

Evaluation of L1CAM as cancer stem cell marker and therapeutic target for radioimmunotherapy of ovarian cancer

Doctoral Thesis

Author(s):

Terraneo, Nastassja

Publication date:

2019

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000387855>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 26235

**Evaluation of L1CAM as cancer stem cell marker and
therapeutic target for radioimmunotherapy of ovarian cancer**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

NASTASSJA TERRANEO

*MSc in Molecular and Cellular Biology
University of Zurich*

born on 19.01.1990

citizen of Lugano TI, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner

Prof. Dr. Stefanie Krämer, co-examiner

Prof. Dr. Anna Dubrovskaja, co-examiner

Dr. Jürgen Grünberg, co-examiner

2019

Summary

Ovarian cancer (OC) is one of the most lethal gynecologic malignancies. Due to the absence of specific symptoms and screening approaches, this disease is usually diagnosed only at advanced and metastatic stage. The gold-standard treatment for OC patients consists in debulking surgery succeeded by taxane and platinum-based chemotherapy. Most patients show complete clinical remission after first-line therapy but the majority of them ultimately relapse, developing radio- and chemoresistant tumors. In the past decades, numerous research groups focused on the development of targeted cancer therapies, including monoclonal antibodies (mAbs) and specific protein kinase inhibitors (PKIs), with only limited success in the clinic to date. Even though radioimmunotherapy (RIT) is considered a promising approach against residual tumor nodules after first-line surgery, so far only ^{90}Y -labeled muHMFG1 mAb reached clinical phase III with scarce results. Previous data from our group showed encouraging results of anti-L1CAM RIT in preclinical OC xenograft mouse models using different nuclides (Cu-64/Cu-67, Lu-177 and Tb-161), alone or in combination with paclitaxel.

For a new targeted therapeutic approach, we first examined whether the administration of five selected clinically significant PKIs (MK1775, alisertib, MK2206, temsorolimus and saracatinib; clinical phase I-II) with potential radiosensitizing characteristics could improve the efficacy of anti-L1CAM ^{177}Lu -RIT in an OC model. Initial *in vitro* cytotoxicity screening revealed the highest efficacy of MK1775 and alisertib against the two tested OC cell lines (IGROV1, SKOV3ip). Consecutive combination treatment using IGROV1 cells showed the most prominent radiosensitizing effect of MK1775, which decreased 14-fold the IC_{60} -value of ^{177}Lu -DOTA-chCE7 compared to 6-fold decrease observed when the radioimmunoconjugate was applied with alisertib. The most efficient PKI MK1775 was subsequently examined in combination with ^{177}Lu -DOTA-chCE7 against IGROV1 and the comparatively radioresistant cell line SKOV3ip. We demonstrated that MK1775 synergistically sensitized IGROV1 cells towards ^{177}Lu -RIT. In IGROV1 cells we detected a higher amount of induced DNA double-strand breaks (DSBs) measured by phosphorylation of H2A.X ($\gamma\text{H2A.X}$) in response to combination treatment, compared to both monotreatments. Higher levels of DSBs consequently caused a significantly higher number of early-apoptotic IGROV1 cells. Immunohistochemistry analysis of $\gamma\text{H2A.X}$ expression in SKOV3ip xenografts showed an increased amount of DSBs in tumors treated with combination therapy or MK1775. Finally, using a late stage IGROV1 xenograft mouse model, we could demonstrate that anti-L1CAM ^{177}Lu -RIT alone or combined with MK1775 reduced tumor growth *in vivo*. Our results indicated that the application of PKI MK1775 radiosensitized OC cells and that its combination with ^{177}Lu -labeled mAb chCE7 increased RIT efficacy, suggesting this approach as a valid combined therapy against OC.

