis in the lungs of the L1 kd animals indeed showed no pronounced change in p53/p21 expression compared with their Luc counterparts with unchanged L1CAM expression (S2 Fig).

The only up-regulated gene of the 17 –MAP2K6 (dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6) indicated an increase in p38 phosphorylation in the L1 kd tumors. The subcutaneous tumors for both cell lines showed an extreme intra-tumoral heterogeneity in p38 phosphorylation ranging from areas with extremely high phospho-p38 to areas with no detectably phospho-p38 which made a reasonable analysis by immunohistochemistry impossible. The L1 kd metastases from both cell lines, however, displayed an increase in phospho-p38 compared with their Luc counterparts (S3 Fig).

Summarized, L1CAM knockdown in the originally L1CAM high human melanoma cell line MeWo led to a reduced expression of EMT-related genes in the respective xenograft tumors (which also displayed reduced metastatic potential). An exception to this was the expression of the Notch ligand Jagged1 which showed an increase in expression. Genes with

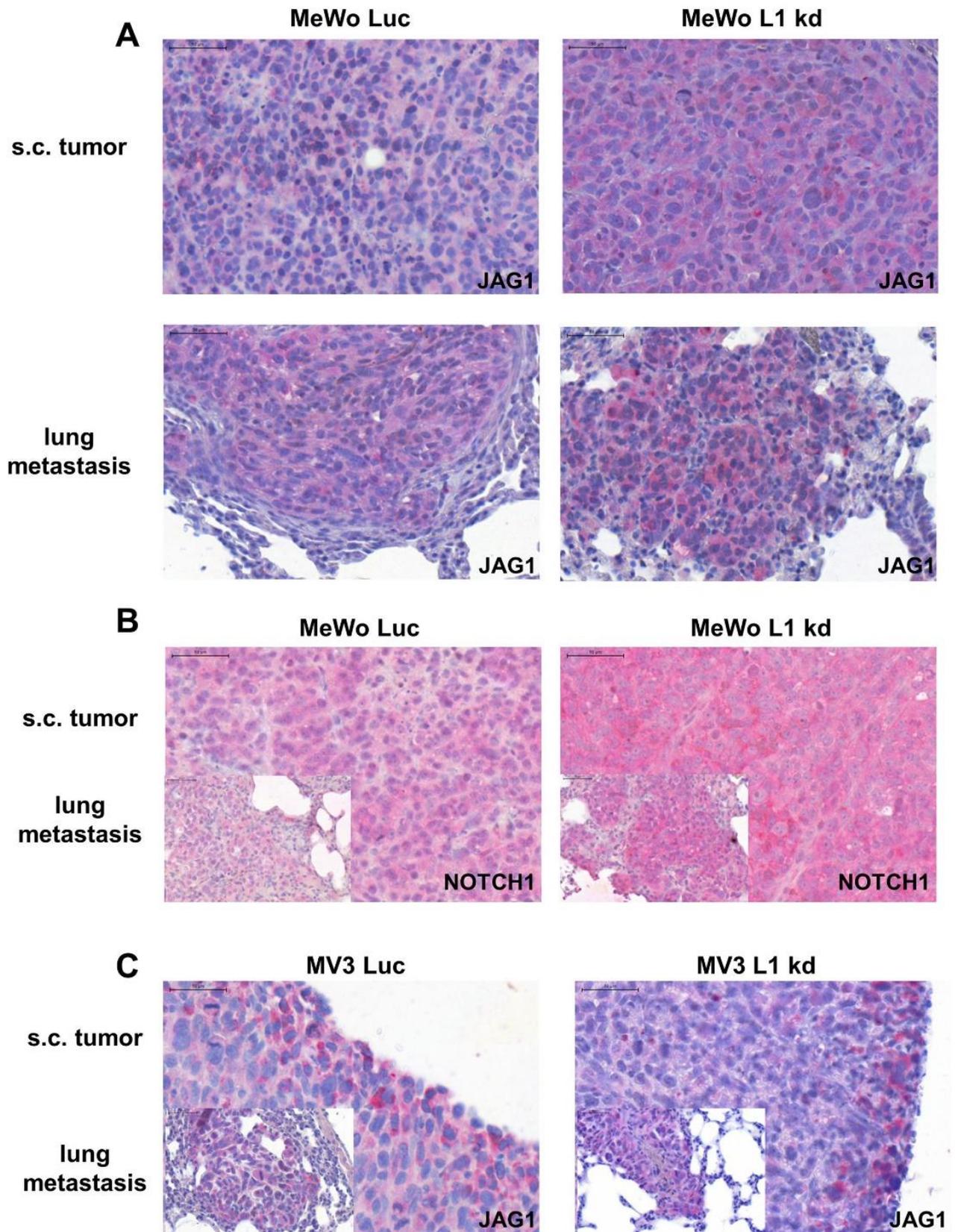


Fig 5. Verification of gene expression array data by immunohistochemical analysis of Jagged 1 and Notch 1 expression in subcutaneous tumors and lung metastases from a human melanoma (MeWo) xenograft experiment. Immunohistochemical staining for Jagged 1 (JAG1) expression (red) in subcutaneous (s.c.) tumors (upper left and upper right panel) and lung metastases (lower left and lower right panel) of melanoma cells (MeWo) with unchanged L1CAM expression (Luc, upper and lower left panels) and L1CAM knockdown (L1 kd, upper and lower right panels). All scale bars: 50 μ m. Stainings show a tendency towards increased Jagged 1 for L1 kd tumors and metastases (A). Immunohistochemical staining for Notch1 expression (red) in subcutaneous tumors (upper left and upper right panel) and lung metastases (lower left and lower right panel) of melanoma cells (MeWo) with unchanged L1CAM expression (Luc, upper and lower left panels) and L1CAM knockdown (L1 kd, upper and lower right panels). All scale bars: 50 μ m. Stainings show a tendency towards increased Notch 1 for L1 kd tumors and metastases (B). Immunohistochemical staining for Jagged 1 (JAG1) expression (red) in subcutaneous tumors (big panel) and lung metastases (smaller panel, lower left) of MV3 melanoma cells with unchanged L1CAM expression (Luc, left panels) and L1CAM knockdown (L1 kd, right panels). All scale bars: 50 μ m. Stainings show no tendency towards altered Jagged 1 for L1 kd tumors and metastases (C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g005>

changed expression in the xenograft tumors after L1CAM knockdown for both melanoma cell lines indicate an increase in p53/p21 and also p38 activity which could be verified on protein level using immunohistochemistry. Both, reduced expression of EMT-network genes and increased p53/p21 and P38 activity probably contribute to the reduction of the metastatic potential of the human melanoma cells after L1CAM knockdown.

Discussion

The performed *in vitro* experiments with the MeWo and MV3 Luc and L1CAM knockdown cells gave no clear indication how L1CAM influenced the metastatic behavior of the corresponding xenograft tumors *in vivo* (Fig 1) as both cell lines displayed different changes, e.g. in proliferation, after L1CAM knockdown. Melanoma cells are rather heterogenic in many aspects (in one and the same melanoma and also between two different ones)[22] which might in part explain why the *in vitro* changes in behavior differed between the two cell lines. We used an originally L1CAM high (MeWo) and an L1CAM low (MV3) cell line which might have been differently affected by L1CAM knockdown as their original dependence on L1CAM

Table 1. Genes with the same regulation (up or down respectively) in MV3 and MeWo subcutaneous tumors with L1CAM knockdown (L1 kd) compared with their respective Luc control counterparts with unaltered L1CAM (Luc) expression. Included are only fold changes at least +/- 1.5; ANOVA and adjusted p-values <0.05, both for MV3 and MeWo tumors.

