

**BIANCA DIETSCH**

---

Tumorintrinsische Promotoren der  
hepatischen Metastasierung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2024

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2024

© 2024 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum für Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

**und**

der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der medizinischen Fakultät  
Mannheim der Universität Heidelberg  
Betreuer: Prof. Dr. med. Cyrill Géraud

# **Tumordintrinsische Promotoren der hepatischen Metastasierung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
im Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Bianca Dietsch**

Tierärztin aus Erlenbach

Gießen 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer  
Prof. Dr. Cyrill Géraud  
Prof. Dr. Philipp Olias

Tag der Disputation: 15.04.2024

*„Schon die kleinste Katze ist ein Meisterwerk“*

Leonardo da Vinci (1452-1519)

Für Amy & Kongi

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation entstandenen Publikationen

1. Publikation (Erstautorenschaft)

**Hepatic passaging of NRAS-mutant melanoma influences adhesive properties and metastatic pattern**

**Bianca Dietsch**, Céline Weller, Carsten Sticht, Carolina de la Torre, Martin Kramer, Sergij Goerd, Cyrill Géraud, Sebastian A. Wohlfeil

BMC Cancer, 2023

DOI: 10.1186/s12885-023-10912-4

2. Publikation (Co-Autorenschaft)

**Angiogenic and molecular diversity determine hepatic melanoma metastasis and response to anti-angiogenic treatment**

Sebastian A. Wohlfeil, Verena Häfele, **Bianca Dietsch**, Céline Weller, Carsten Sticht, Anna Sophia Jauch, Manuel Winkler, Christian David Schmid, Anna Lena Irgens, Ana Olsavszky, Kai Schledzewski, Philipp-Sebastian Reiners-Koch, Sergij Goerd, Cyrill Géraud

Journal of Translational Medicine, 2022

DOI: 10.1186/s12967-022-03255-4

Weitere Publikationen, die in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden:

3. Publikation (Co-Autorenschaft)

**Lyve-1 deficiency enhances the hepatic immune microenvironment entailing altered susceptibility to melanoma liver metastases**

Anna Sophia Jauch, Sebastian A. Wohlfeil, Céline Weller, **Bianca Dietsch**, Verena Häfele, Ana Stojanovic, Maximilian Kittel, Hendrik Nolte, Adelheid Cerwenka, Michael Neumaier, Kai Schledzewski, Carsten Sticht, Philipp-Sebastian Reiners-Koch, Sergij Goerd, Cyrill Géraud

Cancer Cell International, 2022

DOI: 10.1186/s12935-022-02800-x

4. Publikation (Co-Autorenschaft)

**Hepatic Endothelial Notch Activation Protects against Liver Metastasis by Regulating Endothelial-Tumor Cell Adhesion Independent of Angiocrine Signaling**

Sebastian A. Wohlfeil, Verena Häfele, **Bianca Dietsch**, Kai Schledzewski, Manuel Winkler, Johanna Zierow, Thomas Leibing, Mona Malek Mohammadi, Joerg Heineke, Carsten Sticht, Victor Olsavszky, Philipp-Sebastian Koch, Cyrill Géraud, Sergij Goerd

Cancer Research, 2019

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1752

# Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis .....	9
2	Literatur .....	10
2.1	Das kutane Melanom in der Humanmedizin .....	10
2.1.1	Morphologie .....	10
2.1.2	Inzidenz.....	10
2.1.3	Risikofaktoren .....	11
2.1.4	Klinik .....	11
2.1.5	Therapie.....	13
2.2	Das Schleimhautmelanom in der Humanmedizin .....	15
2.3	Kleintiermedizin.....	15
2.3.1	Inzidenz.....	15
2.3.2	Morphologie Kleintiere.....	16
2.3.3	Therapie Kleintiere .....	16
2.4	Pferdemedizin .....	19
2.4.1	Inzidenz Pferde .....	19
2.4.2	Morphologie Pferde .....	19
2.4.3	Therapie Pferde .....	20
2.5	Die metastatische Kaskade.....	21
2.6	Ziel der Arbeit.....	22
3	Publikationen .....	23
3.1	Erstautorenschaft .....	23
3.1.1	<b>Hepatic passaging of NRAS-mutant melanoma influences adhesive properties and metastatic pattern .....</b>	<b>23</b>
3.2	Co-Autorenschaft .....	24
3.2.1	<b>Angiogenic and molecular diversity determine hepatic melanoma metastasis and response to anti-angiogenic treatment.....</b>	<b>24</b>
3.3	Weitere Co-Autorenschaften .....	26
3.3.1	<b>Lyve-1 deficiency enhances the hepatic immune microenvironment entailing altered susceptibility to melanoma liver metastases .....</b>	<b>26</b>



	<b>3.3.2 Hepatic Endothelial Notch Activation Protects against Liver Metastasis by Regulating Endothelial-Tumor Cell Adhesion Independent of Angiocrine Signaling</b>	
	.....	27
4	Diskussion .....	29
5	Zusammenfassung .....	39
6	Summary .....	41
7	Literaturverzeichnis.....	43
8	Danksagung .....	49
9	Erklärung .....	50

# 1 Abkürzungsverzeichnis

CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
LDH	Laktat-Dehydrogenase
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death 1 – ligand 1

## 2 Literatur

### 2.1 Das kutane Melanom in der Humanmedizin

#### 2.1.1 Morphologie

Ausgehend von den Pigmentzellen (Melanozyten) ist das kutane Melanom ein invasiv wachsender, maligner Tumor. Die meisten Melanome entwickeln sich primär auf der Haut, wobei sie entweder spontan entstehen oder sich aus einem vorbestehenden Nävus (Leberfleck, Muttermal) entwickeln. 95% der Melanome sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung dunkel bis schwarz pigmentiert. Es gibt aber auch rötlich oder weiß-grau pigmentierte, so genannte amelanotische, Melanome. [1] Die Einteilung des malignen Melanoms erfolgt in vier Hauptgruppen:

Superfiziell spreitendes Melanom (50%), noduläres Melanom (25%), Lentigo-maligna-Melanom (15%) und akrolentiginöses Melanom (5%). [2, 3] Das superfiziell spreitende Melanom ist bei hellhäutigen Menschen die häufigste Form des malignen Melanoms. [4] Diese Art des Melanoms zeigt erst eine auf die Epidermis beschränkte radiale Wachstumsphase. Im weiteren Verlauf der Erkrankung wächst es dann vertikal in die Tiefe der Haut ein, wobei dann das Risiko besteht, dass der Tumor metastasiert. [5]

Das noduläre Melanom zeichnet sich durch das Fehlen einer radialen Wachstumsphase aus. Das bedeutet, dass es ausschließlich und stärker vertikal in die Tiefe der Haut wächst. [3]

Das Lentigo-maligna-Melanom kommt hauptsächlich bei älteren Menschen und auf sonnengeschädigter Haut vor. In seiner Pigmentierung ist es heller als die anderen beiden Subtypen des Melanoms und wächst erst in einem späteren Stadium vertikal in die Tiefe. [3]

Das akrolentiginöse Melanom ist die seltenste Form des Melanoms bei hellhäutigen Menschen, allerdings die häufigste Form bei asiatischen und dunkelhäutigen Menschen. Klinisch zeigt es sich oft als großer, dunkelbrauner bis schwarzer Fleck an den Finger- und Fußnägeln. Es kommt zusätzlich auch an der Handinnenfläche oder der Fußunterseite vor. [6]

#### 2.1.2 Inzidenz

Das Robert-Koch-Institut veröffentlichte 2021 die 13. Ausgabe „Krebs in Deutschland für 2017/2018“. Rund 22 890 Menschen erkrankten 2018 am malignen Melanom der Haut, wobei es zwischen Männern und Frauen keinen Unterschied gab. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Frauen bei 95% und für Männer bei 93%. Die meisten Melanome werden in einem frühen Tumorstadium entdeckt. Bei Frauen manifestieren sie sich oft an den unteren Extremitäten, insbesondere an den Beinen und der Hüfte, während sie bei Männern hauptsächlich am Rumpf auftreten. [4]

### 2.1.3 Risikofaktoren

Generell kann man zwischen endogenen und exogenen Risikofaktoren unterscheiden. Zu den endogenen Risikofaktoren gehören eine erhöhte Anzahl an normalen Nävi (Leberflecken), eine genetische Prädisposition und der Hauttyp. Menschen mit heller Haut und hellen bzw. roten Haaren, die schnell einen Sonnenbrand bekommen und nicht schnell braun werden, haben ein erhöhtes Risiko am Melanom zu erkranken. [7, 8]

Die erbliche Prädisposition spielt eine wichtige Rolle. Das FAMMM-Syndrom (familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom) ist eine genetisch bedingte Hauterkrankung, die durch eine Mutation im *CDKN2A*-Gen bedingt ist. Betroffene Patienten zeigen multiple melanozytäre Hautveränderungen (oft mehr als 50) und das maligne Melanom tritt familiär gehäuft auf. [9]

Zu den exogenen Risikofaktoren gehört die vermehrte Exposition mit UV-Strahlen, vor allem in der Kindheit. Kinder, die bis zum 15. Lebensjahr vermehrt Sonnenbrände hatten, haben ein erhöhtes Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken. [10] Auch ein schwaches Immunsystem begünstigt das Risiko am malignen Melanom zu erkranken. [11]

### 2.1.4 Klinik

In den 1980er Jahren wurden von Friedman et.al. zur Hilfestellung bei der klinischen Inspektion des kutanen Melanoms die ABCD-Regel aufgestellt. Mit dieser Regel ist auch das Erkennen von Frühformen des malignen Melanoms möglich. [12] Bei diesem Schema steht das A für Asymmetrie, das B für Begrenzung, das C für Farbe (= Colour) und das D für Durchmesser. 2004 wurde diese Regel von Abbasi et.al. durch den Buchstaben E für Erhabenheit ergänzt. [13] Ausschlaggebend für die finale Diagnose ist letztendlich allerdings die histologische Untersuchung des Primärtumors.

Die Größenzunahme des malignen Melanoms erfolgt zunächst durch ein horizontales Wachstum innerhalb der Epidermis und anschließend durch eine vertikale Wachstumsphase, wobei die Melanomzellen tiefer in die Dermis und das darunterliegende subkutane Gewebe eindringen. Meist ist auch eine Erhebung tastbar. Allgemein besteht bei Melanomen in der vertikalen Wachstumsphase die Möglichkeit der Metastasierung, während Melanome in der horizontalen Wachstumsphase fast nie metastasieren. [14]

Die vertikale Eindringtiefe des Primärtumors wird an Hand der Tumordicke nach Breslow klassifiziert und stellt prognostisch das wichtigste Kriterium dar, denn das Risiko Lymphknotenmetastasen zu entwickeln steht in Verbindung mit der Dicke des primären Melanoms. [15]

Weiterhin sollte histopathologisch neben der Tumordicke auch die Ulzeration und die Mitoserate des Primärtumors sowie eine mögliche Regression des Tumors miteinbezogen werden. [16]

Der schwarze Hautkrebs metastasiert über die Lymph- und Blutbahn schon sehr frühzeitig in andere Organe, wobei die Lymphknoten und die Lunge am häufigsten betroffen sind, gefolgt von der Leber, dem Gehirn und den Knochen. [17]

Man unterscheidet Melanommetastasen klinisch in Satellitenmetastasen, die 2-5 cm um den Primärtumor lokalisiert sind, In-Transit-Metastasen, die 5 cm vom Primärtumor entfernt und zwischen Primärtumor und regionalem Lymphknoten liegen, regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen. [18]

Laut der S3-Leitlinien des malignen Melanoms erfolgt die Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach dem Schema der AJCC 2009. [16, 19]

<b>Stadium</b>	<b>Primärtumor (pT)</b>	<b>Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)</b>	<b>Fernmetastasen (M)</b>
0	In-situ-Tumoren	Keine	Keine
IA	<1,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IB	<1,0 mm mit Ulzeration oder Mitoserate/mm <sup>2</sup> ≥ 1	Keine	Keine
	1,01-2,00 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIA	1,01-2,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	2,01-4,00 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIB	2,01-4,00 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	> 4,00 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIC	> 4,00 mm mit Ulzeration	Keine	Keine

IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 Lymphknoten	Keine
IIIB	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 Lymphknoten	Keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Bis zu drei makroskopische nodale Metastasen	Keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Keine, aber Satelliten- und/oder in-transit-Metastasen	keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu drei makroskopische nodale Metastasen oder Satellit(en) oder in-transit- Metastase(n) ohne regionäre Lymphknotenmetastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	Vier oder mehr makroskopische nodale Metastasen oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten und/oder in-transit-Metastasen mit regionären Lymphknotenmetastasen	Keine
IV			Fernmetastasen

Weiterführende Untersuchungen zur Ausbreitungsdiagnostik erfolgt stadienabhängig. In den Stadien IB bis inkl. IIB sollte eine Ultraschalluntersuchung der Sentinel-Lymphknoten und eine Blutuntersuchung des Tumormarkers S100B erfolgen. In den Stadien IIC bis III sollte zusätzlich zu den genannten Untersuchungen noch eine Blutuntersuchung auf LDH erfolgen. Radiologisch sollte ein Ganzkörper-CT, -MRT oder -Pet/CT inkl. eines Kopf-MRT erfolgen. Ab Stadium IIIB findet eine molekularpathologische Untersuchung des Tumors auf BRAF, NRAS oder c-KIT Mutation statt. Im Stadium IV erfolgen alle oben genannten Untersuchungen und werden erweitert durch einen Abdomenultraschall und eine Skelettszintigrafie. [19]

### 2.1.5 Therapie

Das maligne Melanom sollte möglichst frühzeitig chirurgisch entfernt werden, da dies die wichtigste und effektivste Behandlungsmethode darstellt. Anhand der Tumordicke wird

entschieden mit welchem Sicherheitsabstand der Tumor entfernt wird. [20] Bei einer Tumordicke nach Breslow von unter 2 mm sollte ein Sicherheitsabstand von 1 cm erfolgen. Bei einer Tumordicke über 2,01 mm erfolgt ein Sicherheitsabstand von 2 cm. [19] Meistens erfolgt die Operation in zwei Schritten. Erst wird das Pigmentmal entfernt und anschließend histologisch untersucht. Im zweiten Schritt wird dann eventuell nachexzidiert, um einen Sicherheitsabstand vom Tumor zu gewährleisten.