Summary

It is now evident that the cause of disease recurrence and poor therapy efficacy is the presence of small populations of cancer stem cells (CSCs). These cells are usually resistant against conventional cancer therapies and for this reason, effective targeted therapies for the complete eradication of CSCs are urgently required. A recent study demonstrated that L1CAM represents a CSC-specific therapeutic target in glioma cells. Therefore, we investigated the role of L1CAM in ovarian CSCs. Using fluorescence-activated cell sorting we isolated specific cell populations based on the expression of L1CAM and CD133 from two OC cell lines (IGROV1 and SKOV3ip). In both cell lines double positive (L1CAM+/CD133+) cells displayed significantly enhanced spherogenic and clonogenic properties compared to double negative cells (L1CAM-/CD133-). Moreover, L1CAM+/CD133+ cells retained the highest clonogenic capacity after irradiation, indicating high radioresistance of these cells. Using the genome editing CRISPR-Cas9 technology, we generated *L1CAM* knockout IGROV1 and SKOV3ip cell lines and we could demonstrate that L1CAM is responsible for the radioresistance of double positive cells. We additionally produced a rescue IGROV1 cell line by re-expressing full-length *L1CAM* in knockout cells. Using the knockout and rescue cell lines, we could show that L1CAM is involved in spherogenic and clonogenic growth, radioresistance, proliferation and migration. *In vivo* limiting dilution assay revealed that SKOV3ip and IGROV1 double positive cells possess high tumor-initiating capacity compared to the other cell populations. IGROV1 L1CAM+/CD133+ cells exhibited significantly faster tumor growth compared to L1CAM-/CD133- cells and tumors appeared with shorter median latency. An *in vivo* re-implantation experiment demonstrated long-term self-renewal ability of double positive cells. Furthermore, the expression of some epithelial-to-mesenchymal (EMT)- and CSC-specific genes was upregulated in these cells. EMT is important for the acquisition and regulation of stem cell-like features and we observed that L1CAM expression correlates with intermediate EMT phenotype. The overall results indicated that L1CAM, in combination with CD133, defines a new population of ovarian CSCs. L1CAM is expressed in all CD133+ ovarian CSCs and, until now, it has not been described in normal stem cells. Therefore, we suggest that targeting L1CAM is a novel therapeutic approach for ovarian CSCs.

Because of high-linear energy transfer, RIT using alpha- or Auger emitters seems to be a new promising strategy to target CSCs. We asked if the Auger electron emitter Tb-161 provided a therapeutic opportunity to overcome CSC radioresistance. We compared *in vitro* radiobiological effects induced by ¹⁷⁷Lu- and ¹⁶¹Tb-labeled anti-L1CAM mAb chCE7 in two OC cell lines (IGROV1 and SKOV3ip) and in their double positive CSC population characterized by L1CAM and CD133 expression. The treatment of both cell lines with ¹⁶¹Tb-DOTA-chCE7 significantly reduced cell survival compared to the treatment with ¹⁷⁷Lu-DOTA-chCE7. The IC₅₀-value of IGROV1 cells treated with ¹⁶¹Tb-DOTA-chCE7 was 5.7-fold lower than the IC₅₀-value of cells treated with ¹⁷⁷Lu-DOTA-chCE7, indicating superior toxicity of Tb-161. A clear trend indicated that radiation-induced bystander effect contributed to the increased radiotoxicity of Tb-161. The formation of

reactive oxygen species in SKOV3ip cells was significantly enhanced after treatment with ^{161}Tb -DOTA-chCE7. Flow cytometric analysis revealed that the incubation of cells with ^{161}Tb -DOTA-chCE7 increased the amount of induced DSBs, which correlates with early-apoptosis and late-apoptosis/necrosis. Preliminary *in vitro* experiments with ovarian CSCs confirmed superior Tb-161 toxicity. Based on our results, we proposed that anti-L1CAM RIT with Tb-161 is a good strategy to kill ovarian CSCs.