Gene symbol	MV3expressionlinear foldchangeL1 kd vs.Luc	MeWoexpressionlinear foldchangeL1 kd vs.Luc
MALAT1	-5.77	-2.42
RASAL2	-2.62	-2.88
TOR1AIP2	-2.28	-1.75
L1CAM	-2.20	-96.76
PRDX6	-2.20	-1.59
KCNQ1OT1	-2.19	-1.54
XPR1	-2.12	-1.82
DARS2	-2.09	-1.50
CACYBP	-2.01	-2.16
KIFAP3	-1.97	-1.78
SOAT1	-1.96	-1.52
TSEN15	-1.84	-1.79
NME7	-1.79	-1.50
ARID5B	-1.76	-1.54
RFWD2	-1.69	-1.67
ZNF432	-1.66	-1.52
ATF6	-1.50	-1.67
MAP2K6	+1.79	+2.68

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.t001>

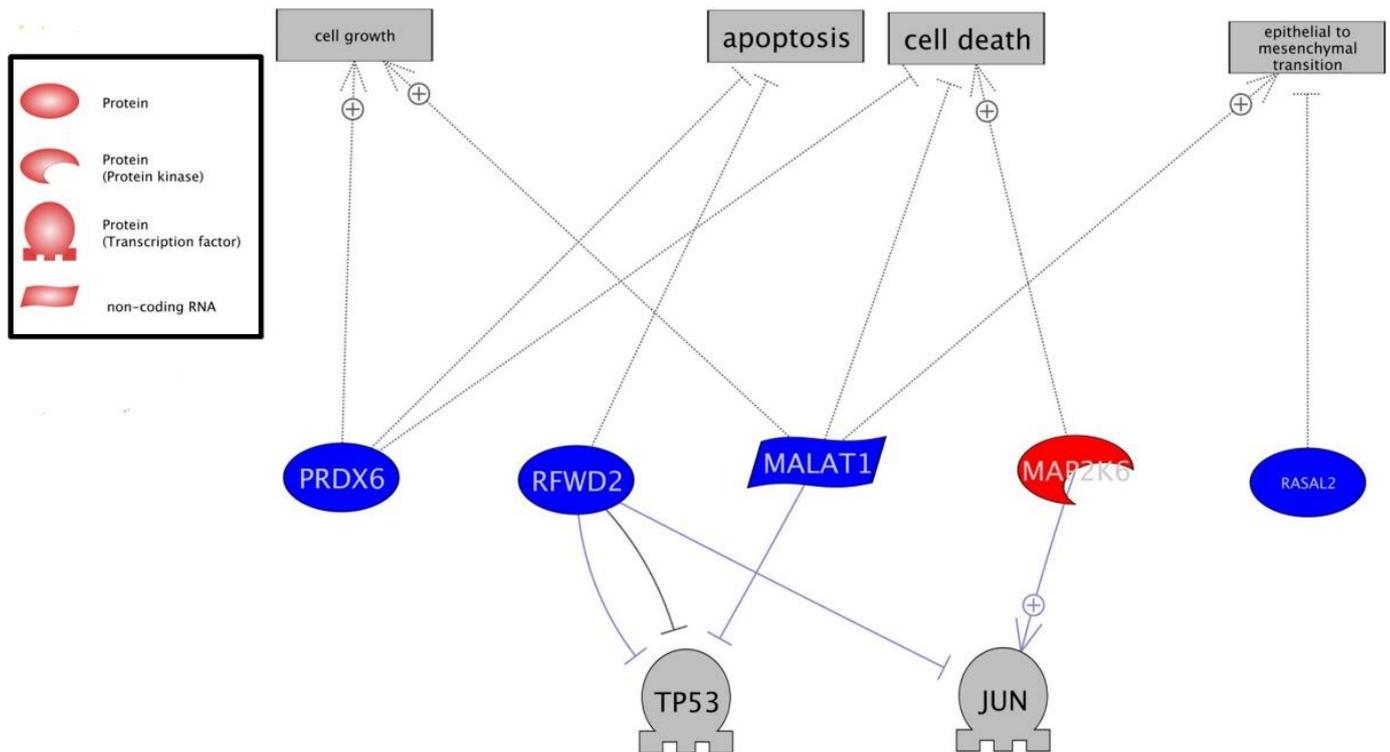


Fig 6. Gene expression with the same regulation (up or down respectively) in MeWo and MV3 subcutaneous tumors with L1CAM knockdown compared with their respective Luc control counterparts with unaltered L1CAM expression. Analysis using Pathway Studio software: Gene expression upregulated in L1CAM knockdown tumors compared with Luc control tumors with unaltered L1CAM; upregulated expression is given in red, downregulated expression in blue, potentially affected factors / processes in grey.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192525.g006>

probably also differed. L1CAM knockdown led to a decrease in *in vitro* proliferation for MV3, but obviously even increased tumor growth *in vivo*. However, the *in vitro* proliferation assay is performed with cells in 2D culture with a standard cell culture medium. The conditions in this assay are thus quite different from the growth conditions in the animals and it appears not always to be very helpful for predicting the *in vivo* behavior of the cells. Considering the conflicting *in vitro* data we think that it is all the more remarkable that the influence of the L1CAM knockdown on the *in vivo* metastatic potential did not differ between the cell lines as the xenograft model of this study clearly demonstrated that L1CAM expression promotes melanoma metastasis. The unchanged CTC numbers in the xenograft indicate that the number of cells that left the primary tumor and entered the bloodstream (to become CTC) and were able to leave the vasculature to invade underlying tissue indeed did not differ between Luc and L1 kd cells. However, this number might not be directly correlated with the number of metastases as the L1CAM knockdown probably affects steps of the metastatic cascade following extravasation as the increase in p38 phosphorylation (S3 Fig) indicates that the melanoma cells in the L1 kd metastases are more stressed than the Luc controls, but L1CAM expression (albeit lower than in the luc controls) could be detected even in the metastases formed by the L1CAM knockdown cells (Fig 3) indicating that L1CAM is necessary for the outgrowth of metastases. Additionally, involvement of L1CAM in spreading on the abluminal surface of capillaries has been demonstrated in a xenograft model of brain metastasis with human breast and lung cancer cells [23].

Although melanocytes reside in the stratum basale of the epidermis they are not epithelial cells themselves but are derived from the neuronal crest. During malignant transformation

these non-epithelial cells do not undergo a classic EMT (as observed in carcinoma), however, many molecules involved in EMT do also play important roles in the malignant transformation of melanocytes although these roles are sometimes different from classic EMT [24]. For example TWIST1 and ZEB1 increase the metastatic potential of melanoma cells whereas SNAI2 (SLUG) and ZEB2 decrease it [25]. According to our data from this study, L1CAM plays a functional role in melanoma metastasis and can influence the expression of “EMT” genes, however, this role appears to be in later stages of metastasis rather than in earlier stages as would be expected of a “classic” EMT molecule. High L1CAM expression in melanoma can obviously modulate the network of EMT gene expression in a pro-metastatic way with a strong influence on TGF β signaling (Fig 4). Interestingly, L1CAM is able to directly or indirectly regulate TGF β 1 expression and not only vice versa.

For L1CAM low melanoma, a partial compensation for the lack of L1CAM could be an overexpression of JAG1 (Jagged 1), modulating Notch signaling [26]. Upregulation of JAG1 is accompanied by increased Notch and CNTN1 expression indicating that the tumor cells themselves were, at least in part, target of the increased Jagged 1 signaling as there obviously were interactions between tumor cells via Jagged 1 / Notch. Downregulation of CCNC, HIF1A and KAT2B argue for a modulation of NOTCH signaling rather than for a simple increase. Interestingly, the initially L1CAM low MV3 tumors display a high expression of Jagged 1 from the start and further reduction of L1CAM does not lead to a further increase in Jagged 1. Probably, the expression of this Notch ligand cannot be increased beyond a certain point without negative effects for the melanoma cells. Jagged 1 was expressed in lung metastases in all four groups of animals in the xenograft experiment and Jagged 1 has been shown to be overexpressed in melanoma [27]. These findings make it plausible that Jagged 1 expression is promoting metastatic colonization and could thus be another interesting target for melanoma xenograft studies.