Je nachdem, in welchem Stadium der Patient sich befindet, kommen anschließend verschiedene Therapien in Betracht. Generell unterscheidet man zwischen zielgerichteter Therapie (BRAF-/MEK-Inhibitoren) und Immuntherapie (anti-PD-1, anti-CTLA-4-Antikörper). Bei einem regionalen Lymphknotenbefall (ab Stadium III) kann zudem eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt werden. Dadurch kann der Tumor besser kontrolliert und das Rückfallrisiko gesenkt werden.

Die früheste Therapieform im fortgeschrittenen Stadium der Melanomkrankung war die Chemotherapie. Verschiedene Kombinationen wurden eingesetzt, jedoch war das klinische Ansprechen gering und das Gesamtüberleben zeigte keine Verbesserung, weshalb die Chemotherapie weitgehend durch andere Behandlungen ersetzt wurde. [21]

Die zielgerichtete Therapie ist in den Stadien IIIA-D und IV zugelassen. Dabei werden Schlüssel-moleküle, die für das Wachstum und das Überleben der Zellen sehr wichtig sind in Signalwegen zielgerichtet inhibiert. In ca. 50% bis 60% der Melanome findet man eine Mutation des *BRAF*-Gens (V600E). BRAF ist eine Serin/Threonin-Kinase und aktiviert u.a. den MAP-Kinase/ERK-Signalweg, der die Zellteilung und -differenzierung beeinflusst. [22]

Seit 2012 stehen therapeutisch als selektive BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und seit 2013 Dabrafenib zur Verfügung. MEK-Inhibitoren, wie Binimetinib, Trametinib und Cobimetinib inaktivieren die MAP-Kinasen MEK1 und MEK2 und greifen dadurch direkt in den Signalweg ein und verhindern, dass nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden. Dadurch kommt es zum Abbruch der Transkription und die Tumorzellen können nicht weiter proliferieren. [23]

Durch eine Kombination eines BRAF-Inhibitors mit einem MEK-Inhibitor kann die Überlebenszeit der Patienten signifikant verlängert werden. Im Stadium III sind Dabrafenib und Trametinib zur Therapie zugelassen. [24] Im Stadium IV können verschiedene Kombinationen eines BRAF-Inhibitors und eines MEK-Inhibitors zum Einsatz kommen, beispielsweise Vemurafenib und Cobimetinib oder Dabrafenib und Trametinib.

BRAF-negative Patienten sollten unbedingt auf eine aktivierende Mutation von NRAS getestet werden, die bei ca. 15% aller Melanome vorkommt. Eine vorhandene BRAF- Mutation schließt eine NRAS-Mutation praktisch aus. [25]

Da aktuell keine selektiven NRAS-Inhibitoren zugelassen sind, können Patienten mit dieser Mutation MEK-Inhibitoren off-label verabreicht werden.

Insbesondere im Stadium IV ist die Prognose auf eine Heilung schlecht und bis vor wenigen Jahren wurde das Gesamtüberleben der Patienten auf 8 Monate (+2 Monate) geschätzt. [16] Zu den neueren Behandlungsmöglichkeiten, die in den Stadien IIB und C, sowie IIIA-D und IV zum Einsatz kommen und die Zeit bis zum Rückfall verlängern können, gehört die Therapie mit Checkpoint-Blockern. Zugelassen sind zurzeit die drei PD-1-Antikörper Nivolumab, Pembrolizumab und Cemiplimab.

Tumorzellen können auf ihrer Oberfläche die Liganden PD-L1 und PD-L2 exprimieren. Sie können damit an den PD-1-Rezeptor von aktivierten T-Zellen binden, was zur Inaktivierung der Immunzellen führt. Die Tumorzellen werden so nicht mehr von den T-Zellen zerstört. Durch Verabreichung der PD-1-Antikörper können Tumorzellen mit ihren PD-Liganden nicht mehr an die T-Zellen binden. Dadurch wird die antitumorale Immunantwort wieder aktiviert. [26] Das Protein CTLA-4 wird ebenfalls an der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert und inhibiert die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten. Ipilimumab, ein humaner Anti-CTLA4-Antikörper löst diese Inhibierung der T-Lymphozyten und führt so ebenfalls zu einer antitumoralen Aktivität. [27]

## 2.2 Das Schleimhautmelanom in der Humanmedizin

Das Schleimhautmelanom kommt bei Menschen selten vor und entsteht hauptsächlich aus dem Schleimhautepithel der Atemwege, des Magen-Darm-Trakts und des Urogenitaltrakts. [28]

Es unterscheidet sich molekulargenetisch vom kutanen Melanom. Beim Schleimhautmelanom finden sich häufiger Mutationen in SF3B1 und KIT, wobei die Mutationsrate generell niedriger ist als im kutanen Melanom. [29]

Therapeutisch lässt es sich nur schwer behandeln. Dadurch, dass die für das kutane Melanom häufig vorkommende BRAF-Mutation nur gering auftritt, sprechen selektive BRAF-Inhibitoren nicht an und auch das Ansprechen auf die Immuntherapie ist schlecht. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt je nach Stadium und Lokalisation zwischen 25 und 33% und ist damit wesentlich schlechter als für das kutane Melanom (80%). [30, 31]

Nur bei ca. 5% der Schleimhaut- und akralen Melanome kommt eine Mutation in der Tyrosinkinase KIT vor. [32] Therapeutisch kann hier ein c-KIT- Inhibitor wie Imatinib nur „off-label“ eingesetzt werden.

## 2.3 Kleintiermedizin

### 2.3.1 Inzidenz

Das maligne Melanom kommt beim Hund häufiger an schwarz pigmentierter Schleimhaut, vor allem an den Lippen und in der Maulhöhle oder an den Zehen, vor. Dunkel gefärbte Tumore



der Haut sind meistens gutartig und werden als Melanozytome bezeichnet. 5 bis 7% aller Tumoren beim Hund sind maligne Tumoren der Maulhöhle. Das maligne Melanom ist mit 30-40% der häufigste unter den malignen Tumoren der Maulhöhle. [33] Das Durchschnittsalter ist 9 bis 11 Jahre. Männliche Tiere sind häufiger betroffen als weibliche. [34]

Das maligne Melanom kommt bei Katzen wesentlich seltener vor. [35] Am Häufigsten werden okuläre maligne Melanome beschrieben, die bei älteren Katzen vorkommen. Es gibt keine Geschlechts- oder Rasseprädisposition. [36]

### 2.3.2 Morphologie Kleintiere

Das maligne Melanom ist ein Tumor, der von den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut oder Schleimhaut ausgeht. [2] Klinisch werden sie als feste, polypen- bis plaqueartige, braune bis schwarze, zur Ulzeration neigende Wucherungen an Kopf, Gliedmaßen und Rumpf beschrieben. [37] In der Regel ist das maligne Melanom dunkel bis schwarz pigmentiert. Es treten aber auch amelanotische Melanome auf, die in ihrem äußeren Erscheinungsbild heller bzw. hautfarben sind. [38] Der Tumor wächst invasiv und streut schon frühzeitig in andere Organe, v.a. in Lymphknoten, Lunge und Bauchhöhlenorgane. Rassedispositionen bestehen für Scottish Terrier, Golden Retriever, Pudel und Dackel. [39]

Laut WHO wird das orale maligne Melanom beim Hund in vier Stadien eingeteilt: [40]

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Durchmesser Primärtumor $\leq 2$ cm, keine Beteiligung der Lymphknoten	Durchmesser Primärtumor 2 - 4 cm, keine Beteiligung der Lymphknoten	Durchmesser Primärtumor $< 4$ cm, mit/ohne Lymphknotenmetastasen	Jede Größe des Primärtumors + Fernmetastasen

Bei der Katze kommt das maligne Melanom selten vor. [41]

Katzen erkranken meistens an einem okulären Melanom. Anders als beim Menschen, bei dem hauptsächlich das Aderhautmelanom vorkommt, ist bei der Katze die Iris betroffen. [42] Iris melanome der Katze metastasieren häufig und früh in die regionalen Lymphknoten, die Leber und Lunge. [42]

### 2.3.3 Therapie Kleintiere

Die komplette chirurgische Resektion des Primärtumors mit einem Abstand von 2 cm zum gesunden Gewebe ist das Mittel der Wahl, auch wenn die chirurgische Entfernung alleine nicht ausreichend ist, da die meisten Hunde an metastatischen Erkrankungen versterben. Die

mediane Überlebenszeit für Hunde, die einen Primärtumor von unter 2 cm ohne Lymphknotenmetastasen entfernt bekommen, beträgt 17 Monate. Hunde, die einen Primärtumor von über 2 cm Größe und/oder Lymphknotenmetastasen aufweisen, überleben im Schnitt 5,5 Monate. [43, 44] Ohne chirurgische Resektion beträgt die mittlere Überlebenszeit 65 Tage. [45]

Auf Grund der Lokalisation des Primärtumors kann es indiziert sein, dass die beteiligten Knochenstrukturen mit entfernt werden müssen. Beispielsweise sollte man bei einem ungleichmäßigen Melanom die betroffene Gliedmaße entfernen. Weiterhin besteht bei einem Primärtumor in der Maulhöhle der Rat zur partiellen bzw. totalen Mandibul- bzw. Maxillektomie. Sollte eine radikale chirurgische Exzision angedacht sein, ist es enorm wichtig, vorher ein vollständiges Tumorstaging durchzuführen. Beim Vorliegen von Fernmetastasen sollte dann eher eine medizinische oder palliative Behandlung in Betracht gezogen werden. [46]

Eine Bestrahlungstherapie kann beim malignen Melanom als adjuvante Therapie postoperativ oder als palliative Therapie erfolgen. Die regionalen Lymphknoten sollten, wenn möglich, immer mitbestrahlt werden, auch wenn sie makroskopisch keine Veränderungen aufweisen. Melanome werden in der Regel mit 3-6 Röntgenfraktionen ein- oder zweimal wöchentlich mit Dosen zwischen 0,5 bis 2,5 Gray bestrahlt (Hypofraktionierung). [47, 48]

Die Nebenwirkungen sind relativ gering und selbstlimitierend. Im Bereich des Bestrahlungsfeldes kann es zu Alopezie, Hypo- oder Hyperpigmentierung der Haut oder einer oralen Mukositis kommen. [49]

Die mediane Überlebenszeit der Hunde, die ausschließlich eine Bestrahlung des Tumors erhielten, war abhängig vom Tumorstadium signifikant länger bei Hunden im Stadium 1 als bei Hunden in einem fortgeschrittenen Stadium. [50]

Bei der Behandlung des caninen malignen Melanoms spielt die Chemotherapie eine untergeordnete Rolle. Die vielversprechendsten Ansprechraten wurden bei Cisplatin und Piroxicam mit 18% und Carboplatin mit 28% erzielt. [51, 52] Cisplatin und Carboplatin sind Zytostatika, welche in Zellen die DNA-Synthese hemmen. Durch die wahllose Verknüpfung von DNA-Strängen kann letztendlich die DNA nicht mehr abgelesen werden und es kommt zu einer Hemmung der Zellteilung. Da Zytostatika auf alle Zellen des caninen und felines Organismus wirken, kann es zu Nebenwirkungen kommen. Generell werden Chemotherapeutika bei Kleintieren im Vergleich zum Menschen in wesentlich niedrigeren Dosen eingesetzt, weshalb es meistens nur zu milden Nebenwirkungen wie Durchfall und Erbrechen kommt. [53] Cisplatin besitzt darüber hinaus eine hohe Nierentoxizität beim Hund und kann zu Lungenödemen bei der Katze führen. [54] Die Nebenwirkungen von Carboplatin sind als mild einzustufen. [55] Piroxicam ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum. Die Bedeutung der selektiven COX2-Hemmer wurden über die Jahre immer bedeutsamer in der veterinärmedizinischen Krebstherapie, da sie einerseits eine hohe immunmodulatorische

Wirkung besitzen und andererseits in Kombination mit Zytostatika oder Immuntherapien das Krebsrisiko reduzieren und die Überlebenszeit verlängern können. [56, 57]

Generell zeigten allerdings mehrere Studien keinen Vorteil in der Kombination Chemotherapie und chirurgische Therapie. [51, 52, 58]

Als Alternative zur Chemotherapie kann bei Hunden zur Behandlung des malignen Melanoms ein xenogener DNA-Impfstoff (Oncept, Boehringer Ingelheim) eingesetzt werden. Der Impfstoff zielt auf eine Tyrosinase ab, die wesentlich für die Melaninsynthese ist. In einer retrospektiven Studie von Turek et al. wurden 131 Hunde, die am malignen Melanom erkrankt waren, keine Fernmetastasen aufwiesen und keine Chemotherapie erhielten, genauer analysiert. Das mediane tumorspezifische Gesamtüberleben betrug bei allen Hunden 17 Monate. Negative Einflüsse auf das Ansprechen der Therapie waren eine Tumorgroße >2 cm, Tumorstadium 2 oder 3, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und wenn der Tumor weit hinten in der Maulhöhle lokalisiert war. [59]

Bislang existieren keine gezielten Therapien gegen das Melanom bei Hunden. Molekulargenetisch unterscheiden sich akrale Melanome von kutanen Melanomen des Menschen. Beim akralen Melanom des Hundes spielen Mutationen im KRAS-Gen eine größere Rolle als Mutationen in BRAF und c-kit-Gen, die beim Menschen eine übergeordnete Rolle spielen. [60] Eine Untersuchung von 21 verschiedenen Medikamenten an neun Melanomzelllinien bei Hunden zeigte demnach, dass die BRAF- und KIT-Inhibitoren (Vemurafenib, Masitinib, Imatinib) keine Wirkung hatten. Stattdessen reagierten die Zellen positiv auf Bortezomib, einen Proteasom-Inhibitor, der am NF- $\kappa$ B-Signalweg beteiligt ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Bortezomib eine vielversprechende zielgerichtete Therapieoption für das Melanom bei Hunden sein könnte. [61]

Immuncheckpointinhibitoren wie anti-PD-L1 werden in der Humanmedizin schon oft zur Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt. Auch in Hunden konnte die Expression von PD-1 auf Lymphozyten und PD-L1 auf Tumorzellen, wie dem malignen Melanom und dem Osteosarkom, nachgewiesen werden. [62, 63] Eine erste Pilotstudie aus Japan mit einem anti-PD-L1 monoklonalen Antikörper konnte zeigen, dass Hunde, die an einem oralen malignen Melanom erkrankt waren, welches bereits in die Lunge metastasierte, durchaus auf diese Therapieform ansprechen können, wenn auch der Großteil der behandelten Hunde nicht ansprach. (1/7 Hunden, 14,3%). [64]

Da das maligne Melanom bei der Katze selten vorkommt, liegen hierzu nur wenige Daten zur Therapie vor. Therapeutisch kommt bei der Katze mit Verdacht auf okularem Melanom nur eine Enukleation in Frage. Um eine frühe Entfernung des Augapfels zu rechtfertigen, kann eine Irisbiopsie durchgeführt werden, die anschließend immunhistochemisch untersucht wird.