To conclude, the work presented in this thesis identified a new population of ovarian CSCs and suggested new encouraging therapy approaches to eradicate CSCs, consisting in the combination of RIT with PKIs and the use of the radiolanthanide Tb-161 for RIT. Ideally, targeted CSC therapies will significantly improve OC patients' outcome.

Zusammenfassung

Eierstockkrebs oder Ovarialkarzinom ist eine der aggressivsten gynäkologischen Krebserkrankungen bei Frauen. Aufgrund fehlender spezifischer Symptome und Früherkennungsverfahren wird die Erkrankung meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und Metastasen haben sich im Bauchraum ausgebreitet. Die bevorzugte Behandlungsmethode für Patientinnen mit Eierstockkrebs besteht aus einer operativen maximalen Tumorreduktion, dem sogenannten Debulking, gefolgt von einer platin- und taxanhaltigen Chemotherapie. Die meisten Patientinnen zeigen nach Erstbehandlung eine vollständige klinische Remission, jedoch erleidet ein Grossteil ein Rezidiv mit strahlen- und chemoresistenten Tumoren. In den vergangenen Jahrzehnten lag der Fokus zahlreicher Forschungsgruppen auf der Entwicklung zielgerichteter Krebstherapien mit monoklonaler Antikörper (mAbs) und spezifischen Proteinkinase-Inhibitoren (PKIs). In der klinischen Anwendung zeigten diese Therapieansätze jedoch nur begrenzte Erfolge. Obwohl die Radioimmuntherapie (RIT) ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von tumorösen Restgewebe darstellt, gelangte nur der mit ^{90}Y -markierte monoklonale Antikörper muHMFG1 mit bescheidenen Studienresultaten bis in die klinische Phase III. Unsere Forschungsgruppe konnte ermutigende Resultate mit einer anti-L1CAM RIT im präklinischen Bereich in Xenograft Ovarialkarzinom-Mausmodellen erzielen. Für die anti-L1CAM RIT wurden verschiedenen Radionuklide (Cu-64/Cu-67, Lu-177 und Tb-161) als Einzeltherapie oder in Kombination mit Paclitaxel eingesetzt.

Als neuartigen Ansatz im Bereich der zielgerichteten Krebstherapie hat unsere Gruppe zuerst untersucht, ob die Anwendung von fünf ausgewählten, klinisch relevanten PKIs (MK1775, Alisertib, MK2206, Temozolimumid und Saracatinib; klinische Phasen I-II) mit potenziell radiosensitivierenden Eigenschaften die Wirksamkeit einer anti-L1CAM ^{177}Lu -RIT im Ovarialkarzinom-Mausmodell verbessert. In einem zu Beginn durchgeführten *in vitro* Zytotoxizitäts-Screening zeigten MK1775 und Alisertib die höchste Wirksamkeit gegenüber den untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien IGROV1, und SKOV3ip. In der folgenden Kombinationsbehandlung von IGROV1-Zellen demonstriert MK1775 den höchsten radiosensitivierenden Effekt, der den IC_{60} -Wert von ^{177}Lu -DOTA-chCE7 um das 14-fache herabsetzte, während die Kombination des Radioimmunokonjugats mit Alisertib lediglich zu einer 6-fachen Reduktion des IC_{60} -Werts führte. Die Wirksamkeit des von MK1775 gegenüber IGROV1-Zellen und der vergleichsweise strahlenresistenten Zelllinie SKOV3ip wurde in Kombination mit ^{177}Lu -DOTA-chCE7 weiter untersucht. Wir konnten zeigen, dass MK1775 in Kombination mit ^{177}Lu -DOTA-chCE7 die Strahlenempfindlichkeit der IGROV1-Zellen synergistisch erhöht. Ebenso konnten wir eine Häufung von induzierten Doppelstrangbrüchen

