

Von der Grundlagenforschung zur Entwicklung metastasenspezifischer Peptide

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, ITG

Als wir uns vor mehr als 20 Jahren entschlossen, nach Genen zu suchen, die spezifisch in metastasierenden Tumorzellen aktiv sind, hatten wir zwei Hoffnungen: Erstens könnten solche „Markergene“, speziell natürlich die von ihnen hergestellten Proteine, diagnostische und eventuell auch therapeutische Bedeutung im Kampf gegen Metastasen bekommen. Zweitens könnten uns die von solchen Genen abgeleiteten Proteine Aufschluss über die molekularen Wirkmechanismen geben, die zur Metastasierung von Tumorzellen führen. Mit der Identifizierung von CD44 v6 als einem der ersten metastasenspezifischen Proteine hatten wir sehr bald die Möglichkeit, beide Linien zu verfolgen.

Der erste Aspekt, der der medizinischen Relevanz, war vielversprechend nachdem wir gezeigt hatten, dass ein homologes CD44-Gen auch beim Menschen vorkommt (wir hatten es ursprünglich in der Ratte identifiziert, da wir ja in einem geeigneten Modellorganismus seine metastasenspezifischen Eigenschaften testen wollten) und in einer Reihe von menschlichen Tumoren ein Indiz für bösartiges Wachstum – also Metastasierung – ist. Über ein Patent gelang es uns, eine große pharmazeutische Firma ins Boot zu bekommen, die uns tatkräftig unterstützte. Mit deren Hilfe haben wir eine ganze Palette von Antikörpern hergestellt, also Proteine, die spezifische Strukturen auf anderen Proteinen, in unserem Fall CD44 v6, erkennen und binden können. Diese Antikörper wurden dann zum Nachweis von CD44 v6 und zur Inhibition seiner Funktion eingesetzt. Nachdem alle Versuche erfolgver-

sprechend verliefen, hat diese pharmazeutische Firma das Projekt gestartet, CD44 v6 als therapeutisches Zielmolekül zur Bekämpfung von Metastasen zu verwenden. Dies ist ein langwieriger und extrem kostenaufwändiger Weg. Es wurden so genannte „humanisierte“ Antikörper hergestellt, die humanes CD44 v6 erkennen und von menschlichen Immunzellen toleriert werden. Diese Antikörper müssen in großen Mengen und unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen synthetisiert werden (sie dürfen z. B. nicht mit Viren kontaminiert sein), und wurden dann in ersten klinischen Tests auf pharmakologische Eignung in Tumorkranken eingesetzt. Nachdem auch diese Tests zufriedenstellend verlaufen waren, wurden die Antikörper durch Fusion mit einem Toxin so verändert, dass ihre Bindung an Zellen (bevorzugt natürlich Tumorzellen), die Tötung der Zellen bewirkt. Sieben unheilbar an Krebs erkrankte Patienten wurden mit diesen Toxinantikörpern behandelt. Leider zeigten diese Patienten neben der Hemmung des Tumorzellwachstums Krankheits-symptome auf der Haut, die eines der normalen Organe ist, die ebenfalls CD44 v6 tragen. Einer der Patienten verstarb an diesen Symptomen und daher wurde die gesamte Testreihe abgebrochen [1]. Damit war eine Entwicklung, die mehr als 10 Jahre gedauert hatte, in den Sand gesetzt. Gleichzeitig war es zunächst das Aus für CD44 v6 als therapeutisches Metastasenzielgen, weil man erwarten musste, dass die Behandlung von Patienten mit zu vielen und zu schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden ist.

Die zweite Möglichkeit, die uns die Identifizierung von CD44 v6 eröffnete, nämlich Wirkmechanismen zu entdecken, die relevant für Metastasierung sind, war zwar ebenso langwierig wie der erste Ansatz, dafür aber weit weniger risikobehaftet und wissenschaftlich sehr erfolgreich. Über die Identifizierung der Wirkmechanismen stießen wir aber auch auf neue Möglichkeiten der Intervention mit ihrer Wirkung und damit auf neue therapeutische Ziele. Im Folgenden soll ein solcher Ansatz beschrieben werden.