[65] Beim Vorkommen von Metastasen ist die Prognose der Katze mit Irismelanom infaust, da erfolgversprechende Therapieoptionen fehlen. [42]

Die Limitation der bisherigen Therapiemöglichkeiten zeigt, dass auch die Veterinärmedizin von neuen Behandlungsformen gegen das maligne Melanom profitieren würde.

## 2.4 Pferdemedizin

### 2.4.1 Inzidenz Pferde

Das maligne Melanom zählt bei Pferden zu den häufigsten Hauttumoren nach dem equinen Sarkoid und dem Plattenepithelkarzinom. Besonders Schimmel und Pferde mit heller Fellfarbe (z.B.: Lipizzaner, Araber) sind häufig von dieser Erkrankung betroffen. Geschlechtsunabhängig erkranken rund 80% der Schimmel über 15 Jahre am Melanom. [66] Diese hohe Inzidenz beim Schimmel ist darauf zurückzuführen, dass diese Pferderasse im Laufe des Lebens „ausschimmeln“. Die Tiere werden schwarz geboren und beginnen mit etwa 2 Jahren zu ergrauen, bis das adulte Tier im Alter von 6-8 Jahren dann letztendlich komplett weiß ist. Die Haut selbst bleibt dabei dunkelgrau. [66, 67] Verantwortlich für die Depigmentierung von Schimmeln und somit auch für das vermehrte Auftreten von Melanomen bei dieser Pferderasse ist sowohl die Überexpression von Syntaxin-17 (STX17) und Nuklearrezeptor 4A3 (NR4A3), als auch eine Mutation im Intron 6 von STX17. Pferde, die die Mutation im Syntaxin-17-Gen homozygot tragen, entwickeln häufiger ein Melanom. [67, 68]

### 2.4.2 Morphologie Pferde

Beim Pferd unterscheidet man Melanozytome und maligne Melanome. Melanozytome beim Schimmel kommt oft an der ventralen Seite des Schwanzes, der Analregion, Perianal oder im Genitalbereich des Pferdes vor. Weiterhin kann es auch an den Lippen, Augenlidern oder im Inneren des Körpers auftreten und ist meist gutartig. [69] Anfänglich zeigt sich das Melanozytom als kleine Knoten, die meist solitär oder multipel an stark pigmentierten, haarlosen Stellen auftreten. [70] Im Verlauf der Erkrankungen können sich gutartige Melanozytome jedoch zu bösartigen Melanomen entwickeln. [71, 72] Dermale Melanome wachsen beim Pferd langsam und metastasieren nur selten. Das anaplastische maligne Melanom hingegen kann bei allen älteren Pferderassen auftreten, wächst schnell und metastasiert häufig. [73] Weiterhin unterscheidet man melanozytäre Nävi, die gutartig sind und die dermale Melanomatose, die durch eine Vermischung von mehreren dermalen Melanomen gekennzeichnet ist und sehr oft metastasiert. Das maligne Melanom metastasiert hauptsächlich in die regionalen Lymphknoten, Leber, Milz oder die Lunge. [74] Oft kommt es

allerdings bei großen Knoten oder Wucherungen z.B. an der Anal- oder Genitalgegend oder am Auge zu klinischen Problemen, weshalb es dann zum Tod des Tieres kommt. [72]

### 2.4.3 Therapie Pferde

Gut umschriebene, solitäre Tumore werden mittels chirurgischer Exzision entfernt. Da die Lokalisation vieler Melanome ungünstig ist, kann eine chirurgische Entfernung post-OP oft zu Wundheilungsstörungen oder Infektionen führen. Durch das infiltrative Wachstum des Tumors in das umliegende Gewebe ist eine Operation oft auch nicht möglich. [75]

Cimetidin ist ein H<sub>2</sub>-Histamin-Antagonist, der durch eine indirekte Immunstimulation die Aktivierung der T-Suppressorzellen verhindert. Es gibt Studien, die beschreiben, dass durch den Einsatz von Cimetidin die Anzahl und Größe der Melanome verringert werden konnte. [76] Andererseits wird dessen Einsatz auch kontrovers diskutiert, denn manche Studien zeigten keinen Erfolg in der Behandlung des Melanoms beim Pferd durch den Einsatz von Cimetidin. [73, 74]

Eine weitere Möglichkeit zur Therapie von Melanomen ist die Chemotherapie mit Cisplatin. Die Verabreichung von Cisplatin führt zu einer Quervernetzung von zwei benachbarten Guaninbasen im DNA-Strang durch Replikation. Die DNA kann danach nicht mehr abgelesen werden, wodurch die Zellteilung gehemmt wird. [77] Durch die intratumorale Behandlung der Pferde mit Cisplatin konnten schon Teilerfolge erzielt werden. Die Tumore gingen in Teilremission bis hin zur vollständigen Remission für mindestens 2 Jahre. [78]

Diese Behandlungsmöglichkeiten zielen auf eine Verringerung der Größe der Tumore ab. Ein Metastasieren wird häufig nicht verhindert. Weiterhin zeigen die bisherigen Therapien keinen zufriedenstellenden Erfolg.

Eine Möglichkeit das metastasierte Melanom beim Pferd zu behandeln ist die Interleukin-Therapie. Interleukine können immunmodulatorisch wirken, indem sie die Produktion von Interferon-gamma fördern und zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aktivieren. Interleukin 12 wurde früher auch beim Menschen im fortgeschrittenen Stadium der Melanomerkkrankung eingesetzt und wird heute, allerdings sehr selten, bei nicht-operablen Satelliten- und In-transit-Metastasen intratumoral verabreicht. [19, 79] In einer Studie von Müller et.al. wurden Pferde mit metastasiertem Melanom mit rekombinanten Interleukin 12 oder 18 behandelt. Dabei konnten antitumorale Effekte erzielt werden und die Behandlung wurde gut toleriert. [80]

Seit Juli 2015 untersucht die Tierärztliche Hochschule Hannover die Wirkung der Melanomvakzine „Oncept“, die in den USA bereits zur Behandlung des malignen Melanoms beim Hund zugelassen ist. Frühere Untersuchungen des Einsatzes der DNA-Vakzine beim Pferd zeigten erste Erfolge in einer Reduzierung der Tumorgöße durch einen Anstieg der humoralen und zellulären Immunität nach der Impfung. [71, 81]

Da die therapeutischen Möglichkeiten besonders im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung limitiert sind, empfiehlt es sich adulte Schimmel regelmäßig auf Melanome zu untersuchen und diese im möglichst frühen Stadium chirurgisch zu entfernen, bevor die Tumore zu groß werden oder mehrere kleine Tumore konfluieren. [82]

Weitere Untersuchungen zur Genetik und Pathophysiologie sind nötig, insbesondere auch im Hinblick auf die Metastasierung des Melanoms beim Pferd, um in Zukunft neue Therapien zu entwickeln, um das equine maligne Melanom adäquat zu therapieren.

## 2.5 Die metastatische Kaskade

Als ersten Schritt in der Metastasenbildung zeigt sich die lokale Invasion der Tumorzellen in das umgebende Gewebe. Danach treten die Krebszellen in den Blutkreislauf ein, in welchem sie überleben müssen. Anschließend siedeln sich die zirkulierenden Krebszellen in einem Organ an, treten aus den Blutgefäßen aus und müssen dann in der fremden Umgebung überleben. Wenn dieser Schritt erfolgreich ist, bilden sich zuerst kleine Mikrometastasen, die sich dann zu makroskopischen Metastasen ausbilden. [83]

Stephen Paget berichtete schon 1889 von seiner „seed and soil“-Hypothese. Diese besagt, dass Tumorzellen präferentiell in bestimmte Organe metastasieren. Wichtig dafür sind günstige Wechselwirkungen zwischen metastatischen Tumorzellen und der Mikroumgebung des Organs. [84] Pagets Theorie fand bis heute zahlreiche Befürworter. Kinsey implantierte beispielsweise bereits 1960 Anteile von verschiedenen Organen aus Mäusen in syngene Mäuse und fand heraus, dass eine Melanomzelllinie, die präferentiell in die Lunge metastasiert, auch in diesem Mausmodell weiterhin in die eingepflanzten Lungen metastasiert. [85] Daraus lässt sich schließen, dass organspezifische Faktoren, in diesem Fall aus der Lunge, maßgeblichen Einfluss auf die Melanomzellen genommen haben und diese tumorintrinsic so veränderten, dass diese weiterhin präferentiell in die Lunge metastasierten. Greene und Harvey zeigten, dass für das Entstehen von Metastasen in einem bestimmten Organ adhäsive Interaktionen zwischen den Tumorzellen und des Endothels des Organs von essentieller Bedeutung sind. [86]

Es gibt allerdings auch andere Theorien, die kontrovers zu Paget's „Seed and Soil“-Hypothese diskutiert werden. Es wird beispielsweise angenommen, dass sich Tumorzellen aus ihrem Primärtumorzellverband ablösen und dann mit dem Blutstrom in das Organ metastasieren, das anatomisch als erstes passiert wird. [87]

Für Ewings Theorie spricht, dass Tumore aus dem Magen-Darm-Trakt präferentiell in die Leber metastasieren, die wiederum das nächste vaskuläre Gefäßbett von Magen-/Darmtumoren darstellt, da dieses direkten Kontakt zur Pfortader aufweist. Es gibt allerdings auch Arbeiten, die zeigen, dass Ewings Theorie nur bedingt zutrifft, denn Brustkrebs beispielsweise metastasiert in 40-50% der Fälle in die Leber. [88] Ein anderes Beispiel ist das

uvemale maligne Melanom, das in 70-80% der Fälle ausschließlich in die Leber metastasiert. Kommt es erstmal zu Lebermetastasen, stellt dies oftmals die Todesursache der Patienten dar, was auch wieder eindrücklich zeigt, dass es an Therapieoptionen für Patienten mit Lebermetastasen mangelt. [89]

## 2.6 Ziel der Arbeit

Genetische Veränderungen beim malignen akralen Melanom und Schleimhautmelanom des Hundes sind noch nicht ausreichend erforscht. Aktivierende Mutationen im BRAF-Gen, wie es beim kutanen Melanom des Menschen vorkommt, wurden bisher nicht gefunden, ähnlich wie beim Schleimhautmelanom des Menschen. [90] Weiterhin scheinen NRAS und c-KIT Mutationen beim Schleimhautmelanom des Hundes keine Rolle zu spielen, im Gegensatz zum humanen Schleimhautmelanom, bei denen diese Gene in etwa 15% der Tumore mutiert sind. [91] Bei beiden Spezies spielt allerdings eine Beteiligung der MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg eine große Rolle. Die Aktivierung dieser Signalwege ist maßgeblich für die Entstehung und das Fortschreiten von Schleimhautmelanomen. Sowohl beim humanen Schleimhautmelanom, als auch bei caninen Melanomzellen ist die Beeinflussung dieser Signalwege mittels AZD6244 (MEK-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) ähnlich. [92]

Um den komplexen Prozess der Metastasierung besser zu verstehen und den Einfluss des Organotropismus auf das maligne Melanom zu analysieren, wurde hier eine murine Melanomzelllinie wiederholt über die Leber passagiert. Im Anschluss wurde die parenterale Zelllinie morphologisch und mittels Genexpressionsanalysen mit der passagierten Zelllinie verglichen, um Mechanismen zu identifizieren, die die Eigenschaften der Melanomzelllinie durch den wiederholten Kontakt mit dem Lebermikromilieu veränderten.

Durch ein besseres Verständnis der Grundlagen der metastatischen Kaskade und der Analyse von Signalwegen und Mechanismen der Metastasierung können Patienten mit hepatischen Metastasen im Stadium IV der Erkrankung in Zukunft zielgerichteter und individueller therapiert werden, um das Gesamtüberleben zu verbessern.

Auch die Tiermedizin kann durch ein besseres Verständnis des Metastasierungsprozesses beim malignen Melanom profitieren, da es hier im Wesentlichen auch an adäquaten Therapiemöglichkeiten mangelt. [93]

Die präklinische Forschung spielt deshalb sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Tiermedizin eine wichtige Rolle, um in Zukunft die Therapiemöglichkeiten für Mensch und Tier zu verbessern.

## 3 Publikationen

### 3.1 Erstautorenschaft

#### 3.1.1 Hepatic passaging of NRAS-mutant melanoma influences adhesive properties and metastatic pattern

**Bianca Dietsch**<sup>1,2</sup>, Céline Weller<sup>1,2</sup>, Carsten Sticht<sup>3</sup>, Carolina de la Torre<sup>3</sup>, Martin Kramer<sup>4</sup>, Sergij Goerdt<sup>1,5</sup>, Cyrill Géraud<sup>1,2,5</sup>, Sebastian A. Wohlfeil<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center and Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, and Center of Excellence in Dermatology, Mannheim, Germany

<sup>2</sup> Section of Clinical and Molecular Dermatology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>3</sup> NGS Core Facility, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>4</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

<sup>5</sup> European Center for Angioscience, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>6</sup> Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

#### **ABSTRACT**

**Background:** Liver metastasis is a poor prognostic factor for treatment of advanced cutaneous melanoma with either immunotherapy or targeted therapies. In this study we focused on NRAS mutated melanoma, a cohort with high unmet clinical need.

**Methods:** WT31 melanoma was repeatedly passaged over the liver after intravenous injections five times generating the subline WT31\_P5IV. The colonization of target organs, morphology, vascularization and the gene expression profiles of metastases were analyzed.