der DNA (DSBs) in IGROV1-Zellen mittels Messung der Phosphorylierung des Histons H2A.X (γ H2A.X) bei der Kombination von MK1775 und ^{177}Lu -DOTA-chCE7 im Vergleich zur Einzelbehandlung feststellen. Die Kumulation von DSB's führte zu einer signifikanten Zunahme von früh-apoptotischen IGROV1-Zellen. Immunhistochemische Analyse der γ H2A.X-Expression in SKOV3ip Xenotransplantaten zeigte ein erhöhtes Vorkommen von DSB's in Tumoren auf, die mittels Kombinationstherapie oder mit MK1775 allein behandelt wurden. Abschliessend konnten wir in einem IGROV1 Spätstadium-Xenograft-Modell zeigen, dass die Anwendung der anti-L1CAM ^{177}Lu -RIT als Einzeltherapie oder in Kombination mit MK1775 das Tumorwachstum *in vivo* reduzierte. Unsere Resultate weisen darauf hin, dass die Anwendung des PKI MK1775 die Strahlenempfindlichkeit der Eierstockkrebs-Zelllinien erhöht und dass in Kombination mit einer ^{177}Lu -DOTA-chCE7 RIT die Wirksamkeit der RIT verbessert wird. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sprechen für eine Weiterentwicklung dieser Kombinationsbehandlung für den Eierstockkrebs.

Heutzutage gilt es als erwiesen, dass die Ursache der Rezidiven und geringe Therapieerfolge im Vorhandensein einer kleinen Populationen von Krebsstammzellen (CSCs) liegt. Diese Zellen sind gewöhnlich gegen konventionelle Krebstherapien resistent. Daher ist die Entwicklung von wirksamen und zielgerichteten Therapien zur vollständigen Bekämpfung von CSCs dringend notwendig. Eine aktuelle Studie zeigte die Bedeutung von L1CAM als CSC-spezifisches Therapieziel in Glioma-Zellen. Aus diesem Grund haben wir die Rolle von L1CAM in ovariellen CSCs genauer studiert. Mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung konnten spezifische Zellpopulation basierend auf der Expression von L1CAM und CD133 aus zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien (IGROV1 und SKOV3ip) isoliert werden. In beiden Zelllinien wiesen die doppelt-positiven Zellen (L1CAM+/CD133+) signifikant erhöhte spherogene und klonogene Eigenschaften im Vergleich zu den doppelt-negativen (L1CAM-/CD133-) Zellen auf. Überdies zeigten die L1CAM+/CD133+ Zellen die höchste klonogene Kapazität auch nach Bestrahlung, was auf eine hohe Strahlenresistenz dieser Zellen schliessen lässt. Durch die Genome Editing-Technologie CRISPR-Cas9 haben wir L1CAM Knockout IGROV1- und SKOV3ip-Zelllinien herstellen und beweisen, dass L1CAM für die Strahlenresistenz der doppel-positiven Zellen verantwortlich ist. Zusätzlich wurde eine Rescue IGROV1-Zelllinie etabliert, indem die Expression von L1CAM in den Knockout-Zellen vollständig wiederhergestellt wurde. Durch die Verwendung dieser Zelllinien konnte die Beteiligung von L1CAM an sphero- und klonogenen Wachstum, Strahlenresistenz, Proliferation und Zellwanderung gezeigt werden. *In vivo* durchgeführte «Limiting Dilution»-Versuche machten deutlich, dass für L1CAM und CD133 doppelt-positive SKOV3ip- und IGROV1- Zellen eine höhere tumorauslösende Kapazität aufweisen als die übrigen Zellpopulationen. Das Tumorwachstum in IGROV1 L1CAM+/CD133+ Zellen ist dabei gegenüber L1CAM-/CD133- Zellen signifikant erhöht und die Tumore zeigen eine kürzere mediane Latenzzeit. Ein *in vivo* durchgeführtes Reimplantations-Experiment

