

- **Das Milz-, aber nicht das Knochenmarkmikromilieu** induziert CD44v6-Varianten, die die frühe Entwicklung der chronisch lymphatischen Leukämie fördern.
- **Die CD44v6-Expression** ist mit dem NF- κ B- und MAP-Kinase-Signalweg bei muriner und humaner B-Zell-Leukämie verknüpft und trägt zur Proliferation der Tumorzellen bei.



Die Rolle des Adhäsionsmoleküls CD44 und seiner Varianten in der Entwicklung der chronisch lymphatischen Leukämie

Wir konnten vor Kurzem im wissenschaftlichen Journal Blood (Gutjahr et al. 2018; DOI: 10.1182/blood-2017-08-802462) zeigen, dass die spezifische Variante 6 des Adhäsionsmoleküls CD44 (CD44v6) an der Lokalisation und Teilungsfähigkeit von chronisch lymphatischen Leukämiezellen maßgeblich beteiligt ist.

Mikromilieu der chronisch lymphatischen Leukämie

In unserer Forschungsgruppe beschäftigen wir uns hauptsächlich mit dem Mikromilieu der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL). In dieser B-Zell-Erkrankung hat die Umgebung der Tumorzellen maßgebliche Bedeutung, da die CLL-Zellen, im Gegensatz zu anderen Tumorzellen, ohne Überlebens- und Teilungssignale ihrer Umgebung rasch sterben. Der große Erfolg neuer Therapeutika wie Ibrutinib, das zu einem Ausschwemmen der Tumorzellen aus ihrem Mikromilieu in das Blut und in weiterer Folge zu einem Entzug an überlebensnotwendigen Signalen führt, hat zu einer erheblichen Verbesserung bei der Behandlung von CLL-Patienten geführt und unterstreicht die Wichtigkeit der Tumor-Umgebungs-Interaktion (zusammengefasst in Kipps et al. 2017). In unserer Arbeitsgruppe setzen wir uns mit den molekularen Faktoren auseinander, die es den Tumorzellen erlauben, in schützende Bereiche in den Lymphknoten, der Milz oder des Knochenmarkes

einzuwandern und dort zu verbleiben, um sich zu teilen. Ein Fokus liegt hierbei auf dem Oberflächenmolekül CD44. Dieses ist Teil einer Molekülfamilie bestehend aus verschiedenen CD44-Varianten, die durch alternatives RNA-Splicing und posttranslationalen Modifikationen in ihrer Funktion beeinflusst werden. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass die *In-vitro*-Stimulierung der CLL-Zellen durch das Mikromilieu zu einer Veränderung des CD44-Pools führt, was heißt, dass die Expression der Standard-CD44-Variante (CD44s) zur aktivierungsabhängigen CD44v6-Variante wechselt (Girbl et al. 2013). Im Gegensatz zu CD44s weist CD44v6 eine höhere Affinität für den Bindungspartner Hyaluronsäure auf, die in weiterer Folge untersucht wurde.

Ergebnisse des aktuellen Projekts

In unserem aktuellen Projekt, das in diesem Jahr in Blood (DOI: 10.1182/blood-2017-08-802462) publiziert wurde, haben wir die *In-vivo*-Funktion von CD44v6 erörtert. Mithilfe eines CLL-Mausmodells, in dem nur die B-Zellen keine CD44-Expression aufweisen (der sogenannten Cd44 Δ B-Tcl1-tg-Maus), konnten wir zeigen, dass CD44 für die frühe CLL-Entwicklung und für die Infiltration in die Milz, aber nicht für die Infiltration in das Knochenmark wichtig ist (Abb. 1A-C). Interessanterweise konnte eine Induktion von CD44v6 nur durch das Mikromilieu in der Milz beobachtet

Julia C. Gutjahr^{1,2}, Eva Szenes^{1,2}, Lisa Tschuch^{1,2}, Daniela Asslaber^{1,2}, Michaela Schlederer³⁻⁶, Simone Roos⁵, Xiaobing Yu⁷, Tamara Girbl^{1,2}, Christina Sternberg⁸, Alexander Egle^{1,2}, Fritz Aberger⁹, Ronen Aloni⁹, Lukas Kenner³⁻⁶, Richard Greil^{1,2}, Veronique Orian-Rousseau⁷, Tanja N. Hartmann^{1,2}