Das CD44-v6-Protein ist ein Transmembranprotein auf der Oberfläche von Zellen mit einem extrazellulären Abschnitt, einem transmembranen Teil und einem intrazellulären Abschnitt (Abb. 1). In den letzten fünf Jahren ist es uns gelungen, diejenige Funktion von CD44 v6 zu identifizieren, die für die Bildung von Metastasen von Tumorzellen verantwortlich ist. Es ist nämlich ein Korezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren, spezifisch des Met-Rezeptors, der für Zellwanderung und Zellvermehrung und invasives Wachstum verantwortlich sein kann – Eigenschaften, die auch eine metastasierende Tumorzelle benötigt. Wachstumsfaktorrezeptoren sind generell Oberflächenproteine, die durch die Bindung eines Liganden (eines Wachstumsfaktors) aktiviert werden (siehe auch die Abb. 1). Diese Aktivierung führt zu einer Kettenreaktion im Zellinnern (man spricht von „Signaltransduktion“) wobei mehrere Proteine nacheinander aktiviert werden. Am Ende der Kette befindet sich ein Protein, das, wenn aktiviert, im Zellkern Gene aktivieren oder reprimieren kann und auf diese Weise zelluläres Wachs-

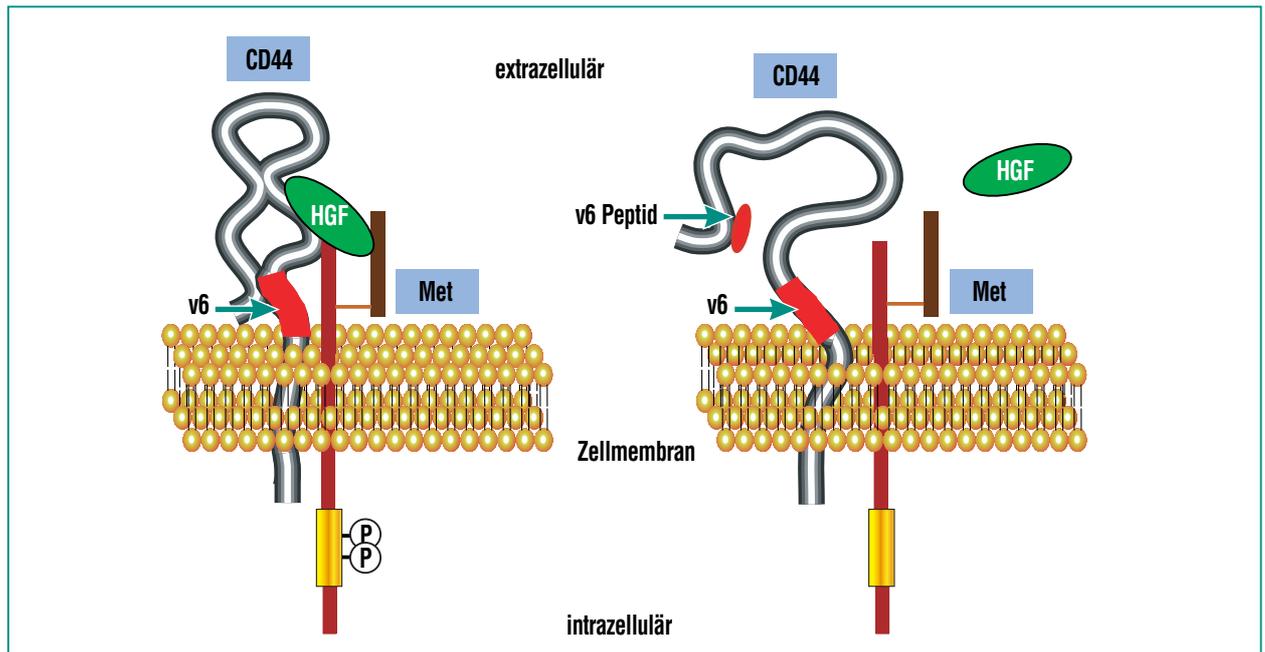


Abb. 1: Für die Aktivierung des Transmembranrezeptors Met, dargestellt als Phosphorylierung (P) im Zellinneren, ist die Bindung seines Liganden, des Wachstumsfaktors HGF (hepatocyte growth factor), im Komplex mit CD44 v6 notwendig (linker Teil der Abbildung). Ein CD44-v6-spezifisches Peptid interferiert mit der korrekten Faltung von CD44 v6 (rechter Teil der Abbildung) und verhindert damit die Bindung des Liganden und die Aktivierung des Rezeptors.

tum oder Bewegung steuert. Nachdem man lange Zeit dachte, dass solche Wachstumsfaktorrezeptoren nur über die Bindung ihres Liganden reguliert werden, zeigt sich nun, dass es darüber hinaus noch eine Feinregulation über Korezeptoren gibt – und ein solcher Korezeptor ist CD44 v6. Über die physiologische Bedeutung dieser Feinregulation haben wir in den Nachrichten 1/2002 berichtet [2]. Sie kontrollieren, ob in einer gegebenen physiologischen Situation die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden überhaupt passieren soll. In diesem Artikel soll nun erhellt werden, wie CD44 v6 als Korezeptor funktioniert.