**Results:** After intravenous injection lung metastasis was significantly decreased and a trend towards increased liver metastasis was detected for WT31\_P5IV as compared to parental WT31. Besides, the ratio of lung to liver metastases was significantly smaller. Histology of lung metastases revealed reduced proliferation of WT31\_P5IV in relation to WT31 while both size and necrotic areas were unaltered. Liver metastases of both sublines showed no differences



in vascularization, proliferation or necrosis. To identify tumor-intrinsic factors that altered the metastatic pattern of WT31\_P5IV RNA-sequencing was performed and revealed a differential regulation of pathways involved in cell adhesion. Ex vivo fluorescence imaging confirmed that initial tumor cell retention in the lungs was significantly reduced in WT31\_P5IV in comparison to WT31.

**Conclusion:** This study demonstrates that tumor-intrinsic properties influencing the metastatic pattern of NRAS mutated melanoma are strongly affected by hepatic passaging and the hematogenous route tumor cells take. It has implications for the clinical setting as such effects might also occur during metastatic spread or disease progression in melanoma patients.

## KEYWORDS

Cutaneous melanoma, melanoma metastasis, liver metastasis, tumor heterogeneity

## 3.2 Co-Autorenschaft

### 3.2.1 **Angiogenic and molecular diversity determine hepatic melanoma metastasis and response to anti-angiogenic treatment**

Sebastian A. Wohlfeil <sup>1</sup>, Verena Häfele <sup>1,2</sup>, **Bianca Dietsch** <sup>1,2</sup>, Céline Weller <sup>1,2</sup>, Carsten Sticht <sup>4</sup>, Anna Sophia Jauch <sup>1,2</sup>, Manuel Winkler <sup>1</sup>, Christan David Schmid <sup>1</sup>, Anna Lena Irgens <sup>1,2</sup>, Ana Olsavszky <sup>1,2</sup>, Kai Schledzewski <sup>1</sup>, Philipp-Sebastian Reiners-Koch <sup>1,3</sup>, Sergij Goerdts <sup>1,3</sup>, Cyrill Géraud <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center and Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, and Center of Excellence in Dermatology, Mannheim, Germany

<sup>2</sup>Section of Clinical and Molecular Dermatology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>3</sup>European Center for Angioscience, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>4</sup>NGS Core Facility, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

## **Abstract**

**Background:** Cutaneous melanoma exhibits heterogeneous metastatic patterns and prognosis. In this regard, liver metastasis, which is detected in ~ 10-20% of stage 4 patients, came to the fore of melanoma research, as it recently evolved as decisive indicator of treatment resistance to immune checkpoint inhibition.

**Methods:** Hepatic metastases were induced by intrasplenic injection of five different murine melanoma cell lines. The efficiencies of hepatic colonization, morphologic patterns, gene expression profiles and degree of vascularization were analyzed and Sorafenib was applied as anti-angiogenic treatment.

**Results:** WT31 melanoma showed the highest efficiency of hepatic colonization, while intermediate efficiencies were observed for B16F10 and RET, and low efficiencies for D4M and HCr12. RNAseq-based gene expression profiles of high and intermediate metastatic melanomas in comparison to low metastatic melanomas indicated that this efficiency predominantly associates with gene clusters involved in cell migration and angiogenesis. Indeed, heterogeneous vascularization patterns were found in the five models. Although the degree of vascularization of WT31 and B16F10 metastases differed, both showed a strong response to Sorafenib with a successful abrogation of the vascularization.

**Conclusion:** Our data indicate that molecular heterogeneity of melanomas can be associated with phenotypic and prognostic features of hepatic metastasis paving the way for organ-specific anti-angiogenic therapeutic approaches.

**Keywords:** Anti-angiogenesis; Cutaneous melanoma; Liver metastasis; Melanoma metastasis; Sorafenib; Tumor heterogeneity.

### 3.3 Weitere Co-Autorenschaften

#### 3.3.1 Lyve-1 deficiency enhances the hepatic immune microenvironment entailing altered susceptibility to melanoma liver metastases

Anna Sophia Jauch\* <sup>1</sup>, Sebastian A. Wohlfeil\* <sup>2,3</sup>, Céline Weller <sup>1</sup>, **Bianca Dietsch** <sup>1</sup>, Verena Haefele <sup>1</sup>, Ana Stojanovic <sup>4,5</sup>, Maximilian Kittel <sup>6</sup>, Hendrik Nolte <sup>7</sup>, Adelheid Cerwenka <sup>4,5</sup>, Michael Neumaier <sup>6</sup>, Kai Schledzewski <sup>2</sup>, Carsten Sticht <sup>8</sup>, Philipp-Sebastian Reiners-Koch <sup>2,5</sup>, Sergij Goerdts <sup>2,5</sup>, Cyrill Géraud <sup>9,10,11</sup>

<sup>1</sup>Section of Clinical and Molecular Dermatology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center and Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, and Center of Excellence in Dermatology, Mannheim, Germany

<sup>3</sup>Department of Immunobiochemistry, Mannheim Institute for Innate Immunoscience (MI3), Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>4</sup>Institute for Clinical Chemistry, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>5</sup>NGS Core Facility, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>6</sup>European Center for Angioscience, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>7</sup>Max-Planck-Institute for Biology of Ageing, Cologne, Germany

<sup>8</sup>Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

#### **Abstract**

**Background:** Hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), lymphatic endothelial cells and specialized macrophages. Besides binding to hyaluronan, LYVE-1 can mediate adhesion of leukocytes and cancer cells to endothelial cells. Here, we assessed the impact of LYVE-1 on physiological liver functions and metastasis.

**Methods:** Mice with deficiency of Lyve-1 (Lyve-1-KO) were analyzed using histology, immunofluorescence, microarray analysis, plasma proteomics and flow cytometry. Liver metastasis was studied by intrasplenic/intravenous injection of melanoma (B16F10 luc2, WT31) or colorectal carcinoma (MC38).

**Results:** Hepatic architecture, liver size, endothelial differentiation and angiocrine functions were unaltered in Lyve-1-KO. Hyaluronan plasma levels were significantly increased in Lyve-1-KO. Besides, plasma proteomics revealed increased carbonic anhydrase-2 and decreased FXIIIa. Furthermore, gene expression analysis of LSEC indicated regulation of immunological pathways. Therefore, liver metastasis of highly and weakly immunogenic tumors, i.e. melanoma and colorectal carcinoma (CRC), was analyzed. Hepatic metastasis of B16F10 luc2 and WT31 melanoma cells, but not MC38 CRC cells, was significantly reduced in Lyve-1-KO mice. In vivo retention assays with B16F10 luc2 cells were unaltered between Lyve-1-KO and control mice. However, in tumor-free Lyve-1-KO livers numbers of hepatic CD4+, CD8+ and regulatory T cells were increased. In addition, iron deposition was found in F4/80+ liver macrophages known to exert pro-inflammatory effects.

**Conclusion:** Lyve-1 deficiency controlled hepatic metastasis in a tumor cell-specific manner leading to reduced growth of hepatic metastases of melanoma, but not CRC. Anti-tumorigenic effects are likely due to enhancement of the premetastatic hepatic immune microenvironment influencing early liver metastasis formation.

**Keywords:** Immune microenvironment; Liver; Liver homeostasis; Liver metastasis; Lyve-1.

### 3.3.2 Hepatic Endothelial Notch Activation Protects against Liver Metastasis by Regulating Endothelial-Tumor Cell Adhesion Independent of Angiocrine Signaling

Sebastian A Wohlfeil\* <sup>1</sup>, Verena Haefele\* <sup>1</sup>, **Bianca Dietsch** <sup>1,2</sup>, Kai Schledzewski <sup>1</sup>, Manuel Winkler <sup>1</sup>, Johanna Zierow <sup>1</sup>, Thomas Leibing <sup>1</sup>, Mona Malek Mohammadi <sup>3,4</sup>, Joerg Heineke <sup>3,4</sup>, Carsten Sticht <sup>5</sup>, Victor Olsavszky <sup>1</sup>, Philipp-Sebastian Koch <sup>1</sup>, Cyrill Géraud <sup>6,2,7</sup>, Sergij Goerdts <sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center and Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, and Center of Excellence in Dermatology, Mannheim, Germany

<sup>2</sup> Section of Clinical and Molecular Dermatology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>3</sup> Department of Cardiovascular Research, European Center for Angioscience, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>4</sup> German Center for Cardiovascular Research (DZHK), partner site Mannheim/Heidelberg, Germany

<sup>5</sup> Center for Medical Research, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

<sup>6</sup> European Center for Angioscience, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

## **Abstract**

The interaction of tumor cells with organ-specific endothelial cells (EC) is an important step during metastatic progression. Notch signaling in organ-specific niches has been implicated in mediating opposing effects on organotropic metastasis to the lungs and the liver, respectively. In this study, we scrutinized the role of endothelial Notch activation during liver metastasis. To target hepatic EC (HEC), a novel EC subtype-specific Cre driver mouse was generated. *Clec4g-Cretg/wt* mice were crossed to *Rosa26N1ICD-IRES-GFP* to enhance Notch signaling in HEC (NICDOE-HEC). In NICDOE-HEC mice, hepatic metastasis of malignant melanoma and colorectal carcinoma was significantly reduced. These mice revealed reduced liver growth and impaired metabolic zonation due to suppression of hepatic angiocrine Wnt signaling. Hepatic metastasis, however, was not controlled by angiocrine Wnt signaling, as deficiency of the Wnt cargo receptor Wls in HEC of *WlsHEC-KO* mice did not affect hepatic metastasis. In contrast, the hepatic microvasculature in NICDOE-HEC mice revealed a special form of sinusoidal capillarization, with effacement of endothelial zonation functionally paralleled by reduced tumor cell adhesion *in vivo*. Notably, expression of endothelial adhesion molecule ICAM1 by HEC was significantly reduced. Treatment with an anti-ICAM1 antibody significantly inhibited tumor cell adhesion to HEC in wild-type mice confirming that Notch controls hepatic metastasis via modulation of HEC adhesion molecules. As endothelial Notch activation in the lung has been shown to promote lung metastasis, tumor therapy will require approaches that target Notch in an organ-, cell type-, and context-specific manner.

## **Significance:**

Manipulation of Notch signaling in the endothelium has opposing, organ-specific effects on metastasis to the lung and the liver, demonstrating that this pathway should be targeted in a cell- and context-specific fashion.

## 4 Diskussion

Über das letzte Jahrzehnt konnten Meilensteine in der Therapie des metastasierten malignen Melanoms in der Humanmedizin erreicht werden. Die Therapieoptionen verbesserten sich massiv, dank der zielgerichteten Therapie (BRAF/MAPK-Kinase-Inhibitoren) und der Immuntherapie. [94] Patienten im Stadium IV der Erkrankung erreichen dank der neuen Immuntherapieoptionen mit Ipilimumab (anti-CTLA4-Antikörper) und Nivolumab (anti-PD1-Antikörper) häufiger das 5 Jahres-Gesamtüberleben (52%), im Vergleich zur Monotherapie mit Ipilimumab (26%) und Nivolumab (44%). [95] Trotzdem ist das Gesamtüberleben bei Patienten im Stadium IV der Erkrankung mit Lebermetastasen weiterhin schlecht. [96] Auch in der Tiermedizin gestaltet sich die Behandlung des malignen Melanoms im metastasierten Stadium als schwierig. Almela und Kollegen beschrieben die mediane Überlebenszeit für Hunde im Stadium I mit 14 Monaten und im Stadium III mit drei Monaten. [40] Bisher existiert lediglich eine Pilotstudie aus Japan, in der ein anti-PD1-Antikörper erfolgreich in Hunden eingesetzt wurde. [64] In der Behandlung des malignen Melanoms der Katze existieren vereinzelte Fallberichte. Bei einer 16-jährigen Domestic Shorthair-Katze mit oralem malignem Melanom wurde der Primärtumor mittels CO<sub>2</sub>-Laser entfernt und anschließend erfolgte die Behandlung der Katze mit Bleomycin. Bleomycin ist ein Antibiotikum, welches die Zellteilung und das Zellwachstum hemmt, indem es durch Komplexbildung zu DNA- Doppelstrangbrüchen kommt. Die Katze überlebte 14 Monate nach der Therapie. [97] Für das weitaus häufiger vorkommende okuläre Melanom der Katze existieren keine adjuvanten Therapiemöglichkeiten. Da häufig die Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, sind die Therapiemöglichkeiten limitiert. Abgesehen von der Enukektion kommen auch die Kryotherapie, die Radiotherapie oder die photodynamische Therapie zum Einsatz. [98] Die effektivste Behandlung besteht allerdings darin, den Tumor möglichst in einem frühen Stadium chirurgisch zu entfernen. Die einzige Möglichkeit ist dazu aktuell noch die komplette Entfernung des Augapfels. [99]

Auch in der Pferdemedizin sind die Behandlungsmöglichkeiten des equinen malignen Melanoms limitiert. Die Therapie zielt auf die Behandlung der kutanen Tumore ab und nicht auf die Behandlung von Metastasen, da Pferde mit Melanomen kaum klinische Anzeichen einer Metastasierung zeigen. [69] So wird beispielsweise oft Cisplatin in den Tumor injiziert, was nach Theon et al. das Wachstum des Tumors in 81% der Fälle lokal eindämmte. [77] Eine Arbeit von Lembcke et al. zeigte 2012, dass 90% der equinen Sequenz der Tyrosinase homolog zur humanen Sequenz ist, sodass eine Kreuzreaktivität zu erwarten und der Einsatz einer humanen Tyr-DNA- Vakzine erfolgsversprechend ist. [81]

Dieses Beispiel zeigt, dass die komparative Medizin, also die vergleichende Medizin von Menschen und Tieren, immens wichtig für die Verbesserung der Behandlungsoptionen für beide Spezies ist. In den USA werden im „Comparative Oncology Trials Consortium“ (COCT)

hauptsächlich Hunde und Katzen mit natürlich vorkommenden Tumoren studiert, um die Entwicklung neuer Medikamente für die Humanmedizin zu entwickeln und voranzutreiben. Dies bringt den großen Vorteil, dass Haustiere ebenso wie der Mensch eine große genetische Variabilität aufweisen und somit besser für klinische Studien geeignet sein können als homogene, keimfreie Mauspopulationen. [100] Aus Forschungsergebnissen der COCT entstand auch die bereits mehrfach erwähnte therapeutische xenogene Krebsvakzine, die auf die humane Tyrosinase abzielt. [101]

Nichtsdestotrotz ist die Forschung am Mausmodell weiterhin von hoher Relevanz, denn die Grundlagen der bereits erwähnten Immuncheckpoint-Therapie (anti-CTLA-4 und anti-PD-1) stammen initial aus Untersuchungen aus dem Mausmodell. Die Translation zwischen den Spezies ist also weiterhin hochrelevant und hilfreich zur Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung von Krebsarten. [102]

In der biomedizinischen Grundlagenforschung ist es deshalb weiterhin sehr wichtig die Mechanismen der Metastasierung von Krebsarten genauer zu untersuchen, um die Therapiemöglichkeiten für Mensch und Tier zu verbessern. In dieser Arbeit fokussierten wir uns auf die Mechanismen der Metastasierung des malignen Melanoms in die Leber.