Of the genes regulated in the L1 kd tumors of both the initially L1CAM high and L1CAM low cell lines (Fig 6), RASAL2 (Ras GTPase-activating protein nGAP) and MALAT2 (long non-coding RNA Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 2) have been implicated in EMT networking, with the role of RASAL2 still under discussion [28–32]. Regulation of RFW2 (RING finger and WD repeat domain 2, also COP1) and—the only up-regulated gene of the 17 –MAP2K6 (dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6) indicate an increase in p53 [33] and p38 [34] activity and thus lower metastatic potential in the L1 kd tumors. Changes in the p53/p21 (S1 and S2 Figs) and p38 (S3 Fig) pathways could indeed be verified by immunohistochemistry.

According to our results, L1CAM could be a promising target for combination therapy of human melanoma as a knockdown of L1CAM alone already led to a highly significant decrease in metastasis in the xenograft model of human melanoma described in this study even without changes in glycoprotein core-fucosylation by FUT8[12]. Interestingly, this decrease was observed for melanoma cells with originally high L1CAM expression as well as for melanoma cells with initially low L1CAM expression. Obviously, a considerable reduction in L1CAM causes a serious disruption of the highly complex intra- and/or intercellular signaling network determining the melanoma cells’ metastatic potential. The fact that the melanoma cells were not able to fully compensate the partial loss of L1CAM makes this CAM a highly interesting therapeutic target to prevent further metastatic spread in patients. It might be more feasible to interfere in L1CAM expression (e.g. by small molecule inhibitors) which would affect “only” L1CAM dependent cells than to interfere in glycoprotein core-fucosylation which would hit every cell in the human body. L1Cam could be an especially interesting target, as even patients with L1CAM low melanoma could profit from anti-L1CAM treatment.

Supporting information

S1 Fig. Human melanoma xenograft model: Immunohistochemical analysis reveals increased p53/p21 pathway activity in the subcutaneous tumors with L1CAM knockdown (L1 kd). Immunohistochemical staining for p53 or p21 expression (red) in subcutaneous (s.c.) tumors of human melanoma cells (MeWo and MV3) with unchanged L1CAM expression (Luc, respective upper panels) and L1CAM knockdown (L1 kd, respective lower panels). All scale bars: 100 μ m. Stainings show increased p53 for MeWo L1 kd tumors only but increased p21 for MeWo and MV3 L1 kd tumors.
(TIF)

S2 Fig. Human melanoma xenograft model: Immunohistochemical analysis shows no increase in p53/p21 in the remaining lung metastases for animals with L1CAM knockdown (L1 kd) tumors. Immunohistochemical staining for p53 (left panels) or p21 (right panels) expression (red) in lung metastases of human melanoma cells (MeWo and MV3) with unchanged L1CAM expression (Luc, respective upper panels) and L1CAM knockdown (L1 kd, respective lower panels). All scale bars: 50 μ m. Stainings show no change in p53 and p21 expression for MeWo and MV3 L1 kd cells.
(TIF)

S3 Fig. Human melanoma xenograft model: Immunohistochemical analysis shows an increase in phospho-p38 in the lung metastases for animals with L1CAM knockdown (L1 kd) tumors. Immunohistochemical staining for phospho-p38 (red) in lung metastases of human melanoma cells (MeWo and MV3) with unchanged L1CAM expression (Luc, respective upper panels) and L1CAM knockdown (respective lower panels). All scale bars: 50 μ m.
(TIF)

S1 Table. Comparison of the gene expression of subcutaneous MeWo tumors in scid mice with L1CAM knockdown (MeWo L1 kd) versus expression of MeWo Luc control (MeWo Luc) tumors. Included are only fold changes at least \pm 1.51; ANOVA and adjusted p-values <0.05 .
(DOCX)

S2 Table. Comparison of the gene expression of subcutaneous MV3 tumors in scid mice with L1CAM knockdown (MV3 L1 kd) versus expression of MV3 Luc control (MV3 Luc) tumors. Included are only fold changes at least \pm 1.51; ANOVA and adjusted p-values <0.05 .
(DOCX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Renate Gehrcke, Susanne Feldhaus, Hanna Maar and Jennifer Schröder-Schwarz for excellent technical assistance.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Grant 14-44-00051).

This work was also funded by SRC Bioclinicum, Moscow:

This funder provided support in the form of (part of) the salaries for authors T.S., V.G., M. S. and E.K., but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Author Contributions

Conceptualization: Timur R. Samatov, Thomas Haalck, Tobias Lange, Udo Schumacher, Daniel Wicklein.

Data curation: Ann-Kathrin Ernst, Annika Putscher, Timur R. Samatov, Tobias Lange, Hanna Maar, Jennifer Schröder-Schwarz, Kristoffer Riecken, Daniel Wicklein.

Formal analysis: Timur R. Samatov, Anna Suling, Vladimir V. Galatenko, Maxim Yu Shkurnikov, Evgeny N. Knyazev, Tobias Lange, Daniel Wicklein.

Funding acquisition: Timur R. Samatov, Alexander G. Tonevitsky.

Investigation: Ann-Kathrin Ernst, Annika Putscher, Hanna Maar, Jennifer Schröder-Schwarz, Kristoffer Riecken, Daniel Wicklein.

Methodology: Anna Suling, Vladimir V. Galatenko, Maxim Yu Shkurnikov, Evgeny N. Knyazev, Tobias Lange, Kristoffer Riecken, Daniel Wicklein.

Project administration: Timur R. Samatov, Alexander G. Tonevitsky, Udo Schumacher, Daniel Wicklein.

Resources: Timur R. Samatov, Alexander G. Tonevitsky, Daniel Wicklein.

Software: Anna Suling, Vladimir V. Galatenko, Maxim Yu Shkurnikov, Evgeny N. Knyazev.

Supervision: Thomas Haalck, Udo Schumacher, Daniel Wicklein.

Validation: Anna Suling, Vladimir V. Galatenko, Evgeny N. Knyazev, Hanna Maar, Jennifer Schröder-Schwarz, Daniel Wicklein.

Visualization: Daniel Wicklein.

Writing – original draft: Anna Suling, Thomas Haalck, Daniel Wicklein.

Writing – review & editing: Timur R. Samatov, Anna Suling, Vladimir V. Galatenko, Evgeny N. Knyazev, Alexander G. Tonevitsky, Thomas Haalck, Tobias Lange, Kristoffer Riecken, Udo Schumacher, Daniel Wicklein.

References

1. van Zeijl MC, van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Wouters MW. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.07.001> PMID: 27453302.
2. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364(26):2507–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782> PMID: 21639808; PubMed Central PMCID: PMC3549296.
3. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012; 380(9839):358–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X) PMID: 22735384.
4. Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*. 1988; 334(6184):701–3. <https://doi.org/10.1038/334701a0> PMID: 3412448.
5. Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S, et al. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell adhesion & migration*. 2012; 6(4):374–84. <https://doi.org/10.4161/cam.20832> PMID: 22796939; PubMed Central PMCID: PMC3478260.
6. Samatov TR, Wicklein D, Tonevitsky AG. L1CAM: Cell adhesion and more. *Prog Histochem Cytochem*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.05.001> PMID: 27267927.
7. Altevogt P, Doberstein K, Fogel M. L1CAM in human cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2016; 138(7):1565–76. <https://doi.org/10.1002/ijc.29658> PMID: 26111503.
8. Colombo F, Meldolesi J. L1-CAM and N-CAM: From Adhesion Proteins to Pharmacological Targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36(11):769–81. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.004> PMID: 26478212.
9. Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, et al. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *European journal of cancer*. 2002; 38(13):1708–16. PMID: 12175686.