Antikörperproteine, die spezifisch an den extrazellulären Teil von CD44 v6 binden, waren ursprüng-

lich als Hemmer der Metastasierung von Tumorzellen im Tierrmodell Ratte identifiziert worden [3]. Die gleichen Antikörper hemmen auch die Aktivierung des Met-Rezeptors durch seinen Liganden. Das bedeutet, dass die extrazelluläre Domäne von CD44 v6 an der Aktivierung von Met beteiligt ist. Entweder benötigt der Met-Rezeptor die Bindung an CD44 v6, damit er von seinem Liganden erkannt werden kann, oder CD44 v6 muss den Liganden primär binden und ihn dann seinem Rezeptor „präsentieren“. Dass letzteres der Fall ist, hat Alexandra Matzke, ein Postdoc in unserem Labor, in einer Reihe von eleganten Experimenten gezeigt. Sie hat die Bindung des Liganden in Zellen untersucht, die entweder sowohl CD44 v6 als auch den Met-Rezeptor (als positive

Kontrolle) oder nur den Met-Rezeptor oder nur CD44 v6 auf ihrer Oberfläche tragen. Der Met-Rezeptor alleine reichte nicht zur Bindung seines Liganden aus, wohl aber CD44 v6 alleine. Damit ist eine Funktion von CD44 v6 geklärt. Welches sind aber die Aminosäuren im CD44-v6-Protein (Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, die linear miteinander verknüpft sind), die für die Bindung der Liganden und damit der Aktivierung des Met-Rezeptors verantwortlich sind? Auch dieser Frage hat sich Alexandra Matzke angenommen. Sie hat kritische Aminosäuren in CD44 v6 durch Mutation verändert und solche Mutantenproteine auf ihre Fähigkeit, als Korezeptor zu funktionieren, getestet. Auf diese Art und Weise gelang es ihr, eine Sequenz von drei aufeinander

folgende Aminosäuren in CD44 v6 dingfest zu machen. Nur wenn diese drei Aminosäuren in der extrazellulären Domäne verändert waren, war CD44 v6 als Korezeptor inaktiv.