In unserer Arbeitsgruppe verglichen wir in der zweiten Publikation (Wohlfeil et al.), die hier diskutiert wird, fünf verschiedene Melanomzelllinien mit unterschiedlichen Treibermutationen auf ihre Fähigkeit, in Mäusen Lebermetastasen auszubilden. Diese Fragestellung war für die Arbeitsgruppe von besonderem Interesse, da durch die heterogenen Metastasierungsmuster bisher nicht ausreichend verstanden ist, weshalb manche Patienten Metastasen bekommen und andere nicht. Mittels intralienaler Injektion wurden die fünf Melanomzelllinien jeweils in Mäuse appliziert. Anschließend konnte an Hand des Potentials der Zelllinie Lebermetastasen auszubilden eine Einteilung in „stark metastasierend“, „intermediär metastasierend“ und „schwach metastasierend“ vorgenommen werden. WT31 bildete bereits nach Injektion von geringen Zellkonzentrationen (10.000 Zellen) Lebermetastasen aus und wurde in die „stark metastasierende“ Gruppe eingeteilt. B16F10 und RET wurden kategorisch in „intermediär metastasierend“ eingeteilt und HcMel12 und D4M zeigten nur ein schwaches Potential in die Leber zu metastasieren. Weiterhin waren bei den beiden letzten genannten Zelllinien höhere Zellkonzentrationen nötig, die injiziert werden mussten, um Makrometastasen in der Leber auszubilden (150.000 – 300.000 Zellen). WT31 war in der Lage auch nach intravenöser Injektion, also selbst nach einem „first-pass-Effekt“ über die Lunge Lebermetastasen auszubilden.

Mittels RNA-Sequenzierung verglichen wir die stark (WT31) und intermediär (B16F10, RET) metastasierenden Melanomzelllinien mit jeweils den gering (HcMel12, D4M) metastasierenden Melanomzelllinien. In diesem Vergleich konnten knapp 2.000 Gene identifiziert werden, die in B16F10, WT31 und RET gleichartig reguliert sind. In einer

weiterführenden Analyse dieser Gene zeigten sich Signalwege stark reguliert, die hauptsächlich in der Migration und Angiogenese eine Rolle spielen.

Hier fokussierten wir uns im weiteren Verlauf genauer auf die Angiogenese. Die Angiogenese, also das Ausbilden neuer Blutgefäße, spielt für das Tumorstadium und -überleben eine große Rolle. Kleine Tumore (unter 2 mm Durchmesser) brauchen noch keine Blutgefäße, um zu überleben. Sobald der Tumor jedoch wächst und sich ausbreiten möchte, ist er auf die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Blutgefäße angewiesen. Das Tumorgewebe ist dann in der Lage durch die intrinsische Bildung und Überexpression von VEGF (vascular endothelial growth factor) neue Blutgefäße auszubilden, damit der Tumor anschließend adäquat versorgt werden kann. [103]

Die weitere Fokussierung auf die Angiogenese war auch dahingehend interessant, da die Lebermetastasen von allen fünf Melanomzelllinien histologisch ein Wachstumsmuster vom „pushing-type“ zeigten. Dieses Wachstumsmuster ist dadurch gekennzeichnet, dass die Metastase in der Leber proliferiert und das Leberparenchym dabei verdrängt, ohne dass Tumorzellen in das Leberparenchym einwandern. Im Menschen zeigt sich in Lebermetastasen ausgehend vom kutanen Melanom am häufigsten der desmoplastische Wachstumstyp. Kennzeichnend für diesen Wachstumstyp ist ein desmoplastischer fibröser Ring um die Metastase. Als dritten Wachstumstyp- und zweithäufigster Typ in Lebermetastasen beim Menschen ist der „replacement-type“ zu nennen. Hierbei wandern die Tumorzellen in das Leberparenchym ein und verdrängen die lebereigenen Zellen. [104] Für Lebermetastasen mit „pushing-type“ Wachstumsmuster ausgehend vom Kolonkarzinom stellten Paku und Kollegen eine Theorie auf, wie diese Metastasen Blutgefäße neu ausbilden könnten. Schlüsselrolle spielen hierbei zum einen SMA (smooth muscle actin) -positive Zellen, die sich am Rand der Metastase ansammeln, und zum anderen Sinusoide, die zusammenfließen und sich vergrößern, da die Tumorzellen das lebereigene Gewebe verdrängen. Die Metastase „verschlingt“ anschließend die SMA-positiven Zellen und Sinusoide, die sich daraufhin zu tumoreigenen Blutgefäßen entwickeln. [105]

Immunhistochemische Analysen mit Marker für das kontinuierliche Endothel (CD31, Endomucin) und LSEC-spezifische Marker (CD32b, Lyve1) zeigen in den Lebermetastasen vorherrschend Endothelzellen vom vaskulären Typ, was im Einklang mit der Studie von Paku et.al. steht. Durch das Metastasenwachstum inkorporiert der Tumor die Sinusoide und verändert sie morphologisch zu versorgenden Gefäßen vom endothelialen Typ. Die vaskuläre Dichte in den Lebermetastasen korrelierte in unserer Arbeit auch mit der Effizienz Lebermetastasen auszubilden, sowie mit der Metastasengröße. So zeigte WT31 z.B. die höchste vaskuläre Dichte und gleichzeitig die größten Metastasen in der Leber, während D4M die geringste metastatische Gefäßdichte aufweist und die kleinsten Lebermetastasen. Lebermetastasen von B16F10-Melanomzellen beispielsweise zeigten eine eher geringe



vaskuläre Dichte und ein mittleres Metastasenwachstum in der Leber. Da die Angiogenese in der Metastasierung generell eine wichtige Rolle spielt [106], führten wir einen translationalen Versuch mit dem Angiogenesehemmer Sorafenib durch. Sorafenib ist ein Proteinkinaseinhibitor, der das Wachstum der Metastasen verhindert, indem er die Neuausbildung von Blutgefäßen, die die Metastase mit Nährstoffen versorgen, hemmt. [107] Mäuse wurden präoperativ entweder mit Sorafenib oder einer Isotypkontrolle behandelt. Anschließend erfolgte die Injektion von WT31 oder B16F10-Melanomzellen in die Milz der Mäuse. Zum Endzeitpunkt wurden die Tiere getötet und die Lebern zur weiteren Analyse entnommen. Insgesamt war die Therapie mit Sorafenib erfolgreich, denn in beiden Kohorten zeigte sich zuverlässig eine pseudozystische Degeneration der Lebermetastasen. Insgesamt sprachen die Mäuse, die WT31 Melanomzellen erhielten, besser auf die Therapie an, was wahrscheinlich an der höheren vaskulären Dichte in den Metastasen zurückzuführen ist.

In der Vergangenheit wurden bereits klinische Studien mit Sorafenib als Monotherapie an Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Melanomerkrankung durchgeführt. Leider zeigte die Behandlung in dieser Studie wenig bis keine Erfolge bei den Patienten. [108]

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Mäuse mit Lebermetastasen durchaus erfolgreich auf eine Behandlung mit Sorafenib ansprachen.

Takeda und Kollegen zeigten 2021, dass Sorafenib *in vitro* und *in vivo* erfolgreich die Metastasierung des malignen Melanoms in Mäusen verhinderte. Hier zielte der Effekt auf die Behandlung von Melanomen mit c-Kit-Mutation ab. [109]

Auch in der Tiermedizin wurde Sorafenib im Rahmen klinischer Studien als Behandlungsalternative angewendet. Beim hepatozellulären Karzinom des Hundes, das chirurgisch nicht mehr entfernt werden konnte, überlebten in einer Studie von Marconato und Kollegen die Hunde, die mit Sorafenib behandelt wurden, im Schnitt 363 Tage im Vergleich zu der Kohorte, die mit Thalidomide, Piroxicam und Cyclophosphamide behandelt wurden (32 Tage). Außerdem war es gut verträglich. [110] Bisher wurde der Einsatz von Sorafenib, auch in Kombination mit ICI bei Lebermetastasen im Menschen oder Tier noch nicht untersucht.

Beides könnten allerdings geeignete Mittel sein, um erfolgreich das Fortschreiten einer hepatischen metastasierten Tumorerkrankung aufzuhalten.

Weiterführend untersuchten wir in der ersten Publikation, die hier diskutiert wird, den Einfluss des Lebermikromilieus auf das maligne Melanom. Die murine Melanomzelllinie WT31 wurde mittels Injektion in die Schwanzvene wiederholt in C57BL6/J-Mäuse injiziert. WT31 zeigt mittels Injektion in die Vene ein breites Metastasierungsmuster, damit wird die hämatogene Verteilung der Tumorzellen im Patienten gut repräsentiert. Die Mäuse bildeten nach 21 Tagen makroskopische Lebermetastasen aus. Die Tumorzellen wurden aus den Lebermetastasen isoliert und in Zellkultur expandiert. Daraufhin wurden die passagierten Zellen erneut in C57BL6/J-Mäuse injiziert. Dieser Prozess wurde fünf Mal wiederholt. Durch den wiederholten

Kontakt der Melanomzellen mit dem Mausorganismus und dem Parenchym und Stroma der Leber veränderte die Zelllinie ihre molekularbiologischen Eigenschaften, die daraufhin näher analysiert und charakterisiert wurden.

In dieser Arbeit konnte durch hepatische Passagierung die Melanomzelllinie WT31P5IV generiert werden, die signifikant weniger in die Lunge metastasiert als WT31 und einen Trend zu mehr Lebermetastasen zeigt. Weiterhin ist das Verhältnis von Lungen- zu Lebermetastasen in der passagierten Melanomzelllinie WT31P5IV kleiner als in der parenteralen Zelllinie.

Dass der Mechanismus der organspezifischen Passagierung prinzipiell funktioniert, konnte bereits 2002 von Nakamura und Kollegen gezeigt werden. Die Melanomzelllinie B16F0 wurde hier 10 Mal über die Lunge passagiert. Daraus entwickelte sich die Melanomzelllinie B16F10, die signifikant besser in die Lunge metastasiert als die parenterale Zelllinie B16F0. [111]

Auch in neueren Arbeiten konnte eine tumorintrinsic Veränderung einer Zelllinie durch wiederkehrenden Kontakt zu einem Organ induziert werden. Die Fibrosarkomzelllinie QRsP-11 wurde 12 Mal über die Leber passagiert und in nachfolgenden DNA-Chip-Analysen zeigte sich eine signifikante Überexpression von Amigo2 in der passagierten Zelllinie. Dessen Einfluss auf die Metastasierung der parenteralen und der passagierten Zelllinie in die Leber konnte anschließend mittels Knockdown und forcierter Überexpression validiert werden. [112]

In diesen Arbeiten wurden die Zellen jeweils über das Organ passagiert, das die Zellen nach der Injektion als erstes erreichten (Milzinjektion → Portalvene → Leber). In unserer Arbeit passierten die Melanomzellen nach der intravenösen Injektion als erstes die Lunge und gelangten anschließend mit dem Blutstrom in weitere Gefäßbette, wie die Leber. Wie bereits erwähnt, spiegelt diese generalisierte Verteilung der Melanomzellen im Organismus das breite Muster der hämatogenen Metastasierung im Individuum wieder.

Um intrinsische Mechanismen zu identifizieren, weshalb WT31P5IV weniger stark in die Lunge metastasiert, dafür tendenziell eher Lebermetastasen ausbildet und sich das Verhältnis Leber- zu Lungenmetastasen umkehrte, folgten zu Beginn histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

Erste immunhistochemische Analysen der Lungenmetastasen zeigten eine signifikante Reduzierung von Ki67 in Metastasen von WT31P5IV. Ki67 ist ein Protein, welches Zellen während des Zellzyklus in der G1, S, G2 und M-Phase exprimieren. Es markiert somit sich teilende Zellen und kann als Proliferationsmarker genutzt werden. [113] Auch in der Tiermedizin wird Ki67 als Proliferationsmarker eingesetzt. Beim Mastzelltumor beispielsweise wird es routinemäßig zur Differenzierung der Mastzelltumore benutzt und kann eine Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit der Tiere bieten. Hunde mit einem Mastzelltumor und einem hohen Ki67-Score zeigen eine verkürzte Überlebenszeit als Hunde mit einem niedrigen Ki67-Score. [114]

Die Tatsache, dass in Lungenmetastasen eine geringere Expression von Ki67 vorhanden ist, lässt darauf schließen, dass die passagierten Zellen weniger stark im Lungengewebe proliferieren und die Zelllinie insgesamt weniger aggressiv zu sein scheint, denn der Gehalt an Ki67-positiven Zellen im malignen Melanom korreliert auch mit der Aggressivität des Tumors. [115]

Weiterhin wurden die Lungenmetastasen auf den Gehalt an cleaved-Caspase 3 positiven Zellen analysiert. Cleaved-Caspase 3 ist eine Protease, die während der Apoptose eine wichtige Rolle spielt und die Spaltung von vielen wichtigen Proteinen fördert. [116] In einer Arbeit von Zhou und Kollegen konnte gezeigt werden, dass cleaved-Caspase 3 auch nicht-apoptotische Eigenschaften besitzen kann. Kolonkarzinomzellen, die eine verminderte Expression von Caspase 3 aufwiesen, waren weniger invasiv und metastasierten weniger stark in die Lunge als die Kontrollzelllinie. [117] Bei Patientinnen mit Brustkrebs war eine Expression von Caspase 3 mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben assoziiert. [118]

Unsere Analysen zeigten in den Lungenmetastasen beider Zelllinien keinen Unterschied in cleaved- Caspase 3 positiven Zellen.

Um den Phänotyp der Lebermetastasen von WT31 und WT31P5IV genauer zu untersuchen und den Einfluss der hepatischen Passagierung auf WT31P5IV zu analysieren, untersuchten wir auch in den Lebermetastasen das Proliferations- und Apoptosemuster und zusätzlich das vaskuläre Gefäßmuster.

