

DISS. ETH NO. 19271

Signaling pathways in melanoma

A dissertation submitted to ETH ZURICH

for the degree of DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Ossia-Margarita Rosemarie Eichhoff

Diplom Biologist, Technische Universität Darmstadt (Germany)

born on June 7th 1976 citizen of Darmstadt (Germany)

accepted on the recommendation of

Professor Michael Detmar, examiner Professor Reinhard Dummer, co-examiner

Professor Josef Jiricny, co-examiner

2010

Abstract

Malignant melanoma, the most aggressive form of skin cancer, arises from malignantly transformed melanocytes. To date, early recognition and subsequent surgical removal of primary lesions before metastases can develop, remains the only reliable cure. Once metastasis has occurred patient outlook is very poor (median survival is only 9 months) because the disease has proven refractory to treatment. While some treatments (e.g. MAP kinase pathway inhibitors) have recently begun to show promising results, there are limitations to their effectiveness. One reason for therapy resistance is thought to involve intralesional-heterogeneity of melanoma cells. Therefore a detailed understanding of the molecular nature of melanoma cell heterogeneity is critical for identifying better targets.

Gene expression data collected from different libraries of melanoma cell cultures and lines have revealed two distinct expression signatures. One signature is composed of melanocytic genes and the other of genes known to respond to TGF β signalling. The underlying basis for the melanocytic gene signature is thought to be Wnt-signal-driven expression of microphthalmia-associated transcription factor (Mitf), the master regulator for melanocyte differentiation. Interestingly, the TGF β -like signature includes the Wnt-pathway antagonist Wnt-5a, whose activity is reported to suppress Mitf gene expression.

In vitro, cell cultures with the melanocytic gene signature reveal a proliferative, non-invasive phenotype susceptible to TGF β -mediated growth inhibition. Conversely, cultures expressing the TGF β -like signature proliferate slowly but are highly invasive and resistant to TGF β -mediated growth inhibition. The “phenotype switching model” for melanoma progression argues that melanoma cells switch back-and-forth between these two phenotypes (proliferative and invasive) to drive tumor progression. Therefore the aim of this thesis was to elucidate signalling pathways regulating melanoma phenotype. Moreover, the influence of melanoma phenotype over MAPK pathway inhibition response was also investigated.

The Mitf gene is preferentially expressed in proliferative phenotype melanoma cells. Here we show that Mitf knock-down decreases proliferation, increases cell motility and decreases susceptibility to TGF β , characteristics of the invasive phenotype. Critically, while xenograft experiments showed phenotype-specific tumor growth kinetics, immunohistochemical examination revealed similar heterogeneity for Mitf expression. This represents the first *in vivo* evidence for melanoma cell culture phenotype switching. Phenotype-specific marker heterogeneity and anti-correlation was also demonstrated in a matched melanoma primary/metastasis pair, supporting the hypothesis that phenotype switching occurs during the course of melanoma progression in human patients.

To investigate therapy resistance, cell growth inhibition studies using two different MAP kinase pathway inhibitors currently under investigation in clinical trials, were conducted. This revealed that while proliferative melanoma cells are susceptible, invasive phenotype cells are resistant. Critically, treatment of proliferative phenotype cell cultures with MAPK pathway inhibitors showed evidence of proliferative to invasive phenotype-switching, including down-regulation of melanocytic marker genes and induction of “vascular mimicry”.

Due to the evidence for phenotype switching both *in vitro* and *in vivo*, and because Wnt signalling is likely a critical regulator, the role of Wnt signal-mediating LEF/TCF factors was investigated. It was found that Lef-1 is preferentially expressed in proliferative phenotype cells and confirmed that MITF is a target gene of Lef-1/ β -catenin signalling. It was further shown that Lef-1 inhibits WNT5A and TCF4 expression and that this is independent of β -catenin. Conversely, in invasive phenotype cells Wnt5A and Tcf-4 are strongly up-regulated and Tcf-4 is responsible for Wnt5A expression. Moreover, Wnt5a signals through the non-canonical Wnt pathway mediator PKC to antagonise melanocytic gene expression via down-regulation of Lef-1. Together this data reveals that the balance of opposing canonical and non-canonical Wnt pathways likely contributes, via regulation of melanoma cell phenotype, to disease progression.

The experiments described in this thesis support the hypothesis that melanoma progresses by switching back-and-forth between phenotypes of proliferation and invasion, and indicate that these phenotypes are regulated by canonical and non-canonical Wnt signalling. Future therapies, taking the two-state nature of melanoma biology into account, may therefore usefully target Wnt signalling to treat this disease.

Zusammenfassung

Das bösartige (maligne) Melanom ist die aggressivste und tödlichste Form von Hautkrebs und entsteht aus entarteten Melanozyten. Bis heute sind die Früherkennung und nachfolgende frühzeitige chirurgische Exzision des Primärtumors entscheidend für eine gute Prognose. Im metastasierten Stadium der Erkrankung ist die Überlebenschance für Patienten nach wie vor gering. In den letzten Jahren haben neue Behandlungsversuche (z.Bsp. Inhibitoren des MAP Kinase Signalweg) zwar vielversprechende Ergebnisse gezeigt, aber sie haben auch deutliche Limitationen in der Behandlungswirksamkeit. Es wird vermutet, dass die intra-läsionale Heterogenität der Tumorzellen eine Ursache der Resistenz gegenüber existierenden Behandlungen ist. Für die Identifikation besserer Zielmoleküle im Rahmen neuer Therapieansätze ist das Verständnis der molekularen Ebene der Melanomentstehung notwendig.