Dieser Befund hat neben seiner wissenschaftlichen Bedeutung (wie beeinflussen diese drei Aminosäuren die Struktur des Proteins?) eine eminente praktische Bedeutung. Denn dieses Ergebnis impliziert, dass möglicherweise kleine Peptide, deren Aminosäuresequenz die drei kritischen Aminosäuren beinhalten, die Aktivität des Korezeptors blockieren könnten und damit die Aktivität des Met-Rezeptors inhibieren könnten. Um diese Möglichkeit zu testen, haben wir solche Peptide synthetisieren lassen. Und tatsächlich fanden wir, dass Peptide, die nur aus fünf Aminosäuren aufgebaut sind, aber die drei kritischen enthalten, erstens die Bindung des Met-Liganden HGF an CD44 v6 und damit zweitens die Aktivierung des Met-Rezeptors hemmen (siehe Abb. 1).

Wenn die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für den Met-Rezeptor tatsächlich der kritische Schritt für die Metastasierung der Tumorzelle ist, sollten diese spezifischen Peptide auch die Metastasierung in vivo, in der Ratte, unterdrücken. Wir haben die Tumorzellen unter die Haut von Ratten appliziert. Nachdem sich Primärtumore gebildet hatten, haben wir Peptide dreimal wöchentlich injiziert (bisher nur in die Nähe des Tumorgewebes; in weiteren Experimenten ist vorgesehen, die Peptide intravenös zu verabreichen) und die Tiere vor Erreichen des moribunden Stadiums von „Kontrolltieren“ (ohne Injektionen

on der spezifischen Peptide) auf Metastasen in der Lunge und Lymphknoten untersucht. Alle Tiere, die Tumorzellen und ein Kontrollpeptid, das die drei kritischen Aminosäuren nicht enthielt, injiziert bekamen, entwickelten massive Metastasen in Lymphknoten und Lunge. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tiere, denen das spezifische Peptid injiziert worden war, weder Lymphknoten- noch Lungenmetastasen (Tab. 1). Interessanterweise war das Wachstum des Primärtumors von dem Peptid nicht beeinflusst. Dieses Peptid stellt damit ein selektives Mittel dar, Metastasenbildung zu unterdrücken und ist somit eine neue Möglichkeit, ein Therapeutikum zu entwickeln. Generell sind solche Peptide leicht und preiswert zu synthetisieren und über Modifika-

tionen kann man deren Stabilität und damit deren Verweildauer im Organismus beeinflussen. Durch solche Veränderungen lassen sich möglicherweise auch Nebenwirkungen minimieren oder gar ausschalten. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass im Tierexperiment in Ratten keinerlei Nebenwirkungen bei der Behandlung mit dem Peptid zu beobachten waren.

Für die meisten Experimente, die wir zur Identifizierung des Wirkmechanismus von CD44 v6 als Korezeptor für den Met-Rezeptor durchgeführt haben, verwendeten wir Zelllinien. Solche Zelllinien sind in den meisten Fällen transformierte Zellen, die aus Tumoren stammen oder in vitro zu Tumorzellen verändert wurden. Solche Zellen sind viel leichter zu hand-

	Tumorvolumen [mm ³]	Relative LN-Zunahme	Zahl der Lungenmetastasen
weiblich 1	1071	1,76	43
weiblich 2	3588	1,97	15
männlich 1	6400	2,50	29
männlich 2	34020	2,04	> 50
weiblich 3	3800	1	1
weiblich 4	3348	1	0
männlich 3	32938	1	0
männlich 4	1368	1	0

Tab. 1: Metastasierungstest. Tumorzellen aus Rattenpankreas mit hohem Metastasierungspotenzial wurden in syngene Ratten unter die Haut appliziert. Nach Anwachsen des Tumors wurden in den Tumor entweder Kontrollpeptide (Tiere 1 und 2) oder CD44-v6-spezifische Peptide (Tiere 3 und 4) drei Mal wöchentlich gespritzt. Bei Erreichen des moribunden Stadiums der Tiere 1 und 2 wurden alle Tiere getötet und die relative Zunahme des Gewichtes des dem Tumor benachbarten Lymphknoten (LN) und die Zahl der Lungenmetastasen ermittelt.