Es konnte in der Analyse von den Endothelzellmarkern Endomucin und CD31 und LSEC (liver-sinusoidal-endothelial-cells) - spezifischen Markern wie Lyve1 und CD32b kein Unterschied in der vaskulären Dichte und im Expressionsmuster der kontinuierlichen Endothelzellmarker und LSEC-spezifischen Marker in den Lebermetastasen beider Zelllinien gezeigt werden. Beide Zelllinien formen Lebermetastasen mit einem vorherrschend endothelialen Gefäßaufbau. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der zweiten Publikation (Wohlfeil et.al.), die hier diskutiert wurde und zeigt, dass sich der vaskuläre Phänotyp der Lebermetastasen von WT31 nicht durch die hepatische Passagierung verändert hat.

Da zusätzlich auch die Analyse von Ki67 und cleaved-Caspase 3 positiven Zellen keinen Unterschied in den Lebermetastasen von WT31 und WT31P5IV ergab, ist daher anzunehmen, dass das serielle Passagieren von WT31 über die Leber die Zellen intrinsisch so veränderte, dass eher die Migrations- und Invasionsfähigkeit verändert wurde als das Wachstums- und Apoptoseverhalten und die Angiogenese.

Da wir *in vivo* sehen konnten, dass die passagierten Melanomzellen WT31P5IV weniger stark in die Lunge metastasieren und die Lunge das erste vaskuläre Bett ist, welches die Zellen nach intravenöser Injektion passieren, könnte demnach die Adhäsion und Retention der Zellen an das Lungenendothel verändert sein. Dadurch können mehr Melanomzellen über den

Blutstrom in das zweite vaskuläre Bett gelangen, welches in unserem Modell u.a. die Leber ist. Generell spielen Adhäsionsproteine an der Oberfläche von Krebszellen eine große Rolle, denn die Expression von Zelladhäsionsmolekülen können sich auf Krebszellen verändern und so zu einem veränderten Adhäsionsverhalten während der Metastasierung führen. [119]

Wir analysierten daher die Daten aus RNA-Sequenzierung von WT31 und WT31P5IV und konnten eine starke Veränderung von Genen feststellen, die an der Zelladhäsion und der Regulierung der Adhäsion beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten diverse Cadherine mittels RNA-Sequenzierung analysiert werden, die in der passagierten Zelllinie WT31P5IV herunterreguliert waren. Cadherine sind Transmembranproteine, die u.a. wichtig für die Zell-Zelladhäsion sind und eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen. Viele Cadherine wurden in der Medizin gut charakterisiert und ihre Rolle bei diversen Krebserkrankungen wie Bauchspeicheldrüsenkrebs, Melanom oder Brustkrebs analysiert. [120-122] Cadherin 17, welches von Casal und Kollegen als ein wichtiges Molekül identifiziert wurde, das an alpha2beta1-Integrin bindet und damit die Zelladhäsion, Invasion und Proliferation von Krebszellen in Lungen- und Lebermetastasen fördern kann, ist in der vorliegenden Arbeit herunterreguliert. [123] Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass eine verstärkte Cadherin 11-Expression Knochenmetastasen ausgehend vom Prostatakarzinom fördert. [124] Das ist im Einklang mit unseren Daten, die eine starke Herunterregulierung von Cadherin 17 und 11 zeigen. Somit könnte diese Herunterregulierung einen Einfluss auf die Lungenmetastasierung vom malignen Melanom haben, indem die Melanomzellen weniger stark an das Lungenendothel adhären können.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass Protocadherine, besonders Protocadherine aus dem beta-Cluster in der passagierten Zelllinie WT31P5IV, hochreguliert sind. Protocadherine gehören zur Cadherin-Superfamilie und zählen damit zu den Zelladhäsionsproteinen. Sie sind hauptsächlich während der Entwicklung im Nervensystem exprimiert. [125] Vor allem beta- und gamma-Protocadherine kommen aber auch außerhalb des Nervensystems und bei Adulten vor. Über ihre Rolle ist bisher nur wenig bekannt. Unter anderem konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass geclusterte Protocadherine tumorsuppressiv wirken. Dalosso und Kollegen konnten zeigen, dass gamma-Protocadherine *in vitro* den Wnt/beta-Catenin-Signalweg hemmen und das Wachstum von Tumorzellen vermindern. [126] Die Überexpression von PCDHB15 (Protocadherin beta 15) im malignen Melanom war *in vitro* und *in vivo* mit einer verminderten Zelladhäsion und -invasion und damit einer verringerten Fähigkeit Lungenmetastasen auszubilden verbunden. [127] In unserer Genexpressionsanalyse sind 9 von 22 beta-Protocadherine in der passagierten Zelllinie WT31P5IV hochreguliert. Dies kann ein starker Hinweis auf die tumorsuppressiven Eigenschaften der geclusterten Protocadherine im Sinne einer verminderten

Adhäsionsfähigkeit der Zellen sein, weshalb man sich in Zukunft stärker auf die Analyse und Charakterisierung dieser Gene und der Interaktion mit Tumorzellen fokussieren könnte.

Dass Genexpressionsanalysen von Krebsarten für die Grundlagenforschung sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin von besonderer Bedeutung sind, konnte Robert Klopffleisch 2010 in einer Publikation zeigen. Er verglich das canine Mammakarzinom molekulargenetisch mit einer humanen Brustkrebszelllinie. Er fand heraus, dass ein Drittel der differentiell exprimierten Gene des caninen Mammakarzinoms auch relevant in humanen Brustkrebs sind. Er identifizierte Adhäsionsmoleküle, wie HEPACAM2, Elastin Microfibrill Interfacer 1 (EMILIN1) und Protocadherin-gamma-C3 (PCDHGC3), die in beiden Krebsarten herunterreguliert waren. Auf der anderen Seite waren ICAM2 und ITGA4 in beiden Krebsarten hochreguliert. [128] Vergleichend mit unserer Arbeit ist auch Emilin1 stark herunterreguliert und ICAM2 und ITGA4 stark hochreguliert in der passagierten Zelllinien WT31P5IV.

Um die Hypothese zu stützen, dass maßgeblich die Adhäsionsfähigkeit der passagierten Zelllinie an das Lungenendothel abgenommen hat, führten wir *in vivo* einen Retentionsversuch von WT31 und WT31P5IV durch. Beide Zelllinien wurden vor der intravenösen Injektion mit einem fluoreszierenden Farbstoff „DIL“ (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat) versehen. Nach der intravenösen Injektion der DIL-markierten Zellen wurden die Mäuse 90 Minuten später analysiert. Mittels der Fluoreszenzfähigkeit der Zellen konnte durch bildgebende Verfahren das Signal der Zellen in der Lunge und Leber sichtbar gemacht werden. Tatsächlich zeigte sich in Lungen von Mäusen, die die passagierte Zelllinie WT31P5IV-DIL injiziert bekommen hatten, ein signifikant schwächeres Signal verglichen mit Lungen von Mäusen, die WT31-DIL injiziert bekommen hatten. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Analysen aus den RNA-Sequenzierungsdaten und zeigt, dass durch die Passagierung von WT31 in der Tat die Adhäsions- und Retentionsfähigkeit der passagierten Zellen an das Lungenendothel verändert wurde.

Die Analysen der Lebern der Mäuse aus dem oben genannten Versuch zeigte keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität von WT31-DIL und WT31P5IV-DIL.

Gründe hierfür könnten sein, dass 90 Minuten nach der intravenösen Injektion der Zellen nicht genug Zellen in der Leber angekommen sind und somit kein Unterschied detektierbar war. Es wäre daher einerseits möglich, die Zellen in die Milz zu injizieren. Dadurch könnten die Zellen über die Portalvene auf kürzesten Weg in die Leber gelangen und hätten keinen „first-pass“-Effekt über die Lunge. Andererseits könnte man höhere Zellkonzentrationen intravenös injizieren, damit sich mehr Zellen im Blutkreislauf befinden und sich nach 90 Minuten dementsprechend mehr Zellen in der Leber ansiedeln können, damit ein adäquates Fluoreszenzsignal detektierbar wäre.

Um den Phänotyp der passagierten Zelllinie WT31P5IV weiter zu charakterisieren, fertigten wir eine „Overall Representation Anaysis“ an, die Veränderungen von metabolischen

Stoffwechselprozessen wie oxidative Phosphorylierung und Glykolyse zeigt. Beide Prozesse spielen im Stoffwechsel von Krebszellen eine wichtige Rolle. Normale Zellen generieren ihren Energiebedarf in Anwesenheit von Sauerstoff über oxidative Phosphorylierung, die Glykolyse ist herunterreguliert. Krebszellen allerdings generieren ihr benötigtes ATP trotz Anwesenheit von Sauerstoff maßgeblich über die Glykolyse. [129] Dieses Phänomen wurde in den dreißiger Jahren bereits von Otto Warburg als „aerobe Glykolyse“ oder „Warburg-Effekt“ beschrieben. [130] Wir konnten in dieser Arbeit *in vitro* mittels Seahorse Analyzer, der die basale ATP-Produktion ausgehend von der mitochondrialen Atmung und der Glykolyse messen und berechnen kann, keinen Unterschied im Metabolismus zwischen WT31 und WT31P5IV feststellen.

Gründe hierfür könnten sein, dass die Zellkulturbedingungen einen Einfluss auf die metabolischen Prozesse der Zellen haben können. So kann der Gehalt an Glukose im Medium z.B. einen Einfluss darauf haben, ob die Zellen ihre Energie vermehrt über oxidative Phosphorylierung oder Glykolyse produzieren. [131] Auf der anderen Seite werden *in vitro* Analysen immer streng nach Protokoll durchgeführt und die Zellen gleichartig behandelt, sodass Schwankungen im Metabolismus durch Zellkultureinflüsse eher unwahrscheinlich sind. Man könnte weiterführende metabolische Stresstests wie den „Glycolysis Stress-Test“ oder den „Mito Stress-Test“ durchführen. Der „Mito Stress-Test“ beispielsweise misst durch die zeitversetzte Zugabe von Oligomycin (ATP-Synthasehemmer, Komplex IV), FCCP (Atmungskettenentkoppler) und Rotenone (mitochondriales Toxin, Komplex I) / Antimycin A (Hemmer der Atmungskette, Komplex III), abgesehen von der basalen Atmung unter anderem auch die ATP-gebundene und die maximale Atmung sowie die nicht-mitochondriale Atmung. [132] Dadurch könnten sich funktionelle Unterschiede deutlicher herausarbeiten lassen. [133] Weiterhin waren molekulargenetisch Gene verändert, die an den Signalwegen „MYC-Targets“, „Mtorc1-Signaling“, „Mitotic spindle“, „DNA-Repair“ und „PI3K-AKT-mTor-Signaling“ beteiligt sind.

Genauer befassten wir uns mit dem PI3K-AKT-mTor-Signalweg, da in unseren Genexpressionsdaten in der passagierten Zelllinien WT31P5IV Insulin like growth factor 1-Bindungsprotein 3 (*Igfbp3*) signifikant herunterreguliert war. Dar und Kollegen beschrieben, dass eine Überexpression von *Igfbp3* in Melanomzellen *in vitro* eine Suppression von phosphoryliertem AKT (pAKT) zur Folge hatte. [134] Der PI3K-AKT-mTor-Signalweg nimmt in vielen Krebsarten eine der wichtigsten Rollen ein und reguliert viele zelluläre Prozesse, wie das Tumorwachstum. [135, 136] Die Aktivierung des Signalwegs hat weiterhin eine große Bedeutung in der Melanominitiation und kann Therapieresistenzen fördern. [136] In dieser Arbeit konnten wir durch Western Blot-Analysen zeigen, dass das Verhältnis von phosphoryliertem AKT zu AKT in der passagierten Zelllinie WT31P5IV signifikant erhöht war,

was die Aktivierung dieses Signalwegs vermuten lässt und letztendlich zu einem verbesserten Überleben der Melanomzellen während der Passagierung führen könnte. [137]

Um ausschließlich den Einfluss des Lebermikromilieus auf die murine Melanomzelllinie WT31 zu untersuchen und den Einfluss der vaskulären Route, die die Zellen nach intravenöser Injektion nehmen außer Acht zu lassen, könnte man weiterführend die Melanomzelllinie WT31 mehrfach über die Leber mittels intralienaler Injektion passagieren. Durch eine Injektion der Zellen in die Milz wird die Leber über die Portalvene zum ersten vaskulären Bett, das die Zellen nach Injektion erreichen und man kann so den Lungenkreislauf umgehen. Diese Methode spiegelt das breite Verteilungsmuster über die Blutbahn in Menschen und Tieren nicht wider, könnte aber den Einfluss des Lebergewebes, insbesondere der Lebersinusendothelzellen, auf die Melanomzelllinie besser darstellen.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass der Einfluss der vaskulären Route und die damit verbundene Passage der Zellen über den Blutkreislauf der Maus die Melanomzelllinie WT31P5IV maßgeblich mitbeeinflusst haben. Hierbei wurden die Adhäsionseigenschaften der passagierten Zelllinie verändert, welches wir mittels Genexpressionsanalysen und *in vivo* Retentionsversuche verifizieren konnten. Ähnliche Prozesse können im Patienten im Stadium IV der Erkrankung ablaufen. Durch den immer wiederkehrenden Kontakt der Krebszellen mit dem Blutkreislauf der Patienten und die wiederkehrende Passage der Zellen mit verschiedenen Organen können sich die Krebszellen molekulargenetisch verändern und unter anderem ihre Adhäsionsfähigkeiten verändern. Um die Ausbreitung von Tumorzellen in der Metastasierungskaskade zukünftig zu verhindern und therapeutisch zu stoppen, müssen solche Prozesse berücksichtigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Therapiemöglichkeiten bei metastasierten maligne Melanom sind sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin limitiert und besonders Patienten im Stadium IV der Erkrankung zeigen eine schlechte Prognose bezüglich des Fortschreitens der Erkrankung.