Durchgeführte Analysen von Genexpressionsdaten, welche aus verschiedenen Melanom-Datenbanken, sowie von Zelllinien und Kulturen zusammen getragen wurden, zeigten zwei unterschiedliche Genexpressionssignaturen. Während sich die erste Signatur aus der Expression melanozytärer Gene zusammensetzt besteht die zweite Signatur aus Genen, welche durch die TGF β -Signalübermittlung reguliert werden. Die Basis für die melanozytäre Gensignatur bildet wahrscheinlich der vom Wnt-Signal aktivierte microphthalmia-assoziierte Transkriptionsfaktor (Mitf), der als Masterregulator für Melanozytendifferenzierung bekannt ist. Im Gegensatz hierzu enthält die vom TGF β -Signal aktivierte Signatur den Wnt-Signalübermittlungsantagonist Wnt5a, der dafür bekannt ist, die Genexpression von Mitf zu unterdrücken.

In vitro zeigen Zellkulturen mit der melanozytären Gensignatur einen proliferativen, nicht-invasiven Phänotyp, der sensibel auf eine TGF β -vermittelte Wachstumshemmung reagiert. Zellkulturen der anderen Gensignatur zeigen ein nicht-proliferatives, jedoch hochgradig invasives Verhalten und sind resistent gegenüber der TGF β -vermittelter Wachstumshemmung. Das sogenannte „Phenotype-switching-model“ propagiert die Progression der Melanomerkrankung durch Wechsel der Melanomzellen zwischen diesen beiden Phänotypen (proliferativ und invasiv), um die Metastasenbildung voranzutreiben. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die Erforschung von Signalübertragungswegen, welche die unterschiedlichen Phänotypen regulieren. Dessenweiteren wurde der Einfluss der verschiedenen Phänotypen bei der Wachstumsinhibition durch Inhibitoren des MAP Kinase Signalwegs untersucht.

Das Mitf Gen ist vorzugsweise in Zellkulturen mit proliferativem Phänotyp exprimiert. Das Herabsetzen der Mitf Expression führte zu einer Verlangsamung des Zellwachstums, zu einer Erhöhung der Zellmotilität und zu einer Minderung der Empfindlichkeit gegenüber der

Wachstumshemmung durch TGF β . Xenograft-Experimente zeigten ein Tumorwachstum mit phänotyp-spezifischen Wachstumsraten, jedoch zeigten immunhistochemische Untersuchungen eine ähnliche Heterogenität für die Expression von Mitf. Dies ist der erste *in vivo* Hinweis, dass Melanomzellkulturen die Kapazität haben, den Phänotyp zu wechseln. Ebenfalls konnten wir Phänotyp-Heterogenität und Antikorrelation von Phänotypmarkergenen in Primärtumor und Metastase des gleichen Patienten demonstrieren und unterstützen dadurch die Hypothese des „Phänotyp-Wechsels“ im Rahmen der Melanomprogression.

Um Therapieresistenz *in vitro* auf Zellkulturebene zu untersuchen, verwendeten wir zwei Inhibitoren des MAP Kinasen Signalwegs, welche sich zurzeit in klinischen Studien befinden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass proliferative Zellkulturen auf die Hemmung durch diese Stoffe reagieren, während invasive Zellkulturen eine Resistenz aufwiesen. Zudem führte die Behandlung proliferativer Zellkulturen mit den genannten Hemmstoffen dazu, dass diese einen Wechsel ihres Phänotypen durchführten, der zum Einen eine Herunterregulierung von melanozytären Markern und zum Anderen die Ausbildung eines „vaskulogenen Mimikry“ induzierte.

Nachdem wir Indizien für den Wechsel der Zellphänotypen *in vitro* und *in vivo* fanden und die Kontrolle der Wnt-Signalübertragung ein kritischer Regulator hierfür zu sein scheint, untersuchten wir die Rolle der Wnt-Signalübertragungsvermittler der LEF/TCF Faktoren. Wir zeigten, dass Lef-1 bevorzugt von proliferativen Zellkulturen exprimiert wird und konnten auch bestätigen, dass MITF ein Zielgen des Lef-1/ β -catenin Signalwegs ist. Weiterhin zeigten wir, dass Lef-1 die Expression von WNT5A und TCF4 unabhängig von β -catenin unterdrückt. Umgekehrt fanden wir, dass invasive Zellen Wnt5A und Tcf4 stark hochregulieren. Wir konnten feststellen, dass Tcf-4 für die Expression von Wnt5A zuständig ist und dass Wnt5a durch den nicht-kanonischen Wnt Signalübertragungsvermittler PKC dazu fähig ist, melanozytäre Gene durch das Runterregulieren von Lef-1 zu unterdrücken.

Die hier beschriebenen Experimente unterstützen die Hypothese der Melanomprogression durch den Wechseln zwischen den beiden Zellphänotypen (proliferativ und invasiv). Dies wiederum wird durch den kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg vermittelt. Zukünftige Therapieansätze, welche dieses Modell berücksichtigen, könnten die Wnt-Signalübertragung als hilfreiches Ziel für die Behandlung dieser Krankheit verwenden.