
Stop or Go – CD44 als Regulator essentieller zellulärer Entscheidungen

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, L. Chen, H. Morrison, P. Herrlich, ITG

Ein Schalter: Ein/Aus – das ist uns geläufig. Das gibt es nicht nur bei technischen Geräten, sondern auch in menschlichen Zellen. Eine Immunantwort muss angestellt und später wieder abgestellt werden. Wir mobilisieren Glukose in der Leber, wenn wir Energie für einen Marathonlauf benötigen, und schalten die Freisetzung ab, wenn wir es endlich geschafft haben und uns von den Strapazen erholen. Aber es gibt bei technischen Geräten auch kompliziertere Schalter, denken wir an den Programmschalter bei Radio- oder Fernsehgeräten, der uns erlaubt, zwischen verschiedenen Programmen zu wählen. Wir haben einen solchen biologischen Schalter, der unterschiedliche genetische Programme ansteuert, identifiziert. Seine Funktion wird hier geschildert.

Es ist nun schon 15 Jahre her, dass uns der damalige Mitarbeiter des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, Prof. Siegfried Matzku, mit seinen Anstrengungen, metastatische Tumoreigenschaften zu identifizieren, konfrontierte. Daraus wurde eine Kollaboration und schließlich ein Projekt mit dem Ziel, Proteine zu identifizieren, die entscheidende Funktionen im Prozess der Metastasierung von Tumorzellen ausüben. Nach anfänglichen Fehlschlägen haben wir schließlich mit der Beschreibung eines der ersten metastasenspezifischen Proteinen mit dem Namen CD44v in der Metastasenforschung einen entscheidenden Durchbruch erzielt [1]. Ein Indikator für die Bedeutung von CD44 ist die Publikationsstätigkeit seit unserer Erst-Beschreibung, die exponentiell zugenommen hat und inzwischen bei mehr als 5.000 Artikeln liegt. Ein wesentlicher Grund für dieses breite Interesse liegt im Bedarf an geeigneten Metastasenmarkern, die für Diagnose und/oder Therapie eingesetzt werden können. Die ersten klinischen Studien zum Einsatz von Antikörpern, die spezifisch menschliche CD44v Proteine erkennen, laufen bereits seit einem Jahr und scheinen erfolgversprechend zu sein.

Eines unserer zentralen Ziele nach der Identifizierung von CD44v als metastasenspezifisches Protein war, seine Funktion in diesem Prozess zu verstehen. Dass dies ein schwieriges Unterfangen wurde, hängt mit drei Faktoren zusammen. Zum einen konnten wir aus der Primärsequenz, also der Abfolge von Aminosäuren, die das Protein aufbauen und die wir aus der Nukleotidsequenz ableiten konnten, keine Schlüsse auf seine Funktionen ziehen, etwa auf Grund ähnlicher Sequenzen mit Proteinen, deren Funktion man bereits kennt. Die Primärsequenz ließ lediglich den Schluss zu, dass es sich um ein Transmembranprotein handelt, mit einem intrazellulären, zytoplasmatischen Proteinanteil, einem Transmembranabschnitt und einem relativ großen extrazellulären Proteinanteil (Abb. 1). Zum anderen ist der Metastasierungsprozess äußerst komplex: Tumorzellen müssen aus dem Primärtumor absiedeln, durch Bindegewebe wandern, in Lymph- oder Blutgefäße eindringen, wieder auswandern und in neuem Gewebe überleben und wachsen. In all diesen Schritten,

die in der Summe nur im Tier nachvollzogen werden können, kann CD44v wichtig und entscheidend sein. Und schließlich ist CD44v die Umschreibung eines komplexen Tatbestandes. CD44v bezeichnet nämlich eine ganze Familie von Proteinen, die aus der Kombination von 10 Genabschnitten durch einen Prozess, den man „alternatives Spleißen“ bezeichnet, hervorgehen (siehe den Beitrag von Harald König). Nur einige der Proteine dieser CD44v Familie sind an der Metastasierung beteiligt, andere haben wahrscheinlich Funktionen in anderen physiologischen oder pathologischen Prozessen. Das bedeutet aber, dass unterschiedliche Funktionen durch die unterschiedlichen CD44v's ausgeübt werden. Da aber die meisten Tumorzellen mehrere CD44v's tragen, fällt die Analyse und Zuordnung schwer.

Ein entscheidender Durchbruch bezüglich der Funktion von CD44v gelang über die Kartierung von CD44v in normalem Gewebe. Die Lokalität suggerierte Funktionen. Als prominentestes Vorkommen von CD44v's fiel der Übergang von epitheliale zu mesenchymalem Gewebe ins Auge. Während der Embryonalentwicklung tragen zum Beispiel die Randleistenzellen im Gliedmaßenfeld CD44v. Die Funktion dieser Randleistenzellen (epitheliale Zellen) besteht darin, dass darunterliegende (mesenchymale) Zellen zur Vermehrung und damit zur Ausbildung einer Gliedmaßenknospe angeregt werden. Wenn man die Funktion von CD44v auf diesen Randleistenzellen (durch inhibierende Anti-