In dieser Arbeit wurde durch mehrmaliges hepatisches Passagieren der murinen Melanomzelllinie WT31, die eine Mutation im humanen NRAS besitzt, mittels intravenöser Injektion die Melanomzelllinie WT31\_P5IV generiert, die zu etwa zwei Drittel ( $P=0.0077$ ) weniger in die Lunge metastasiert und etwa doppelt so viele ( $P=0.0531$ ) Lebermetastasen generiert. Auch das Verhältnis Lungen- zu Lebermetastasen zeigt eine Verringerung ( $P=0.0005$ ) in WT31\_P5IV, was bedeutet, dass pro Lebermetastase weniger Lungenmetastasen entstehen als in WT31. Um diesen Phänotyp weiter zu charakterisieren wurden H&E-Färbungen angefertigt. Hier konnte weder in den Lungen- noch in den Lebermetastasen ein morphologischer Unterschied hinsichtlich Größe, Nekrose und Wachstumsmuster festgestellt werden. Weitergehende Untersuchungen wurden immunhistochemisch durchgeführt. Ki67, ein Marker für Proliferation, zeigt in den Lungenmetastasen von WT31\_P5IV ein um die Hälfte reduziertes Signal ( $P=0.0171$ ) im Vergleich zu Lungenmetastasen von WT31. Dies weist auf eine verringerte Teilungsaktivität der passagierten Melanomzellen in der Lunge hin. Um den Einfluss der hepatischen Passagierung von WT31 auf die tumoreigenen Faktoren von WT31\_P5IV zu analysieren wurden immunhistochemische Untersuchungen auch in den Lebermetastasen durchgeführt. Färbungen von Ki67 (Proliferationsmarker) und cleaved Caspase-3 (Marker für apoptotische Zellen) zeigten keinen Unterschied zwischen den Lebermetastasen von WT31 und WT31\_P5IV. Weiterhin zeigte auch die Analyse des vaskulären Musters in den Lebermetastasen von WT31 und WT31\_P5IV keinen signifikanten Unterschied. In den Metastasen beider Zelllinien sind hauptsächlich Marker von kontinuierlichem Endothel exprimiert (Endomucin, CD31). Lebermetastasen von WT31 und WT31\_P5IV zeigen also einen gleichen morphologischen Aufbau und keinen Unterschied in der Vaskularisierung ( $P=0.3776$ ), Proliferation ( $P=0.6282$ ) und Nekrose ( $P=0.1163$ ).

Anschließend wurden beide Zelllinien molekulargenetisch charakterisiert, um tumorintrinsic Mechanismen zu evaluieren, die im Zusammenhang mit dem veränderten Metastasierungsverhalten von WT31\_P5IV stehen.

Die Untersuchung der Genexpression von WT31 und WT31\_P5IV zeigte in einer vergleichenden Analyse in den HALLMARK-Gensätzen eine Veränderung von Genen, die einerseits am Stoffwechsel der Zellen beteiligt sind, wie oxidative Phosphorylierung und Glykolyse und andererseits an Signalwegen von MYC-Targets, mitotische Spindel, DNA-Reparatur und PI3K/AKT/mTor.



Mit dem Seahorse Analyzer konnte die mitochondriale ATP-Produktion sowie das ATP, welches mittels Glykolyse produziert wird, in beiden Zelllinien gemessen werden. Hierbei war kein quantitativer Unterschied detektierbar (Mito-ATP-Produktionsrate:  $P=0.4145$  und Glyko-ATP-Produktionsrate:  $P=0.1908$ ).

Igf1b3 als stark herunterreguliertes Gen in WT31\_P5IV ( $P<0.000.1$ ) interagiert negativ mit dem AKT-Signalweg, weshalb dieser genauer analysiert wurde. Western Blot-Analysen von phosphoryliertem AKT (pAKT) und Total-AKT (AKT) zeigten eine Erhöhung des Verhältnisses von pAKT zu AKT um etwa ein Drittel ( $P=0.0291$ ), was eine Aktivierung des Signalwegs bestätigt.

Durch die vaskuläre Route, die die Zellen während der Passagierung nahmen, veränderten sich die tumoreigenen Faktoren maßgeblich. Das Genexpressionsprofil der passagierten Zelllinie WT31\_P5IV zeigt, dass Gene, die an der Retention und Adhäsion der Tumorzellen an das Lungengefäßbett beteiligt sind, verändert wurden. *In vivo* konnte dies durch einen Retentionsversuch von WT31 und WT31\_P5IV bestätigt werden. Die initiale Anheftung von WT31\_P5IV an das Lungenendothel war im Vergleich zu WT31 signifikant ( $P=0.0016$ ) reduziert. Durch die geringere Fähigkeit am Lungenendothel zu adhären können die Melanomzellen WT31\_P5IV leichter über den Blutstrom in die Leber gelangen.

Die wiederholte Kolonisierung von Tumorzellen in spezifischen Organen und sich daraus entwickelnde Subklone finden sich auch bei Patienten, insbesondere aufgrund der durch die verbesserten Therapiemöglichkeiten verlängerten Überlebenszeiten, sodass derartige Prozesse der wiederholten Kolonisierung und Selektion auch in Zukunft sowohl in experimentellen Modellen aber auch bei der Patientenversorgung mitberücksichtigt werden sollten.

## 6 Summary

Therapeutic options for metastatic malignant melanoma are severely limited in both veterinary and human medicine, particularly for patients in stage IV with a poor prognosis.

This study aimed to address these limitations by conducting multiple hepatic passages of the murine melanoma cell line WT31, which harbors a mutation in human NRAS. Through intravenous injection, a melanoma cell line called WT31P5IV was generated, which metastasizes about two thirds ( $P=0.0077$ ) less to the lungs and generates about twice as many ( $P=0.0531$ ) liver metastases. The ratio of lung to liver metastases also shows a reduction ( $P=0.0005$ ) in WT31\_P5IV, which means that there are fewer lung metastases per liver metastasis than in WT31. H&E staining was performed to further characterize this phenotype. No morphological difference in size, necrosis and growth pattern could be detected in either the lung or liver metastases. Further investigations were carried out using immunohistochemistry. Ki67, a marker for proliferation, showed a signal reduced by half ( $P=0.0171$ ) in the lung metastases of WT31\_P5IV compared to lung metastases of WT31. This indicates a reduced division activity of the passaged melanoma cells in the lung. In order to analyze the influence of hepatic passaging of WT31 on the tumorigenic factors of WT31\_P5IV, immunohistochemical studies were also performed in the liver metastases. Staining of Ki67 (proliferation marker) and cleaved caspase-3 (marker for apoptotic cells) showed no difference between the liver metastases of WT31 and WT31\_P5IV. Furthermore, the analysis of the vascular pattern in the liver metastases of WT31 and WT31\_P5IV also showed no significant difference. In the metastases of both cell lines, mainly markers of continuous endothelium are expressed (Endomucin, CD31). Thus, liver metastases of WT31 and WT31\_P5IV show the same morphological structure and no difference in vascularization ( $P=0.3776$ ), proliferation ( $P=0.6282$ ) and necrosis ( $P=0.1163$ ). To understand the altered metastatic behavior of WT31P5IV, comprehensive molecular genetic characterization was performed on both cell lines.

Remarkably, the vascular route taken by the cells during the passaging process caused significant modifications in tumor-intrinsic properties. A comparative analysis of the gene expression of WT31 and WT31\_P5IV in the HALLMARK gene sets showed changes in genes involved in cell metabolism, such as oxidative phosphorylation and glycolysis, and in signaling pathways of MYC targets, mitotic spindle, DNA repair and PI3K/AKT/mTor.

The Seahorse Analyzer was used to measure mitochondrial ATP production and ATP produced by glycolysis in both cell lines. No quantitative difference was detectable (mito-ATP production rate:  $P=0.4145$  and glyco-ATP production rate:  $P=0.1908$ ).

Igfbp3, as a strongly downregulated gene in WT31\_P5IV ( $P<0.000.1$ ), interacts negatively with AKT signaling pathway and was analyzed in more detail. Western blot analyses of

phosphorylated AKT (pAKT) and total AKT (AKT) showed an increase in the ratio of pAKT to AKT by about one third ( $P=0.0291$ ), confirming activation of the signaling pathway.

The gene expression profile of the passaged cell line WT31P5IV underwent changes, primarily affecting genes associated with the retention and adhesion of tumor cells to the pulmonary vascular bed. This alteration was validated *in vivo* by a retention experiment comparing WT31 and WT31P5IV. Notably, the initial attachment of WT31P5IV to the lung endothelium was significantly reduced ( $P=0.0016$ ) compared to WT31 and because of that, melanoma cells were more prone to reach the liver via the bloodstream. This phenomenon of repeated colonization of tumor cells in specific organs may also happen in patients who have undergone multiple treatments and should be taken into account in future considerations.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Garbe C., E.G., Metzler G., *Klinisches Bild und Histologie des malignen Melanoms der Haut*. Tumoren der Haut, 2010. **1. Edition**.
2. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.
3. Clark, W.H., Jr., D.E. Elder, and M. Van Horn, *The biologic forms of malignant melanoma*. Hum Pathol, 1986. **17**(5): p. 443-50.
4. Koch-Institut, R., *Krebs in Deutschland 2017/2018*. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., 2021. **13. Ausgabe**: p. 72-77.
5. Price, N.M., A.M. Rywlin, and A.B. Ackerman, *Histologic criteria for the diagnosis of superficial spreading malignant melanoma: formulated on the basis of proven metastatic lesions*. Cancer, 1976. **38**(6): p. 2434-41.
6. Coleman, W.P., 3rd, et al., *Acral lentiginous melanoma*. Arch Dermatol, 1980. **116**(7): p. 773-6.
7. Olsen, C.M., H.J. Carroll, and D.C. Whiteman, *Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(2): p. 233-45.
8. Titus-Ernstoff, L., et al., *Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk*. Int J Cancer, 2005. **116**(1): p. 144-9.
9. Czajkowski, R., et al., *FAMMM syndrome: pathogenesis and management*. Dermatol Surg, 2004. **30**(2 Pt 2): p. 291-6.
10. Whiteman, D.C., C.A. Whiteman, and A.C. Green, *Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(1): p. 69-82.
11. Kanavy, H.E. and M.R. Gerstenblith, *Ultraviolet radiation and melanoma*. Semin Cutan Med Surg, 2011. **30**(4): p. 222-8.
12. Friedman, R.J. and D.S. Rigel, *The clinical features of malignant melanoma*. Dermatol Clin, 1985. **3**(2): p. 271-83.
13. Abbasi, N.R., et al., *Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria*. Jama, 2004. **292**(22): p. 2771-6.
14. Houghton, A.N. and D. Polsky, *Focus on melanoma*. Cancer Cell, 2002. **2**(4): p. 275-8.
15. Lens, M.B., et al., *Elective lymph node dissection in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Surg, 2002. **137**(4): p. 458-61.
16. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
17. Patel, J.K., et al., *Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases*. Am J Surg, 1978. **135**(6): p. 807-10.
18. Meier, F., et al., *Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma*. Br J Dermatol, 2002. **147**(1): p. 62-70.
19. Onkologie, L., *S3 Leitlinien Melanom*. Juli 2020. **Version 3.3**.
20. Sladden, M.J., et al., *Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. Cd004835.
21. Domingues, B., et al., *Melanoma treatment in review*. ImmunoTargets and Therapy, 2018. **7**: p. 35-49.
22. Ascierto, P.A., et al., *The role of BRAF V600 mutation in melanoma*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 85.
23. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.

24. Dummer, R., et al., *COLUMBUS 5-Year Update: A Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Encorafenib Plus Binimetinib Versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients With BRAF V600-Mutant Melanoma*. J Clin Oncol, 2022: p. Jco2102659.
25. Ivanova, K., et al., *Acute toxoplasmosis mimicking melanoma metastases: review of conditions causing false-positive results on (18)F-FDG PET/CT*. Dermatology, 2012. **225**(4): p. 349-53.
26. Blank, C. and A. Mackensen, *Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(5): p. 739-45.
27. Savoia, P., C. Astrua, and P. Fava, *Ipilimumab (Anti-Ctla-4 Mab) in the treatment of metastatic melanoma: Effectiveness and toxicity management*. Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(5): p. 1092-101.
28. Postow, M.A., O. Hamid, and R.D. Carvajal, *Mucosal melanoma: pathogenesis, clinical behavior, and management*. Curr Oncol Rep, 2012. **14**(5): p. 441-8.
29. Furney, S.J., et al., *Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma*. J Pathol, 2013. **230**(3): p. 261-9.
30. Mihajlovic, M., et al., *Primary mucosal melanomas: a comprehensive review*. Int J Clin Exp Pathol, 2012. **5**(8): p. 739-53.
31. Kirchoff, D.D., et al., *Evolving Therapeutic Strategies in Mucosal Melanoma Have Not Improved Survival Over Five Decades*. Am Surg, 2016. **82**(1): p. 1-5.
32. Carvajal, R.D., et al., *KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma*. Jama, 2011. **305**(22): p. 2327-34.
33. Coyle V.J., G.L.D., *Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs*. Veterinary Medicine, 2009.
34. Kessler, M., *Hauttumoren des Hundes*. In: Kessler, M.: *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*. Stuttgart: Parey bei Mvs., 2005. **2. Auflage**: p. 196-218.
35. Priester, W.A. and N. Mantel, *Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine*. J Natl Cancer Inst, 1971. **47**(6): p. 1333-44.
36. Schobert, C.S., P. Labelle, and R.R. Dubielzig, *Feline conjunctival melanoma: histopathological characteristics and clinical outcomes*. Vet Ophthalmol, 2010. **13**(1): p. 43-6.
37. Team, D.T.V., *Melanom des Tieres - Klinik und Dignität*. 2006. **Infoblatt 14**.
38. Koch, S.E. and J.R. Lange, *Amelanotic melanoma: the great masquerader*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42**(5 Pt 1): p. 731-4.
39. Hahn, K.A., et al., *Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system*. Journal of Small Animal Practice, 1994. **35**(5): p. 251-256.
40. Almela, R.M. and A. Ansón, *A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma*. Vet Sci, 2019. **6**(1).
41. Smith, S.H., M.H. Goldschmidt, and P.M. McManus, *A comparative review of melanocytic neoplasms*. Vet Pathol, 2002. **39**(6): p. 651-78.
42. Patnaik, A.K. and S. Mooney, *Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms*. Vet Pathol, 1988. **25**(2): p. 105-12.
43. MacEwen, E.G., et al., *Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 4249-58.
44. MacEwen, E.G., et al., *Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus Corynebacterium parvum*. Cancer Invest, 1986. **4**(5): p. 397-402.
45. Bostock, D.E., *Prognosis after surgical excision of canine melanomas*. Vet Pathol, 1979. **16**(1): p. 32-40.
46. Bergman, P.J., *Canine oral melanoma*. Clin Tech Small Anim Pract, 2007. **22**(2): p. 55-60.