haben als primäre Zellen und haben eine unbegrenzte Lebensdauer. Es erhebt sich aber sofort die Frage, ob die Ergebnisse, die wir mit solchen Zellen erzielen, auch relevant für normale Zellen oder gar für Zellen im lebenden Organismus sind. Diese Frage stellt sich nicht, wenn man nach Mechanismen in Tumorzellen oder gar, wie oben dargestellt, in metastasierenden Tumorzellen sucht. Umgekehrt sind in vielen Fällen solche Mechanismen nicht nur tumorspezifisch sondern sind oft wichtig in spezifischen Entwicklungsstadien z. B. während der Embryogenese in vivo, im Tier. Dies trifft speziell auf den Met-Rezeptor zu, der während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier (und Mensch) in vielen Geweben vorkommt und vielfältige Funktionen erfüllt. Braucht der Met-Rezeptor auch in vivo CD44 v6 als Korezeptor? Wie weiter oben beschrieben, braucht der Met-Rezeptor auf Tumorzellen als eine Funktion von CD44 v6 die „Präsentation“ seines Liganden (es gibt noch weitere Funktionen von CD44 v6 in der Met-Aktivierung, nämlich intrazellulär für die Signalweiterleitung, auf die aber hier nicht weiter eingegangen wird. Der interessierte Leser sei auf die Publikationen [4] und [5] verwiesen). Es ist unwahrscheinlich, dass der Met-Rezeptor in vivo ganz neue Wege seiner Aktivierung beschreitet. Aber wie kann man das nachweisen? Eine Möglichkeit besteht darin, das Gen in vivo zu inaktivieren. Über eine sehr aufwändige Technik wird an Stelle des normalen Gens ein Gen mit inaktivierenden Sequenzen in das Genom des Tieres (meistens einer Maus) eingesetzt, die die Übersetzung des Gens in ein Protein

unterdrückt. Mäuse haben, wie auch wir Menschen, in allen somatischen Zellen zwei Kopien eines Gens, man muss also beide Gene inaktivieren und erhält dann eine null-Maus für das entsprechende Gen. In einer solchen null-Maus untersucht man dann, ob Entwicklungs- oder Funktionsstörungen auftreten.

Wie erwartet traten in einer Met-null-Maus (und ebenso in einer Met-Liganden-null-Maus) massive Störungen in verschiedenen Geweben während der Embryogenese auf, die schließlich zum Tod der Tiere zwischen Tag 12 und 16 der Embryonalentwicklung führen. Die Embryogenese in der Maus dauert 19 Tage, die Met-null-Mutation ist also embryonal letal. Wenn für die Aktivierung des Met-Rezeptors in vivo ebenfalls CD44 v6 notwendig ist, sollte man erwarten, dass eine CD44-null-Maus ähnliche Entwicklungsstörungen wie die Met-null-Maus hat. Zu unserer großen Überraschung ist dies nicht der Fall. Solche CD44-null-Mäuse sind nicht in der Embryonalentwicklung beeinträchtigt und haben während ihres Lebens nur einige nicht lebenswichtige Defekte, hauptsächlich im Immunsystem. Bedeutet dieser Befund nun, dass in vivo keine Kooperation von Met mit CD44 v6 notwendig ist? Es gibt eine Reihe von Evidenzen, die diese Interpretation unwahrscheinlich machen, auf die hier der Einfachheit halber aber nicht eingegangen werden kann. Nur ein Hauptargument sei erläutert: Man kann Mäuse herstellen, in denen die Inaktivierung eines Gens nur in bestimmten Geweben, z. B. in der Haut stattfindet. Solche Mäuse gibt es auch für CD44. Im Unter-