10. Doberstein K, Harter PN, Haberkorn U, Bretz NP, Arnold B, Carretero R, et al. Antibody therapy to human L1CAM in a transgenic mouse model blocks local tumor growth but induces EMT. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015; 136(5):E326–39. <https://doi.org/10.1002/ijc.29222> PMID: 25230579.
11. Hoja-Lukowicz D, Link-Lenczowski P, Carpentieri A, Amoresano A, Pochec E, Artemenko KA, et al. L1CAM from human melanoma carries a novel type of N-glycan with Galbeta1-4Galbeta1- motif. Involvement of N-linked glycans in migratory and invasive behaviour of melanoma cells. *Glycoconj J*. 2013; 30(3):205–25. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9374-5> PMID: 22544341; PubMed Central PMCID: PMC3606521.
12. Agrawal P, Fontanals-Cirera B, Sokolova E, Jacob S, Vaiana CA, Argibay D, et al. A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis. *Cancer cell*. 2017; 31(6):804–19 e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.007> PMID: 28609658.
13. Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer*. 2007; 96(4):609–16. Epub 2007/01/31. 6603594 [pii] <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603594> PMID: 17262079.
14. Gast D, Riedle S, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, et al. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005; 115(4):658–65. <https://doi.org/10.1002/ijc.20869> PMID: 15704102.
15. Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther*. 2010; 17(4):511–20. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.149> PMID: 20016542.
16. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol*. 2002; 76(3):1488–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.3.1488-1495.2002> PubMed Central PMCID: PMC36135847. PMID: 11773421
17. Wicklein D. RNAi technology to block the expression of molecules relevant to metastasis: the cell adhesion molecule CEACAM1 as an instructive example. *Methods in molecular biology*. 2012; 878:241–50. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_16 PMID: 22674138.
18. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*. 2010; 102(11):1555–77. Epub 2010/05/27. 6605642 [pii] <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642> PMID: 20502460.
19. Stübke K, Wicklein D, Herich L, Schumacher U, Nehmann N. Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Lett*. 2012; 321(1):89–99. Epub 2012/03/01. S0304-3835(12)00120-6 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.019> PMID: 22366582.
20. Jojovic M, Schumacher U. Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett*. 2000; 152(2):151–6. Epub 2000/04/25. S0304383599004437 [pii]. PMID: 10773406.
21. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B*. 1995; 57(1):289–300.
22. Shannan B, Peregó M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016; 167:1–15. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_1 PMID: 26601857.
23. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*. 2014; 156(5):1002–16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040> PMID: 24581498; PubMed Central PMCID: PMC3988473.
24. Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G, Ferraro PT. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol*. 2015; 5:31. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00031> PMID: 25763355; PubMed Central PMCID: PMC4327420.
25. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer cell*. 2013; 24(4):466–80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018> PMID: 24075834.
26. Previs RA, Coleman RL, Harris AL, Sood AK. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(5):955–61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0809> PMID: 25388163; PubMed Central PMCID: PMC4333206.
27. Massi D, Tarantini F, Franchi A, Paglierani M, Di Serio C, Pellerito S, et al. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006; 19(2):246–54. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800526> PMID: 16341148.
28. Feng M, Bao Y, Li Z, Li J, Gong M, Lam S, et al. RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2014; 124(12):5291–304. <https://doi.org/10.1172/JCI76711> PMID: 25384218; PubMed Central PMCID: PMC4348963.

29. McLaughlin SK, Olsen SN, Dake B, De Raedt T, Lim E, Bronson RT, et al. The RasGAP gene, RASAL2, is a tumor and metastasis suppressor. *Cancer cell*. 2013; 24(3):365–78. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.004> PMID: 24029233; PubMed Central PMCID: PMC3822334.
30. Xu S, Sui S, Zhang J, Bai N, Shi Q, Zhang G, et al. Downregulation of long noncoding RNA MALAT1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K-AKT pathway in breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(5):4881–91. PMID: 26191181; PubMed Central PMCID: PMC4503053.
31. Xue Y, Teng YQ, Zhou JD, Rui YJ. Prognostic value of long noncoding RNA MALAT1 in various carcinomas: evidence from nine studies. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3915-z> PMID: 26282005.
32. Tian Y, Zhang X, Hao Y, Fang Z, He Y. Potential roles of abnormally expressed long noncoding RNA UCA1 and Malat-1 in metastasis of melanoma. *Melanoma research*. 2014; 24(4):335–41. <https://doi.org/10.1097/CMR.000000000000080> PMID: 24892958.
33. Wei W, Kaelin WG Jr. Good COP1 or bad COP1? In vivo veritas. *J Clin Invest*. 2011; 121(4):1263–5. <https://doi.org/10.1172/JCI57080> PMID: 21403396; PubMed Central PMCID: PMC3069793.
34. Stein B, Brady H, Yang MX, Young DB, Barbosa MS. Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(19):11427–33. PMID: 8626699.

2. Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung - Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine von den Melanozyten der Haut ausgehende bösartige Neoplasie. Jährlich erkranken in Deutschland rund 23.000 Männer und Frauen (zu etwa gleichen Anteilen) an einem malignen Melanom.^[1] In Deutschland hatte das maligne Melanom der Haut im Jahre 2016 einen prozentualen Anteil von 4,7% der Krebsneuerkrankungen bei Männern und 4,8% der Krebsneuerkrankungen bei Frauen.^[2]

Seit im Jahre 2008 bundesweit ein Hautkrebsscreening eingeführt wurde, werden Melanome deutlich häufiger in einem frühen Stadium diagnostiziert. Zwei Drittel der neu entdeckten malignen Melanome befindet sich noch im frühen T1-Stadium (Tumordicke ≤ 1 mm nach Breslow).^[3] Dank der frühzeitigen Diagnose und Therapie des malignen Melanomes betrug 2016 in Deutschland die 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen 93% und bei Männern 91%.^[3]

Von dem Primärtumor selbst geht in der Regel für die Patienten keine tödliche Gefahr aus, das maligne Melanom neigt jedoch zu einer hohen Metastasierungsrate. Es metastasiert bevorzugt auf dem lymphatischen Weg in Lymphknoten und die umliegende Haut oder auf dem hämatogenen Weg in Lunge, Leber, Knochen oder Gehirn.^[4]

Solange das maligne Melanom die Basalmembran der Epidermis nicht durchbrochen und nicht metastasiert hat, kann es durch einfaches Ausschneiden kurativ therapiert werden.^[5] Liegen bei Diagnosestellung bereits Lymphknotenmetastasen vor, sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich auf 25-50%.^[6] Bei Vorliegen von Fernmetastasen sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf unter 20%.^[4]

Bei Vorliegen von Fernmetastasen kann eine Chemotherapie das Überleben der Patienten verlängern, eine Heilung kann jedoch nur sehr selten erreicht werden, ein Wiederkehren von Tumor und Metastasen bei Entwicklung von Resistenzen gegen die Chemotherapeutika innerhalb weniger Monate ist häufig.^{[4],[6]} Eine Kombination verschiedener Chemotherapien führt zu einem längeren Überleben, ist jedoch nur unter spezifischen Voraussetzungen (z.B. BRAF Mutation) möglich.^[7]

Die Entwicklung neuer Chemotherapeutika mit anderen Angriffspunkten ist dringend notwendig, um die Therapieoptionen bei metastasiertem malignen Melanom

entscheidend zu erweitern. Eine Vielzahl an Proteinen, die sich als Ziel für neue Therapien anbieten könnten, ist bereits bekannt, jedoch noch nicht eingehend auf ihre Bedeutung in der Metastasierungskaskade hin untersucht. Eines davon ist das Oberflächenmolekül *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM).

L1CAM ist ein 140kD großes Transmembranprotein, das zu den Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie zählt. Es spielt unter anderem eine Rolle bei Wachstum und Differenzierung von neuronalen Zellen. Als Homodimer bewirkt es eine Zelladhäsion auch bei verschiedenen nichtneuronalen Zellen. L1CAM wurde die CD (Cluster of differentiation) Nummer 171 zugeordnet.^{[8],[9]}

Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine starke Expression von L1CAM in unterschiedlichen Tumorarten einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellt.^[10] Tumore mit erhöhter L1CAM-Expression wiesen eine verstärkte Metastasierung^[11], ein ungünstigeres Grading, ein invasiveres Wachstum und eine schlechtere Überlebensprognose auf.^[12] Dies wurde bisher unter anderem für Pankreasgangs^[13]- und Gallenblasen^{[14],[15]}, Mamma^[16]-, Ovarial-^[17] und das Kolorektale Karzinom^[18] gezeigt.