konnte die Fähigkeit zur langfristigen Selbsterneuerung der doppelt-positiven Zellen aufzeigen. Des Weiteren war die Expression einiger an der epithelialen-mesenchymalen Transition beteiligten sowie CSC-spezifischen Gene in diesen Zellen hochreguliert. EMT ist im Erwerb und der Aufrechterhaltung von stammzellähnlichen Eigenschaften von Bedeutung und wir konnten beobachten, dass die Expression von L1CAM mit dem Auftreten des intermediären EMT-Phenotypen korreliert. Wir konnten zeigen, dass L1CAM in Kombination mit CD133 eine neue Population von ovariellen CSCs definiert. L1CAM wird in allen CD133+ CSCs exprimiert, wurde aber bis jetzt nicht in normalen Stammzellen beschrieben. Aus diesem Grund eignet sich L1CAM als CSC Target-Molekül für neuartige Therapieansätze beim Eierstockkrebs ganz besonders.

Aufgrund des hohen linearen Energietransfers rückt die RIT mittels alpha- oder Auger-Elektronen emittierenden Radionuklide als vielversprechendes Behandlungskonzept bei CSCs in den Fokus. Wir haben untersucht, ob der Auger-Elektronen-Emitter Terbium-161 die Möglichkeit bietet, die Strahlenresistenz der CSCs zu überwinden. Die strahlenbiologischen Effekte des ^{177}Lu - und ^{161}Tb -markierten anti-L1CAM mAb chCE7 wurden *in vitro* in zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien (IGROV1 und SKOV3ip) und den entsprechenden durch L1CAM- und CD133-Expression charakterisierten doppelt-positiven CSC-Populationen verglichen. Die Behandlung mit ^{161}Tb -DOTA-chCE7 reduzierte das Zellüberleben signifikant gegenüber der Behandlung mit ^{177}Lu -DOTA-chCE7. Der IC_{50} -Wert der IGROV1-Zellen, welche mit ^{161}Tb -DOTA-chCE7 behandelt wurden, war um das 5.7-fache tiefer als der IC_{50} -Wert der Zellen, welche mit ^{177}Lu -DOTA-chCE7 behandelt wurden, was auf eine höhere Zelltoxizität von ^{161}Tb schließen lässt. Ein klarer Trend deutet darauf hin, dass der durch radioaktive Strahlung induzierte «Bystander-Effekt» eine verstärkende Wirkung auf die Radiotoxizität von ^{161}Tb hat. In SKOV3ip-Zellen konnte eine deutlich erhöhte Bildung von freien Sauerstoffradikalen nach der Behandlung mit ^{161}Tb -DOTA-chCE7 festgestellt werden. Eine durchflusszytometrische Analyse zeigte eine Häufung von DSB's in Zellen, welche mit ^{161}Tb -DOTA-chCE7 inkubiert wurden. Dies korrelierte mit dem Auftritt von früh-apoptotischen-, spät-apoptotischen- und nekrotischen- Zellen. Erste *in vitro* Ergebnisse mit ovariellen CSCs bestätigten eine höhere Toxizität von ^{161}Tb im Vergleich zu ^{177}Lu . Basierend auf unseren Erkenntnissen schlagen wir die Entwicklung einer anti-L1CAM RIT in Verbindung mit ^{161}Tb als Strategie zur Bekämpfung von ovariellen CSCs vor.

In der vorliegenden Dissertation konnte ich eine neue CSC-Population in Ovarialkarzinomen identifizieren, die auf der doppelten-Expression von L1CAM und CD133 beruht. Ich habe vielversprechende Therapieansätze zur Behandlung des Eierstockkrebses bestehend aus der Kombination von RIT mit PKI's entwickelt. Meine Untersuchungen zur Beseitigung von CSCs legen nahe, dass das Radiolanthanid ^{161}Tb geeignet ist, die Radioresistenz der CSCs zu durchbrechen und L1CAM das geeignete Zielmolekül für eine spezifische CSC-Therapie ist. Idealerweise werden zielgerichtete CSC-Therapien die Behandlungsergebnisse von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen signifikant verbessern.