- Third Medical Department with Hematology, Medical Oncology, Hemostaseology, Infectious Diseases, and Rheumatology, Oncology Center, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria;
- Cancer Cluster Salzburg, Salzburg Cancer Research Institute-Laboratory for Immunological and Molecular Cancer Research, Salzburg, Austria;
- Clinical Institute of Pathology, Medical University of Vienna, Austria;
- Department of Experimental Pathology and Laboratory Animal Science, Medical University of Vienna, Austria;
- Unit of Pathology of Laboratory Animals, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria;
- Ludwig Boltzmann Institute for Cancer Research, Vienna, Austria;
- Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe, Germany;
- Cancer Cluster Salzburg, Department of Molecular Biology, Paris-Lodron University of Salzburg, Salzburg, Austria;
- Department of Immunology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

werden im Gegensatz zum Milieu des Knochenmarks (Abb. 1D). Bei adaptiven Transplantationen von primären Zellen von CLL-Patienten in immundefiziente Mäuse konnten wir die Wichtigkeit von CD44 für das Einwandern in die Milz auch für das Humanmodell bestätigen (Abb. 1E). Die Analyse involvierter Signalwege zeigte, dass das Mikromilieu der Milz in den Tumorzellen zu einer „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (NF- κ B) gesteuerten Aktivierung der CD44v6-Expression führt. In weiterer Folge löst CD44v6 durch seine höhere Bindungsfähigkeit an Hyaluronsäure dann wiederum die Aktivierung von NF- κ B bzw. MAP-Kinase-(MAPK)-Signalwegen aus, die zur Teilung der Tumorzellen bzw. Vermehrung derselben und somit zu einem Voran-

schreiten der Krankheit führen. Diese im murinen System gefundenen Ergebnisse konnten wir auch in humanem Primärmaterial rekapitulieren. Die gezielte Blockade von CD44 und seiner Variante 6 führte auch bei humanen Zellen von CLL-Patienten zu einer verringerten Proliferation *in vitro* (Abb. 1F).

Resümee

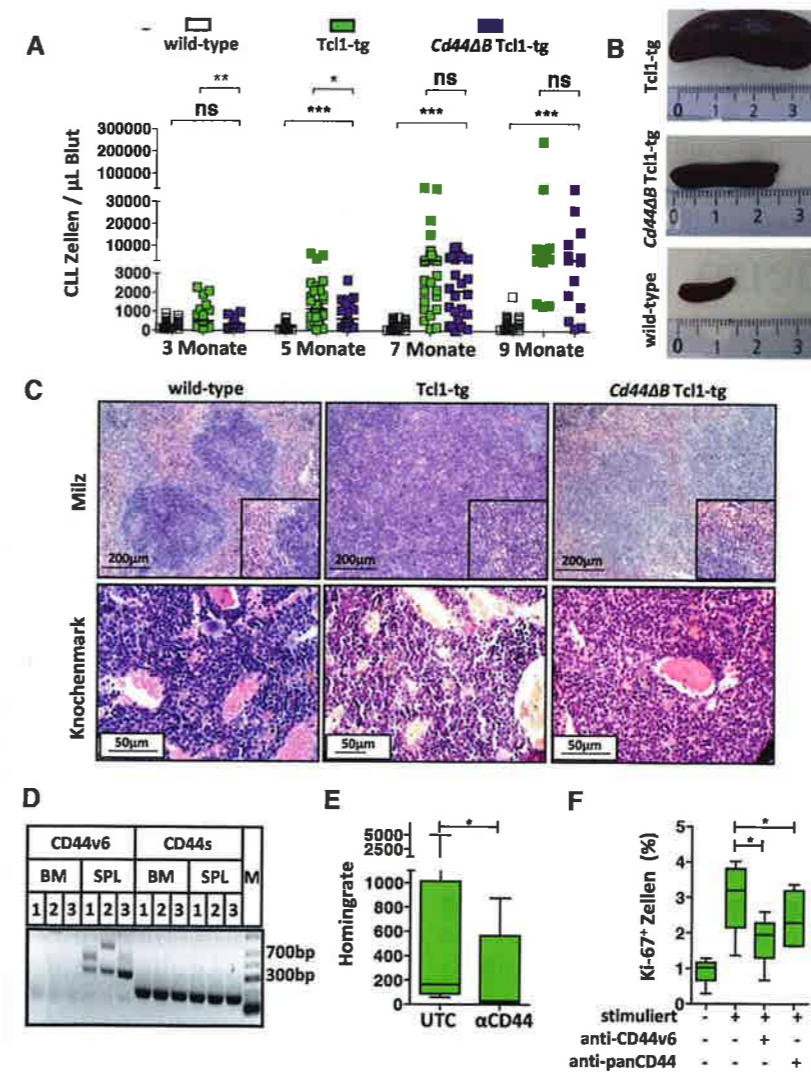
Wir konnten zeigen, dass CD44v6 maßgeblich an der Pathophysiologie der chronisch lymphatischen Leukämie beteiligt ist. Interessanterweise stellten wir eine unterschiedliche Expression von CD44v6 in den verschiedenen lymphatischen Or-