Auch in Präparaten von Melanomen und Metastasen von Melanomen zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung häufig eine erhöhte Expression von L1CAM besonders in den invasiven Wachstumszonen.^[19]

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Unterdrückung des Oberflächenmoleküls zu einer Reduktion der Metastasierung führt und somit gegebenenfalls einen neuen Ansatz zur Entwicklung weiterer medikamentöser Therapieoptionen des metastasierten/metastasierenden malignen Melanomes bietet.

Dazu führten wir sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche mit zwei Melanomzelllinien nach Knockdown von L1CAM durch.

2.2 Material und Methoden - Die Melanomzelllinien MV3 und MeWo

Sowohl MV3 als auch MeWo sind Zelllinien von humanen Melanomen, die bereits in der Melanomforschung etabliert sind.^[20] Beide verwendeten Zelllinien sind vom *Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* zertifiziert. Es ist bekannt, dass MeWo im Wildtyp deutlich mehr L1CAM exprimiert als MV3. Wir nutzten für diese Arbeit bewusst diese beiden Zelllinien mit ihren unterschiedlichen L1CAM high und low Expressionsprofilen.

Knockdown von L1CAM

Zur Herstellung stabiler Zelllinien mit einem Knockdown des Proteins L1CAM (Silencing) wurde ein für eine zur mRNA für L1CAM komplementäre shRNA lentiviral mittels des Vektors pLVX in die MeWo und MV3 Zellen eingebracht (Transduktion). Im Genom der Zellen eingebaut, codiert diese Gensequenz für eine shRNA, welche die mRNA für L1CAM inaktiviert. Im Folgenden sind die erfolgreich mit einem stabilen Knockdown von L1CAM hergestellten Subzelllinien benannt als MeWoL1kd und MV3L1kd.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Kontrollzellen beider Zelllinien mit einem Plasmid einer gegen die mRNA der Luciferase des Glühwürmchens (firefly luciferase) gerichteten shRNA transfiziert. Es entstanden die Kontrollsubzelllinien MeWoLuc und MV3Luc.

Die transduzierten Zellen wurden durch Puromycinresistenz selektiert und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von L1CAM untersucht. Es zeigte sich eine, im Vergleich zum Wildtyp (MeWoLuc/MV3Luc), >85% (MeWoL1kd) und >75% (MV3L1kd) reduzierte Expression von L1CAM.

In vitro Versuche

Nach erfolgreicher Herstellung der Subzelllinien mit stabilem Knockdown von L1CAM wurde zunächst das Verhalten der Zellen bei Simulation unterschiedlicher für die Metastasierung relevanter Schritte *in vitro* untersucht.

Innerhalb von 48 Stunden proliferierten MeWoL1kd signifikant mehr und bildete mehr Kolonien als MeWoLuc. MV3L1kd proliferierte signifikant weniger als MV3Luc, im Koloniebildungsverhalten zeigte sich bei beiden MV3 Zelllinien kein Unterschied.

Das Invasionsverhalten wurde mittels des BioCoat Systems untersucht, hier zeigte sich keine signifikante Veränderung des Invasionsverhalten *in vitro* durch den Knockdown bei beiden Zelllinien.

Adhärenz an Epithelzellen (HUVEC) bei Scherkräften zeigte sich bei MeWoL1kd im Vergleich zum Wildtyp signifikant gesteigert, bei MV3 kam es zu weniger Adhärenz durch Knockdown von L1CAM.

Die Diversität der *in vitro* Ergebnisse sowohl innerhalb der Zelllinien als auch zwischen ihnen spiegelt wider, dass der Metastasierungsprozess ausgesprochen

kompliziert und multifaktoriell bedingt ist. Das Zellverhalten *in vitro* beleuchtet lediglich Einzelaspekte der Metastasierungskaskade und kann daher keine finalen Rückschlüsse auf die Rolle von L1CAM in ebenjener zulassen.

Zur weiterführenden und realitätsnäheren Überprüfung unserer Fragestellung bedienten wir uns eines etablierten Xenograft Mausmodelles ^[20] zur Untersuchung des Verhaltens der Knockdownzellen *in vivo*.

Mausmodell mit humanen Tumoren (Xenograft)

Ausgewählt wurde eine Mauslinie (Balb/c) mit severe combined immune deficiency (SCID). Durch eine Mutation besitzen SCID-Mäuse keine funktionellen B- und T-Lymphozyten. Aufgrund dieser Schwäche des Immunsystems sind die Mäuse nicht in der Lage, fremde oder entartete Zellen abzustößen und eignen sich somit gut für die *in vivo* Untersuchung von humanen Tumoren in Tieren.

Das Experiment wurde von der *Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit, Verbraucherschutz; Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg* genehmigt und unter der Projektnummer G10/55 geführt. Eine Bewilligung des Versuches durch die Ethikkommission war im Vorfeld erfolgt. Die Haltung der Tieren und die Durchführung des Experiments erfolgten nach „UKCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia“.^[21]

40 Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt, je eine Gruppe von zehn Tieren pro Subzelllinie (MeWoL1kd, MeWoLuc, MV3L1kd, MV3Luc).

Den Mäusen wurden in CO₂/O₂-Narkose je 10⁶ Zellen der jeweiligen Zelllinie unterhalb des rechten Schulterblattes subkutan injiziert.

Die Mäuse wurden im Verlauf täglich gesichtet. Beurteilt wurde das (Sozial-) Verhalten und Aussehen der Mäuse, Tumorstadium und geschätzte Tumorgroße, Haut und Fell über dem wachsenden Tumor. Bei krank/gestresst wirkender Maus, verändertem Fress-/Sozial-/Bewegungsmuster, Ulzeration der Haut oberhalb des Tumors oder Erreichen eines geschätzten Tumorgewichts von 10% des Mausegewichts galten die Endpunkte als erreicht und die Mäuse wurden getötet und die Organe zur Probengewinnung entnommen.

Nach einer Betäubung mittels gewichtsadaptierter (10 µl/g Körpergewicht [µl =Mikroliter, g=Gramm]) subkutaner Injektion einer Mischung aus 8% Xylazin, 12%

Ketamin und 80% Kochsalzlösung wurde der Maus mittels kardialer Punktion 200 µl Blut entnommen anschließend erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation.

Die Zeit bis zum Eintreten eines der o.g. Endpunkte wurde als Überlebenszeit definiert. Die Überlebenszeit unterschied sich in den jeweiligen, zu einer Zelllinie gehörenden Subzelllinien (L1kd vs Luc) nicht signifikant.

Aus der MV3-Gruppe konnten je neun Tiere aus MV3L1kd und MV3Luc in die weiterführenden Versuche eingehen, je ein Tier starb vorzeitig, ohne einen der definierten Endpunkte erreicht zu haben.

In der ersten Versuchsreihe mussten in den MeWo-Gruppen vier Tiere in der MEWoL1kd und in der MeWoLuc-Gruppe drei Tiere aufgrund der Entwicklung eines murinen Lymphoms vorzeitig getötet werden. Diese vorzeitig verstorbenen Tiere konnten nicht für die weiterführenden Versuche verwendet werden.

Die Versuchsreihe der MeWo Zelllinie wurde mit 30 Tiere in zwei Gruppen wiederholt. Aus dieser Gruppe konnten die Proben von 26 Tieren in die weiterführenden Versuche eingehen (14 MeWoL1kd und 12 MeWoLuc).

Die linke Lungenhälfte der Mäuse wurde kryokonserviert und für eine quantitative real time (qRT)-PCR (polymerase-chain-reaction) verwendet, um quantitativ den Anteil von humaner DNA (Desoxyribonukleinsäure) aus den humanen Melanomzellen nachzuweisen. Die rechte Lungenhälfte wurde histologisch aufgearbeitet, so konnten Metastasen im Lichtmikroskop gezählt und qualitativ beurteilt werden. Auch Blut und Knochenmark, gewonnen aus kardialer Punktion respektive aus beiden Oberschenkelknochen, wurden mithilfe der qRT-PCR auf humane DNA, also zirkulierende (circulating tumor cellc = CTC) beziehungsweise eingewanderte Tumorzellen (disseminated melanoma cells = DMC) überprüft.