47. Bentzen, S.M., et al., *Clinical radiobiology of malignant melanoma*. *Radiother Oncol*, 1989. **16**(3): p. 169-82.
48. Overgaard, J., et al., *Some factors of importance in the radiation treatment of malignant melanoma*. *Radiother Oncol*, 1986. **5**(3): p. 183-92.
49. Cancedda, S., et al., *Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma*. *Vet Comp Oncol*, 2016. **14**(4): p. e146-e157.
50. Kawabe, M., et al., *Outcomes of dogs undergoing radiotherapy for treatment of oral malignant melanoma: 111 cases (2006-2012)*. *J Am Vet Med Assoc*, 2015. **247**(10): p. 1146-53.
51. Boria, P.A., et al., *Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs*. *J Am Vet Med Assoc*, 2004. **224**(3): p. 388-94.
52. Brockley, L.K., M.A. Cooper, and P.F. Bennett, *Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival*. *N Z Vet J*, 2013. **61**(1): p. 25-31.
53. Gaspar, T.B., et al., *The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs-insight into a modern cancer field*. *Vet Comp Oncol*, 2018. **16**(1): p. 2-11.
54. MacDonald, V., *Chemotherapy: managing side effects and safe handling*. *Can Vet J*, 2009. **50**(6): p. 665-8.
55. Barabas, K., et al., *Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications*. *Vet Comp Oncol*, 2008. **6**(1): p. 1-18.
56. Martínez, C.M., et al., *Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms*. *Vet Pathol*, 2011. **48**(6): p. 1204-11.
57. Hussain, M., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy*. *Pharmacol Res*, 2012. **66**(1): p. 7-18.
58. Dank, G., et al., *Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision*. *Vet Comp Oncol*, 2014. **12**(1): p. 78-84.
59. Turek, M., et al., *Multimodality treatment including ONCEPT for canine oral melanoma: A retrospective analysis of 131 dogs*. *Vet Radiol Ultrasound*, 2020. **61**(4): p. 471-480.
60. Conrad, D., et al., *Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs*. *Vet Sci*, 2022. **9**(2).
61. Ito, K., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the growth of canine malignant melanoma cells in vitro and in vivo*. *Vet J*, 2013. **198**(3): p. 577-82.
62. Maekawa, N., et al., *Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- $\gamma$  production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98415.
63. Maekawa, N., et al., *PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma*. *NPJ Precis Oncol*, 2021. **5**(1): p. 10.
64. Maekawa, N., et al., *A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8951.
65. Featherstone, H.J., et al., *Iris biopsy to investigate feline iris hyperpigmentation*. *Vet Ophthalmol*, 2020. **23**(2): p. 269-276.
66. Seltenthaler, M.H., et al., *Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma*. *Pigment Cell Res*, 2004. **17**(6): p. 674-81.
67. Rosengren Pielberg, G., et al., *A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse*. *Nat Genet*, 2008. **40**(8): p. 1004-9.
68. Sundström, E., et al., *Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses*. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 365.
69. Fleury, C., et al., *The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses (1): clinical-pathological characterization*. *Pigment Cell Res*, 2000. **13**(1): p. 39-46.

70. Talukdar, A.H., *A histological study of the dermo-epidermal junction in the skin of horse*. Res Vet Sci, 1973. **15**(3): p. 328-32.
71. Phillips, J.C. and L.M. Lembcke, *Equine melanocytic tumors*. Vet Clin North Am Equine Pract, 2013. **29**(3): p. 673-87.
72. Valentine, B.A., *Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991)*. J Vet Intern Med, 1995. **9**(5): p. 291-7.
73. LeRoy, B.E., et al., *Tail-base mass from a "horse of a different color"*. Vet Clin Pathol, 2005. **34**(1): p. 69-71.
74. MacGillivray, K.C., R.W. Sweeney, and F. Del Piero, *Metastatic melanoma in horses*. J Vet Intern Med, 2002. **16**(4): p. 452-6.
75. Rowe, E.L. and K.E. Sullins, *Excision as treatment of dermal melanomatosis in horses: 11 cases (1994-2000)*. J Am Vet Med Assoc, 2004. **225**(1): p. 94-6.
76. Goetz, T.E., et al., *Cimetidine for treatment of melanomas in three horses*. J Am Vet Med Assoc, 1990. **196**(3): p. 449-52.
77. Théon, A.P., et al., *Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995-2004)*. J Am Vet Med Assoc, 2007. **230**(10): p. 1506-13.
78. Hewes, C.A. and K.E. Sullins, *Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004)*. J Am Vet Med Assoc, 2006. **229**(10): p. 1617-22.
79. Heinzerling, L., et al., *Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(1): p. 35-48.
80. Müller, J., et al., *Double-blind placebo-controlled study with interleukin-18 and interleukin-12-encoding plasmid DNA shows antitumor effect in metastatic melanoma in gray horses*. J Immunother, 2011. **34**(1): p. 58-64.
81. Lembcke, L.M., et al., *Development of Immunologic Assays to Measure Response in Horses Vaccinated with Xenogeneic Plasmid DNA Encoding Human Tyrosinase*. Journal of Equine Veterinary Science, 2012. **32**(10): p. 607-615.
82. Moore J.S., S.C., Buechner-Maxwell V., Scarratt W.K., Crisman M., Furr M., Robertson J., *Melanoma in horses: Current perspectives*. BEVA Equine Veterinary Education, 2012. **23**(3): p. 144-151.
83. Geraud, C., et al., *The metastatic cycle: metastatic niches and cancer cell dissemination*. J Dtsch Dermatol Ges, 2014. **12**(11): p. 1012-9.
84. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2527-35.
85. Kinsey, D.L., *An experimental study of preferential metastasis*. Cancer, 1960. **13**: p. 674-6.
86. Greene, H.S. and E.K. Harvey, *THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DISSEMINATION OF TUMOR CELLS AND THE DISTRIBUTION OF METASTASES*. Cancer Res, 1964. **24**: p. 799-811.
87. Ewing, J., *Neoplastic diseases*. 1928. **3rd ed. WB Saunders, Philadelphia**.
88. Diamond, J.R., C.A. Finlayson, and V.F. Borges, *Hepatic complications of breast cancer*. Lancet Oncol, 2009. **10**(6): p. 615-21.
89. Rivoire, M., et al., *Treatment of liver metastases from uveal melanoma*. Ann Surg Oncol, 2005. **12**(6): p. 422-8.
90. Shelly, S., et al., *Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas*. Mamm Genome, 2005. **16**(3): p. 211-7.
91. Curtin, J.A., et al., *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4340-6.
92. Fowles, J.S., C.L. Denton, and D.L. Gustafson, *Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma*. Vet Comp Oncol, 2015. **13**(3): p. 288-304.
93. Vilkovskiy, I.F., et al., *Influence of hepatic neoplasia on life expectancy in dogs*. Vet World, 2020. **13**(3): p. 413-418.

94. Jenkins, R.W. and D.E. Fisher, *Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond*. J Invest Dermatol, 2021. **141**(1): p. 23-31.
95. Larkin, J., et al., *Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2019. **381**(16): p. 1535-1546.
96. Yu, J., et al., *Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 152-164.
97. Tunikowska, J., et al., *The First Application of Nanoelectrochemotherapy in Feline Oral Malignant Melanoma Treatment-Case Study*. Animals (Basel), 2020. **10**(4).
98. Guerra Guimarães, T., et al., *Current Therapeutics and Future Perspectives to Ocular Melanocytic Neoplasms in Dogs and Cats*. Bioengineering (Basel), 2021. **8**(12).
99. Kayes, D. and B. Blacklock, *Feline Uveal Melanoma Review: Our Current Understanding and Recent Research Advances*. Vet Sci, 2022. **9**(2).
100. Richter, S.H., et al., *Systematic variation improves reproducibility of animal experiments*. Nat Methods, 2010. **7**(3): p. 167-8.
101. Bergman, P.J., et al., *Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1284-90.
102. Chamoto, K., M. Al-Habsi, and T. Honjo, *Role of PD-1 in Immunity and Diseases*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **410**: p. 75-97.
103. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 4-10.
104. Barnhill, R., et al., *Replacement and desmoplastic histopathological growth patterns in cutaneous melanoma liver metastases: frequency, characteristics, and robust prognostic value*. J Pathol Clin Res, 2020. **6**(3): p. 195-206.
105. Paku, S., L. Kopper, and P. Nagy, *Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer*. Int J Cancer, 2005. **115**(6): p. 893-902.
106. Takeda, A., et al., *Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis*. Ann Surg Oncol, 2002. **9**(7): p. 610-6.
107. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
108. Eisen, T., et al., *Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis*. Br J Cancer, 2006. **95**(5): p. 581-6.
109. Takeda, T., et al., *Sorafenib treatment of metastatic melanoma with c-Kit aberration reduces tumor growth and promotes survival*. Oncol Lett, 2021. **22**(6): p. 827.
110. Marconato, L., et al., *Sorafenib for the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Preliminary Toxicity and Activity Data in Dogs*. Cancers (Basel), 2020. **12**(5).
111. Nakamura, K., et al., *Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model*. Life Sci, 2002. **70**(7): p. 791-8.
112. Kanda, Y., et al., *Amigo2-upregulation in Tumour Cells Facilitates Their Attachment to Liver Endothelial Cells Resulting in Liver Metastases*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43567.
113. Menon, S.S., et al., *Ki-67 protein as a tumour proliferation marker*. Clin Chim Acta, 2019. **491**: p. 39-45.
114. Abadie, J.J., M.A. Amardeilh, and M.E. Delverdier, *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs*. J Am Vet Med Assoc, 1999. **215**(11): p. 1629-34.
115. Marconi, A., et al., *In Vivo Melanoma Cell Morphology Reflects Molecular Signature and Tumor Aggressiveness*. J Invest Dermatol, 2022. **142**(8): p. 2205-2216.e6.
116. Porter, A.G. and R.U. Jänicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(2): p. 99-104.
117. Zhou, M., et al., *Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells*. Int J Cancer, 2018. **143**(4): p. 921-930.
118. Pu, X., et al., *Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival*. Apoptosis, 2017. **22**(3): p. 357-368.



119. Makrilia, N., et al., *Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer*. Cancer Invest, 2009. **27**(10): p. 1023-37.
120. Winter, J.M., et al., *Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(2): p. 412-8.
121. Andrews, J.L., A.C. Kim, and J.R. Hens, *The role and function of cadherins in the mammary gland*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. 203.
122. Gruss, C. and M. Herlyn, *Role of cadherins and matrixins in melanoma*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(2): p. 117-23.
123. Casal, J.I. and R.A. Bartolomé, *RGD cadherins and  $\alpha 2\beta 1$  integrin in cancer metastasis: A dangerous liaison*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2018. **1869**(2): p. 321-332.
124. Chu, K., et al., *Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(8): p. 1259-67.
125. Frank, M. and R. Kemler, *Protocadherins*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 557-62.
126. Dallosso, A.R., et al., *Long-range epigenetic silencing of chromosome 5q31 protocadherins is involved in early and late stages of colorectal tumorigenesis through modulation of oncogenic pathways*. Oncogene, 2012. **31**(40): p. 4409-19.
127. Carrier, A., et al., *Epigenetically regulated PCDHB15 impairs aggressiveness of metastatic melanoma cells*. Clin Epigenetics, 2022. **14**(1): p. 156.
128. Klopfleisch, R., et al., *Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 618.
129. Zheng, J., *Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)*. Oncol Lett, 2012. **4**(6): p. 1151-1157.
130. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
131. Gstraunthaler, G., T. Seppi, and W. Pfaller, *Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic?* Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(3): p. 150-72.
132. Nicholls, D.G., et al., *Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells*. J Vis Exp, 2010(46).
133. Jaber, S.M., N. Yadava, and B.M. Polster, *Mapping mitochondrial respiratory chain deficiencies by respirometry: Beyond the Mito Stress Test*. Exp Neurol, 2020. **328**: p. 113282.
134. Dar, A.A., et al., *Functional modulation of IGF-binding protein-3 expression in melanoma*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(8): p. 2071-9.
135. Davies, M.A., *The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 142-7.
136. McCubrey, J.A., et al., *Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways*. J Cell Physiol, 2011. **226**(11): p. 2762-81.
137. Meier, F., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2986-3001.

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Cyrill Géraud für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Die regelmäßigen Labmeetings und die gute Betreuung waren ein sehr wichtiger Bestandteil für die erfolgreiche Bearbeitung des Projekts.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sebastian Wohlfeil. Als direkter Ansprechpartner war er immer für Gespräche bereit, half bei offenen Fragen und stand mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Martin Kramer danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und das Korrekturlesen der Dissertation. Ohne ihn wäre eine Promotion zum Dr.med.vet. nicht möglich gewesen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kollegin Céline Weller, die über die Jahre auch eine gute Freundin geworden ist. Ohne dich wäre das Fertigstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Der themenspezifische (und vor allem unspezifische) Austausch mit dir war besonders wichtig und ich danke dir für deinen Zuspruch, deine aufbauenden Worte und deine Unterstützung während der letzten 5 Jahre.

Ich danke der AG Géraud, vor allem Christof Dormann, Verena Häfele, Niklas Straub, Anna Lena Irens, Anna Jauch und Ana Olsavszky für die Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank geht auch an die AG Goerd/Reiners-Koch, vor allem an Johannes Hoffmann, der immer ein offenes Ohr hatte und für jede Kaffeepause zu haben war.

Weiterhin danke ich Dr. Sina Kürschner, Theresa Staniczek und Stephanie Riester, die bei allen offenen Fragen immer mit gutem Rat zur Seite standen.

Danke auch an Tinja Baljkas, Julia Schüler, Theresa Deutschmann, Maxi Suhayda und Yang Tuo.

Die Zeit im Labor war wunderbar und ich schätzte besonders den freundschaftlichen Umgang untereinander. Diese Zeit werde ich sehr vermissen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie, besonders meiner Mutter Andrea, meiner Schwester Ramona, meinem Schwager Jhonny und der kleinen Zoe für die uneingeschränkte Unterstützung und die Ablenkung an den vielen Wochenenden, die wir als Familie gemeinsam verbringen durften. Danke an Daniel für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit und danke auch an Matthias.

## 9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Bianca Dietsch



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7186 8