ganen fest und unterstreichen hierbei die Wichtigkeit der sekundär lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten) in der CLL-Entwicklung. In anderen Tumorerkrankungen ist CD44v6 schon als Marker für metastasierende Zellen beschrieben und wurde auch als negativ prognostischer Marker vorgeschlagen. Ein interessanter Ansatz für eine CD44v6-gerichtete T-Zell-Therapie wurde von Casucci et al. in einem Mausmodell für die akute myeloische Leukämie (AML) beschrieben. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung der Mäuse mit genetisch modifizierten T-Zellen zu einer verringerten Tumormasse führte und es somit zu einer Regression des Tumors in den therapierten Mäusen kam.

Ausblick

Obwohl die neuen Medikamente wie Ibrutinib in der chronisch lymphatischen Leukämie einen Durchbruch in der zielgerichteten Tumorthherapie darstellen, sollten wir schon früh erkennen, ob diese Form der Therapie bei einzelnen Patienten anspricht oder ob Resistenzmechanismen auftreten bzw. schon vor Therapiebeginn vorhanden sind. Das von uns untersuchte Molekül CD44v6 würde sich hierbei als Marker für einen Fortbestand der aktiven Erkrankung eignen. Das Auftreten von CD44v6-positiven CLL-Zellen im Blut ist leicht mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen und würde bei stetiger Expression auf eine fortschreitende Leukämie hinweisen. Da CD44v6 ausschließlich auf aktivierten, sich teilenden CLL-Zellen vorkommt, wäre es zudem ein „Target“ für diesen proliferierenden Tumorzellpool und könnte unter anderem mit der vorhin erwähnten adaptiven T-Zell-Therapie ins Visier genommen werden, um als alternativer Behandlungsansatz für Patienten, die eine Resistenz gegen etablierte Therapien entwickelt haben, zu fungieren.

- Referenzen:
 – Gutjahr et al., Microenvironment-induced CD44v6 promotes early disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2018; 131(12):1337–1349
 – Kipps TJ et al., Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:17008
 – Girbl T et al., CD40-mediated activation of chronic lymphocytic leukemia cells promotes their CD44-dependent adhesion to hyaluronan and restricts CCL21-induced motility. *Cancer Res* 2013; 73(2):561–70
 – Casucci M et al., CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* 2013; 122(20):3461–72



(A) Regelmäßige Messungen der Tumormasse im peripheren Blut zeigten eine verzögerte CLL Entwicklung in Cd44 Δ B-Tcl1-tg-Mäusen. (B) Zum Zeitpunkt des Todes zeigten die Cd44 Δ B-Tcl1-tg-Mäuse eine verringerte Milzgröße im Vergleich zu Kontrollmäusen. (C) In Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurde eine verringerte CLL-Infiltration in der Milz bestätigt, wohingegen kein Unterschied in der Infiltration des Knochenmarkes gesehen wurde. (D) Mittels Reverser-Transkriptase-PCR wurde das Vorhandensein von CD44-Varianten in den Knochenmark-(BM-) bzw. Milz-(SPL-) CLL-Zellen von Tcl1-tg-Kontrollmäusen getestet. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Primerpaaren konnte zwischen CD44v6-haltigen Varianten und der überwiegend vorhandenen Standard-CD44s-mRNA unterschieden werden. (E) Humane CLL-Zellen wurden mit oder ohne Anti-CD44-Antikörper vorbehandelt und in immundefiziente Mäuse intravenös injiziert. Nach 3 Stunden wurden die Mäuse geopfert und die Anzahl an humanen CLL-Zellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Homingrate ist definiert als die Zahl der gefundenen Zellen pro 1 Million gemessenen Zellen pro 1 Million injizierter Zellen. (F) Primäre humane CLL-Zellen wurden mittels CD44L-exprimierenden Fibroblasten stimuliert und, wo angegeben, mit Anti-CD44- oder Anti-CD44v6-Antikörpern behandelt. Der Prozentsatz an proliferierenden Zellen wurde mittels Ki-67-Färbung festgestellt.

Abb. 1: CLL-Entwicklung in der Cd44 Δ B-Tcl1-tg-Maus und die Rolle von CD44 und CD44v6 in der humanen CLL-Zellwanderung und Zellproliferation.

FOTO: SALK

Dr. Julia Gutjahr
 Salzburg Cancer Research Institute (SCRI)
 Labor für Immunologische und Molekulare
 Krebsforschung (LIMCR), III. Medizin