Des Weiteren wurden die Primärtumoren zur Hälfte in Paraffin gebettet, die andere Hälfte wurde zur RNA (Ribonukleinsäure) Microarrayanalyse im Verlauf zunächst kryokonserviert.

Quantifizierung der humanen DNA in mauseigenen Geweben

Zunächst erfolgte die Isolierung der DNA aus den für die PCR Analyse bestimmten Geweben (linke Lungenhälfte, Knochenmark, Blut), es schloss sich die Vervielfältigung der humane DNA in der PCR an.

Für diese Arbeit fanden Primer für Alu-Sequenzen Verwendung, die nur in humaner DNA vorkommen. Somit wurde nur humane DNA in der PCR vervielfältigt. Durch Zugabe des Fluoreszenz-Farbstoffes SYBR-green, der in der vervielfältigten DNA interkaliert, entsteht im LightCycler ein Lichtsignal, welches proportional zur Menge der humanen DNA im Versuchsansatz ist. Somit kann eine quantitative Bestimmung der Menge humaner DNA erfolgen. Je mehr humane DNA vorhanden ist, desto stärker muss eine Einwanderung humaner Zellen aus dem Primärtumor (Metastasierung) in das jeweilige Gewebe stattgefunden haben. So wurden die Anteile humaner DNA in der isolierten DNA aus Lungen, Knochenmark und Blut bestimmt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der Zelllinie zwischen L1kd und Luc in der Menge der humanen DNA in den Lungen der Mäuse, ebenso wenig in der Menge der CTC.

Im Knochenmark der Mäuse fand sich insgesamt sehr wenig humane DNA, in vielen Proben gar keine. Es scheinen also nur vereinzelt Zellen in das Knochenmark der Mäuse eingewandert zu sein. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl in der MeWo Gruppe als auch in der MV3 Gruppe signifikant häufiger humane DNA im Knochenmark der Luc-Subgruppen zu finden war, dass also sowohl bei MeWoL1kd als auch bei MV3L1kd weniger Einwanderung von Tumorzellen in das Knochenmark stattgefunden hatte.

Auf die Anzahl der im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC) hatte ein Knockdown von L1CAM keinen Einfluss, hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei beiden Subgruppen (Luc vs L1kd) einer Zelllinie.

Genexpressionsanalyse

Ribonukleinsäure (RNA) wurde aus den Tumorproben extrahiert und eine Genexpressionsanalyse mittels GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 durchgeführt.

Konkordant und signifikant zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp in beiden Zelllinien 17 Gene reguliert, in den einzelnen Zelllinien waren auch weitere Gene jedoch unter den Zelllinien unterschiedlich herauf- und herabreguliert.

Das Muster dieser Regulationen wies deutlich auf eine zentrale Rolle von Tumor Growth Factor β (TGF β) für Begünstigung von Metastasierung hin. TGF β selbst war in den MeWoL1kd fünffach herabreguliert.

Ebenso zeigte sich eine Herabregulation von Genen, welche als an der epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beteiligt bekannt sind. Eine Ausnahme stellte die erhöhte Expression von Jagged1 und Notch1 in MeWoL1kd dar, welche auch in der immunhistochemischen Färbung bestätigt werden konnte.

Zwischen den MV3 Subzelllinien ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Jagged1 und Notch1 darstellen, auch dies entsprach den Ergebnissen der Immunhistochemie.

In beiden Zelllinien ließ sich im Knockdown eine Heraufregulation von p53/p21 zeigen, in MeWo jedoch deutlicher als in MV3.

Die Zusammenschau legt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Metastasierung der Subzelllinien mit L1CAM Knockdown unter anderem durch die verminderte Aktivität von TGF β , an der EMT beteiligten Genen, sowie der Heraufregulation von p53/p21 bedingt ist.

Histologie

Nach Zerkleinerung der rechten Lungenhälften, Einbettung in Paraffin und Aushärtung der Paraffinblöcke, erfolgte die Herstellung von 5 μ m dünnen Schnittpräparaten mit einem Mikrotom. Dabei wurde jeder 10. Schnitt nach Anschneiden des Präparates aufgefangen und auf einem Objektträger fixiert. Auf der Hälfte des Präparates wurde eine Serie von zwanzig unmittelbar aufeinander folgenden Schnitten auf speziellen Objektträgern für Immunhistochemie aufgefangen und fixiert. Das Schneiden der Lungenpräparate führte sich fort, bis kein Gewebe mehr im Paraffinblock vorhanden war, so konnte eine gesamte Schnitzzahl als Maß der Größe der Lunge ermittelt werden.

Um die sich in der rechten Lungenhälfte befindenden Metastasen auszählen zu können, wurden von jedem Präparat zehn Schnitte nach dem Aspekt der angeschnittenen Fläche ausgewählt. Dabei lag das Augenmerk darauf, diejenigen zehn Schnitte auszuwählen, auf denen der größte Teil des Präparates angeschnitten war. Es folgte eine Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin-

Färbung (HE-Färbung). In der HE-Färbung erscheint das mauseigene Lungengewebe rot, die Metastasen hingegen blau-violett, neuronale Strukturen blau. Die Schnittpräparate wurden mäanderförmig durchgemustert und so in jedem Schnitt die Anzahl der Metastasen bestimmt. Beim Auszählen der Metastasen war nur die interne Nummer der Maus auf dem Objektträger vermerkt, nicht jedoch ob es sich bei dem Ursprungstumor um die Zellen mit Knockdown oder Wildtyp handelte. Das Zählen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Hand-/Klickzählers.

Die Anzahl der Metastasen in der rechten Lungenhälfte konnte folgendermaßen berechnet werden: $((M_{10}/10) \times S_{\text{ges}}) - (0,2 \times ((M_{10}/10) \times S_{\text{ges}}))$

M_{10} = Anzahl Metastasen in den zehn Schnitten eines Präparates

S_{ges} = Zahl aller Schnitte des Präparates

Durch diese Formel wird berücksichtigt, dass in den nicht ausgezählten Schnitten des Präparates weniger Lungengewebe und somit auch weniger Metastasen vorhanden sind.

Es zeigten sich in beiden Gruppen signifikant mehr Metastasen in den Lungen derjenigen Mäuse, welche Tumore mit dem L1CAM Wildtyp (MeWoLuc und MV3Luc) getragen hatten. Bezogen auf Überlebensdauer und Tumorgröße zeigten sich 7,26-mal mehr Metastasen.

Qualitativ erschienen die Metastasen bei L1kd Tumoren im Schnitt größer zu sein. Hierzu erfolgte jedoch keine standardisierte Auswertung. Dies könnte erklären, dass in den mithilfe der PCR untersuchten Lungengewebe quantitativ kein signifikanter Unterschied an humaner DNA zwischen den Gruppen L1kd und Luc beider Zelllinien darstellen ließ: in den Lungen der Mäuse mit Tumoren aus L1CAM Knockdown Subzelllinien waren weniger Metastasen, diese waren jedoch größer, umfassten also mehr Zellen und somit mehr humane DNA.

Mithilfe immunhistochemischer Methoden wurden sowohl Schnitte von Tumoren als auch von Lungen aller vier Subzelllinien auf L1CAM angefärbt.

Wie bereits beschrieben, ist bekannt, dass MeWo im Wildtyp viel L1CAM, MV3 jedoch bereits im Wildtyp wenig L1CAM exprimiert.^[20] Es zeigte sich bestätigend eine kräftige Färbung bei MeWoLuc (Wildtyp) jedoch auch eine schwache, aber deutliche Färbung in den Präparaten von MeWoL1kd. Bei der Färbung von

Präparaten beider Subgruppen der Zelllinie MV3 musste die Färbung dahingehend modifiziert werden, dass nach der Anwendung des primären Antikörpers eine Verstärkung durch das K5005 AP/RED Rabbit/Mouse staining Kit notwendig war.