schied zu der „totalen“ null-Maus hat eine solche Maus ausgeprägte Veränderungen in der Haut. Wie kann man erklären, dass eine totale null-Maus, in der ja auch kein CD44 in der Haut vorkommt, eine normale Haut entwickelt im Unterschied zu der hautspezifischen null-Maus? Eine mögliche Erklärung, die auch durch weitere Evidenzen erhärtet wird, ist folgende: Wenn CD44 vom Beginn der Embryonalentwicklung an fehlt, können seine Funktionen von anderen Proteinen übernommen werden. Wenn allerdings die Embryonalentwicklung weiter fortgeschritten ist und erst zu diesem späteren Zeitpunkt das Gen von CD44 inaktiviert wird, kann keine Substitution der Funktion mehr stattfinden. Dies ist der Fall bei der Inaktivierung in der Haut. Diese Inaktivierung erfolgt erst in der Mitte der Embryonalentwicklung, am Tag 10 nach Befruchtung und daher prägt sich der Verlust von CD44 in diesen Mäusen in der Haut aus.

Wir gehen mehrere Wege um diese Hypothese, die weitreichende Konsequenzen für das Verständnis der Plastizität unseres Genoms hat, zu beweisen. Ein Weg ist die Identifizierung einer Substituten für die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für Met in der CD44-totalen null-Maus. Obwohl es kein direkt verwandtes Gen zu CD44 im menschlichen oder murinen Genom gibt, kennen wir eine Reihe von Proteinen, die zum Teil überlappende Funktionen zu CD44 ausüben könnten. Während ihrer Doktorarbeit hat Frau Vivienne Olaku einen Kandidaten für diese Substitution gefunden, der nun in den CD44-null-Mäusen als Substituent geprüft wird. Ein anderer Weg,

den Herr Thor Kastilan während seiner Doktorarbeit beschriften hat, ist die Herstellung einer so genannten „gefloxten“ Maus. Eine solche Maus trägt an Stelle des normalen Gens ein Gen, bei dem essentielle Abschnitte von zwei „loxP“-Sequenzen (daher „gefloxte“) flankiert sind. loxP sind kurze DNS-Sequenzen, die von einem Enzym erkannt werden können, das dann

das Ausschneiden der dazwischen liegenden DNA-Abschnitte bewirkt. Dadurch wird das Gen inaktiviert. Durch Aktivierung dieses Enzyms zu verschiedenen Zeiten während der Embryonalentwicklung oder spezifisch in verschiedenen Geweben, kann damit vom Experimentator beliebig die Geninaktivierung gesteuert werden. Herrn Kastilan sind die ersten entschei-

denden Schritte zur Herstellung einer solchen CD44-gefloxten Maus gelungen, und wir hoffen, in naher Zukunft unsere Hypothese der Substitution von CD44-Funktionen während der frühen Embryonalentwicklung und die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für den Met-Rezeptor in vivo beweisen zu können.

Literatur

- [1] B.M. Tjink, J. Buter, R. de Bree, G. Giaccone, M.S. Lang, A. Staab, C.R. Leemans, G.A. van Dongen, (2006) *A phase I dose escalation study with anti-CD44 v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus*, *Clin Cancer Res* 12, 6064–6072
- [2] H. Ponta, V. Orian-Rousseau, L. Chen, H. Morrison, P. Herrlich, (2002) *Stop or Go – CD44 als Regulator essentieller zellulärer Entscheidungen*, *Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe* 34, 36–40
- [3] U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haußmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich, (1991) *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells*, *Cell* 65, 13–24
- [4] V. Orian-Rousseau, L. Chen, J.P. Sleeman, P. Herrlich, H. Ponta, (2002) *CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling*, *Genes Dev* 16, 3074–3086
- [5] V. Orian-Rousseau, H. Morrison, A. Matzke, T. Kastilan, G. Pace, P. Herrlich, H. Ponta, (2007) *Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44 v6 and F-Actin*, *Mol Biol Cell* 18, 76–83