Im Verlauf erfolgten auch immunhistochemische Färbungen für Jagged1 (Jag1), Notch1, p53, p21, p38. Auch nach diesen Färbungen fand das K5005 AP/RED Rabbit/Mouse staining Kit Anwendung.

Eine erhöhte Expression von Jag1 und Notch1 in den L1kd ließ sich deutlich in der MeWoL1kd Subgruppe darstellen. MV3 zeigte bereits im Wildtyp mehr Expression von Jag1/Notch1 als MeWo. Es ließ sich keine Veränderung bei Knockdown darstellen.

3. Diskussion

In vitro ließ sich kein eindeutiger Einfluss von L1CAM auf Einzelschritte des komplizierten Metastasierungsprozesses zeigen. Ein Einfluss zeigte sich im Tierversuch, der realen Bedingungen bekanntermaßen wesentlich näher ist, jedoch umso deutlicher. Interessant ist, dass der Einfluss von L1CAM Expression auf das Metastasierungs geschehen sowohl in der Zelllinie der im Wildtyp viel L1CAM exprimierenden MeWo, als auch in der im Wildtyp wenig L1CAM exprimierenden MV3 Zellen, zu beobachten ist.

L1CAM könnte also als Ziel eines neuen Therapeutikums sowohl bei Patienten mit malignen Melanomen mit einer hohen sowie mit einer niedrigen L1CAM Expression dienen. Des Weiteren ist L1CAM ein Oberflächenprotein, welches nicht auf allen körpereigenen Zellen exprimiert wird, so dass eine Selektion der Wirkung eines potenziellen Therapeutikums auf wenige Gewebe stattfindet, unerwünschte Arzneimittelwirkungen könnten somit reduziert werden.

Bei welchem Schritt der Metastasierungskaskade L1CAM exakt begünstigend einwirkt, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Es scheint jedoch nicht das Auswandern der Zellen aus dem Tumor ins Gefäßsystem (in dieser Arbeit in Form der CTC untersucht) zu begünstigen.

Ein weiteres Protein, welches in weiteren Arbeiten untersucht werden sollte, ist Jagged 1. Jagged1 zeigte sich als einziges unter den ansonsten nach L1CAM knockdown herabregulierten EMT-assoziierten Genen überexprimiert, scheinbar zur Kompensation des stillgelegten L1CAMs.

4. Literaturverzeichnis

- [1] Krebsregisterdaten von 2016. Homepage des Zentrum für Krebsregisterdaten Deutschland, Unterseite „Krebsarten – Malignes Melanom der Haut“
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.htm Abruf 23.07.2020
- [2] „Krebs in Deutschland 2015/2016“ gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Institutes und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. herausgegeben vom Robert-Koch-Institut 2019. Seite 17 (zuletzt abgerufen am 23.07.2020)
- [3] „Krebs in Deutschland 2015/2016“ gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Institutes und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. herausgegeben vom Robert-Koch-Institut 2017. Kapitel „Malignes Melanom der Haut“ ab Seite 64 ff (zuletzt abgerufen am 23.07.2020)
- [4] A Sandru, S Voinea, E Panaitescu, A Blidaru „Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma“ J Med Life. 2014 Oct-Dec; 7(4): 572–576. PMID 25713625 PMCID PMC4316142
- [5] S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ der Deutschen Krebsgesellschaft Langversion 3.1 von Juli 2018
- [6] White RR, Stanley WE, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF „Long-Term Survival in 2,505 Patients With Melanoma With Regional Lymph Node Metastasis“ Ann Surg 2002 Jun; 235(6): 879–887 PMCID PMC1422519 PMID 12035046
- [7] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. „Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.“ N Engl J Med. 2011;364(26):2507–16. pmid:21639808; PubMed Central PMCID: PMCPMC3549296
- [8] Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ Suche nach „L1 cell adhesion molecule human“ Letzter Aufruf 12.11.2019
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3897>
- [9] Datenbank der human protein reference database Suche nach „L1CAM“ Letzter Aufruf 12.11.2019

http://www.hprd.org/summary?hprd_id=02394&isoform_id=02394_1&isoform_name=Isoform_1

[10] Altevogt P, Doberstein K, Fogel M „L1CAM in human cancer“ *Int J Cancer*. 2016 Apr 1;138(7):1565-76. doi: 10.1002/ijc.29658. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26111503 DOI: 10.1002/ijc.29658

[11] Weinspach D, Seubert B, Schaten S, Honert K, Sebens S, Altevogt P, Krüger A “Role of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in the metastatic cascade: promotion of dissemination, colonization, and metastatic growth.” *Clin Exp Metastasis*. 2014 Jan;31(1):87-100. doi: 10.1007/s10585-013-9613-6 PMID: 24002299

[12] Samatov TR, Wicklein D, Tonevitsky AG „L1CAM: Cell adhesion and more.“ *Prog Histochem Cytochem*. 2016 Aug. 51(2):25-32. doi: 10.1016/j.proghi.2016.05.001. Epub 2016 May 24 pmid:27267927

[13] Tsutsumi Sh, Morohashi S, Kudo Y “L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma.” *J Surg Oncol*. 2011 Jun 1;103(7):669-73. doi: 10.1002/jso.21880. Epub 2011 Feb 28.

[14] Choi SY, Jo YS, Huang SM, Liang ZL, Min JK, Hong HJ, Kim JM „L1 cell adhesion molecule as a novel independent poor prognostic factor in gallbladder carcinoma.“ *J Human pathology* 2011 Apr 14, 42(10):1476-1483 PMID: 21496863 DOI: 10.1016/j.humpath.2011.01.003

[15] Jung J, Son YS, Park H, Jeon SK, Lee JW, Choi SY, Kim JM, Kwon YG, Hong HJ, Min JK „The cell adhesion molecule L1 promotes gallbladder carcinoma progression in vitro and in vivo“ *J Oncology Reports*, 2010 Nov 09, DOI: 10.3892/or.2011.1181

[16] Dippel V, Milde-Langosch K, Wicklein D, Schumacher U, Altevogt P, Oliveira-Ferrer L, Jänicke F, Schröder C „Influence of L1-CAM expression of breast cancer cells on adhesion to endothelial cells“ *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Jan;139(1):107-21. doi: 10.1007/s00432-012-1306-z. Epub 2012 Sep 16.

[17] Bondong S, Kiefel H, Hielscher T, Zeimet AG, Zeillinger R, Pils D, Schuster E, Castillo-Tong DC, Cadron I, Vergote I, Braicu I, Sehouli J, Mahner S, Fogel M, Altevogt P „Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF-κB activation“ *Annals of oncology*, 2011 Nov 02, doi:10.1093/annonc/mdr568

[18]Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Yekebas EF, Strate T, Schneider C, Pantel K, Schachner M, Sauter G, Izbicki JR „L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer“ *Modern Pathology* 2007 Sept 14, doi:10.1038/modpathol.3800955_PMCID: PMC2712809 PMID: 19483471

[19] Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U “Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma.” *Eur J Cancer*, 2002 Sep; 38(13):1708-16. DOI: 10.1016/s0959-8049(02)00105-3

[20] Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U „Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice“ *British Journal of Cancer* 96, pages 609–616 2007 Feb 26

[21] „UKCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia“. *Br J Cancer*. 1988 Jul; 58(1): 109–113. doi: 10.1038/bjc.1988.174_PMCID: 17262079
PMCID: PMC2360047

5. Zusammenfassung Deutsch

Das maligne Melanom ist ein aggressiv metastasierender Tumor der Haut. Hat eine Streuung von Tumorzellen stattgefunden, sinken die Heilungschancen dramatisch. Es ist daher von großer Bedeutung, zusätzliche Therapeutika mit neuen Wirkmechanismen zu entwickeln, die eine individualisierte Therapie auch nach stattgehabter Metastasierung ermöglichen und eine weitere Metastasierung verhindern. Eine Vielzahl von Proteinen ist der Krebsforschung bereits ob ihres metastasierungsfördernden Potentials bekannt, ihre genaue Rolle bleibt jedoch teilweise noch unerforscht. Eines dieser Proteine ist das Oberflächenmolekül L1CAM, dessen Einfluss auf die Metastasierung von Melanomzellen in dieser Arbeit analysiert wurde.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Stilllegens (Knockdown) des Oberflächenmoleküls auf das Metastasierungsverhalten zweier Melanomzelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei wurden die zwei sich in ihrer originären Expression dieses Oberflächenmoleküls deutlich unterscheidenden Zelllinien MeWo (initial viel L1CAM) und MeWo (initial wenig L1CAM) ausgewählt.

In *in vitro* Versuchen konnte zunächst kein eindeutiger, beide Zelllinien betreffender, Einfluss des Knockdowns von L1CAM auf das Zellverhalten beider Zelllinien gefunden werden. Es zeigte sich jedoch im Tierversuch, dass sich der Knockdown des Oberflächenmoleküls L1CAM signifikant negativ auf das Metastasierungsverhalten der Melanomzellen *in vivo* auswirkt, unabhängig davon, ob die Zellen initial viel (MeWo) oder wenig (MV3) L1CAM exprimierten. Tumore aus Zellen mit dem L1CAM Knockdown streuten signifikant seltener in das Lungengewebe der Versuchstiere.

Auch eine Auswirkung des Knockdowns von L1CAM auf die Expression von Genen, welche an der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt sind, sowie eine Modulation der Expression der tumorhemmenden Schlüsselproteine p53 und p21 und anderer, ließ sich in dieser Arbeit für beide Zelllinien zeigen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass L1CAM einen signifikanten Einfluss auf das Metastasierungsverhalten von Melanomzellen hat und somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung weiterer medikamentöser Therapien des malignen Melanomes darstellt.

6. Summary English

Malignant melanoma is a malignant neoplasia of the skin, which spreads aggressively. After distant metastases had formed almost no chance for cure exists. Thus, it is extremely important to identify druggable targets with different modes of action to enable individualised therapy even after distant metastases have formed and to prevent the formation of further metastases. Different proteins are already known to be promising targets for therapeutic agents because of their metastases promoting potential. One of these proteins, which need to be researched closely, is the surface protein L1 cell adhesion molecule (L1CAM).

In this work, we investigated the impact of a knockdown of L1CAM protein expression on the ability of malignant melanoma cells to metastasize in *in vitro* models reflecting part of the metastatic cascade and *in vivo* in a xenograft model. We chose two different cell lines: MeWo and MV3. It is known that MeWo wild type cells expressed considerably more L1CAM than wildtype MV3 cells.

The *in vitro* experiments showed no distinct difference in cellular behaviour reflecting metastasis formation between cells with or wildtype cells without L1CAM knockdown.

In vivo however there was a significant reduction in the number of spontaneous metastases into the mouse lungs within both groups of L1CAM knockdown cells. The impact was measurable in both cell lines, in the initially high L1CAM expressing MeWo cells, but also in the initially low L1CAM expressing MV3 cells.

In both cell lines an influence of L1CAM expression on the expression of other genes which modulate epithelial mesenchymal transition or those which suppress melanoma growth such as p53 and p21 were noted.

The significant impact of L1CAM expression on the process of metastasis formation of melanoma cells was shown, which makes L1CAM an interesting novel therapeutic target.

7. Erklärung des Eigenanteils

Die Konzeption und der Entwurf der Arbeit erfolgten zusammen mit PD Dr. rer. nat. Daniel Wicklein und Prof. Dr. med. Udo Schumacher sowie Thomas Haalck und Prof. Dr. med Tobias Lange. Die Betreuung der Arbeit sowie Supervision erfolgten durch Daniel Wicklein und Udo Schumacher.

In vitro:

Zellkultur der MeWo und MV3 Zellen mit Proliferationsdokumentation; Transfektion mit Knockdown von L1CAM sowie Luc; Durchflusszytometrie und Selektion der Zelllinien; Testung des Invasionspotentials, der Koloniebildung und der Adhaerenz erfolgte durch Ann-Kathrin Ernst.

In vivo:

Das Injizieren der Tumorzellen in die Mäuse erfolgte durch Daniel Wicklein und mich. Die tägliche Beurteilung der Mäuse bzgl. des Erreichens eines der Endpunkte erfolgte durch mich.

Das Töten und Präparieren der Mäuse sowie die Asservierung der Proben erfolgte durch Susanne Feldhaus und Carsten Köpcke unter meiner Mithilfe.

Das Herstellen von Schnittpräparaten, die HE-Färbung, das manuelle Auszählen der Metastasen, die Berechnung der Metastasenanzahl der Lungen sowie die immunhistochemische Färbung von Lungen und Tumoren auf L1CAM erfolgte durch mich.

Die immunhistochemische Anfärbung von Lungen und Tumoren auf Jag1, Notch1, p53, p21, p38 erfolgte durch Hanna Maar und Jennifer Schröder-Schwarz.

Die DNA-Isolierung aus Lungen, Blut und Knochenmark und die Alu-rtPCR der daraus resultierenden Proben erfolgte durch mich.

Die mRNA-Arrays sowie deren Analyse wurden im SRC Bioclinicum Moscow durch Timur R. Samatov, Vladimir V. Galatenko, Maxim Yu Shkurnikov, Evgeny N. Knyazev durchgeführt, Institutsleiter A. G. Tonevitsky stellte die Materialien zur Verfügung.

Die Materialien, Geräte und Analysesoftware wurden von Prof. Dr. Udo Schumacher bzw. für die Microarrays von A. G. Tonevitsky zur Verfügung gestellt. Detaillierte Aufführung der genutzten Materialien im paper.

Die Datenanalyse erfolgte durch mich, Daniel Wicklein und Anna Suling.

Der Artikel wurde von Ann-Kathrin Ernst, Daniel Wicklein und mir unter Mitarbeit von Anna Suling und Thomas Haalck verfasst.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Udo Schumacher für die jederzeit humorvolle und geduldige Betreuung, Langmut und langen Atem, Inspiration und Austausch. Selbstverständlich danke ich ihm ebenfalls für die Bereitstellung der Labore und Materialien zur Durchführung dieser Arbeit.

Daniel Wicklein als Betreuer der Arbeit danke ich für die engmaschige Betreuung insbesondere in der Zeit der Laborarbeit, eine unkomplizierte Kommunikation und die vielen Ratschläge auf der langen Wegstrecke.

Mit Blick auf die Zeit im Labor möchte ich auch ganz besonders Hanna Maar, Jennifer Schröder-Schwarz, Tobias Gosau und Christine Knies für Geduld, Hilfsbereitschaft sowie Tips und Tricks bei den praktischen Arbeiten und eine wirklich tolle Zusammenarbeit danken. Susanne Feldhaus und Carsten Köpke danke ich sehr für die Hilfe bei der Arbeit mit den Mäusen.

Ann-Kathrin Ernst danke ich für den Beitrag der *in vitro* Versuche als Vorarbeit zu meinen Versuchen, ebenfalls danke ich allen anderen Mitautoren für die Zusammenarbeit.

Ich danke meiner Familie und besonders meinem Mann Thorsten Putscher sehr für die seelische und physische Unterstützung während der Promotion und darüber hinaus.

Mit dieser Arbeit möchte ich meinen Großmüttern und meiner Großtante gedenken: Meiner Großmutter Diethild Putscher (12.06.1935 - 25.10.2016), die Thomas Mann mindestens genau so liebte wie mein Doktorvater.

Meiner Großtante Marielene Putscher (14.08.1919 – 16.09.1997), die in den 70er und 80er Jahren in Köln als Professorin für Geschichte der Medizin lehrte.

Und meiner Großmutter Christel Kuhnigk (*11.06.1935 auf der Kurischen Nehrung), der einzigen dieser drei so verschiedenen, mich jedoch jede auf ihre Art prägenden Frauen, die meine Promotion miterleben darf.

9. Lebenslauf

- aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt -

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 