36

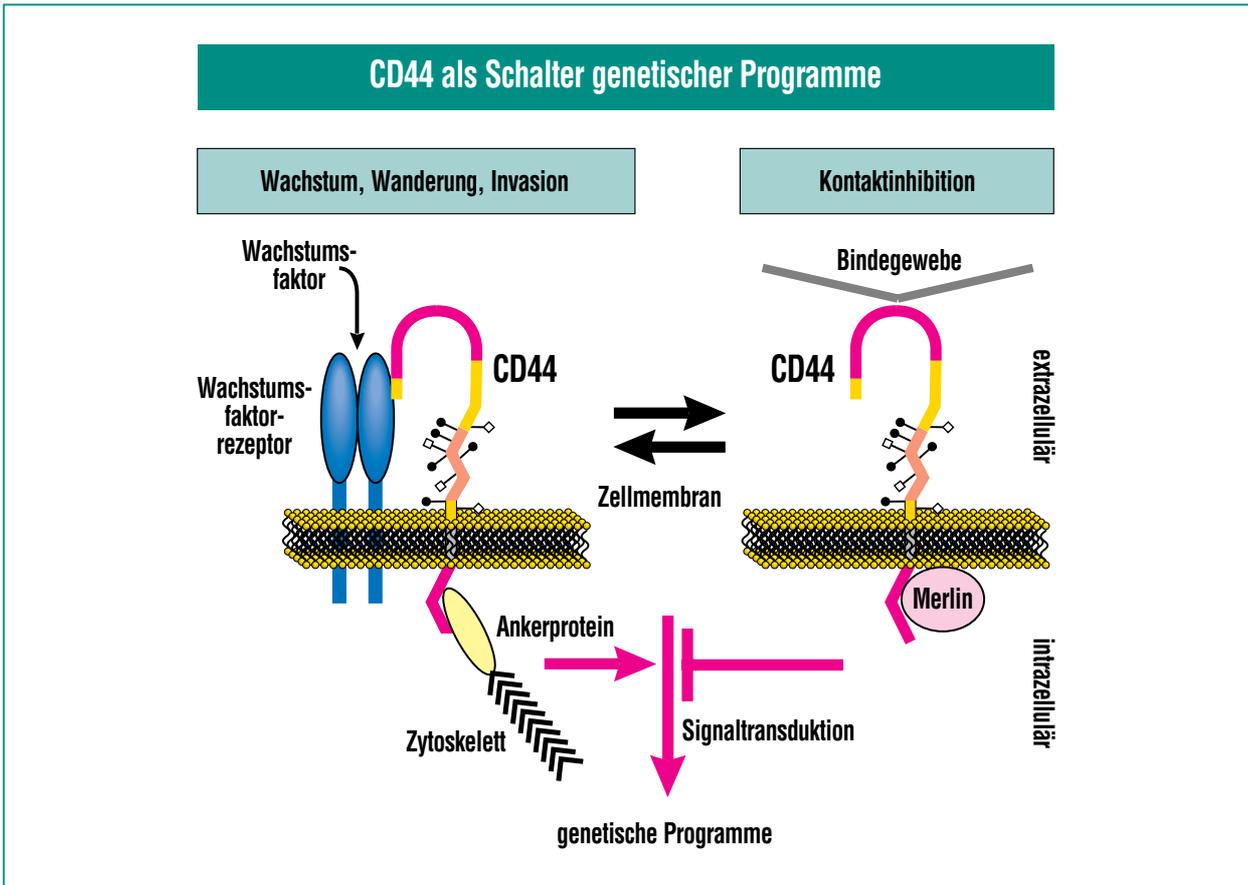


Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion von CD44 als Korezeptor und Vermittler von Kontaktinhibition. Das Bild zeigt einen Ausschnitt aus einer Zelle. Der Extrazellulärbereich ist vom Intrazellulärbereich (Zytoplasma) durch eine Zellmembran (Lipiddoppelschicht) getrennt. In der Zellmembran sind Transmembranproteine verankert. CD44 ist als buntes, ein Wachstumsfaktorrezeptor ist als blaues Transmembranprotein dargestellt. Die meisten Wachstumsfaktorrezeptoren kommen als Dimere vor. Die schwarzen „Seitenketten“ an CD44 symbolisieren Zuckerketten. Der linke Teil der Abbildung zeigt CD44 als Teil eines ternären Komplexes, der zur Aktivierung von Signalketten führt. Die Signalketten gehen vom Wachstumsfaktorrezeptor aus (sie sind nicht gezeigt). Die Aktivierung der Signalketten setzt Bindung eines „Ankerproteins“ an CD44 voraus, das das Zytoskelett (Aktinfilamente) an die Membran verankert. Der rechte Teil zeigt den Konformationszustand von CD44 (der Übergang ist durch die schwarzen Pfeile dargestellt), der nach Bindung einer Bindegewebssubstanz zur Rekrutierung von Merlin führt. Merlin unterbindet Signaltransduktion, weshalb die genetischen Programme für Zellvermehrung, Wanderung und Invasion nicht aktualisiert werden können.

körper) inaktiviert, können sich die mesenchymalen Zellen nicht mehr vermehren. In aufwendigen Experimenten, in denen wir diesen Wachstumsstimulus im Reagenzglas nachgestellt und so der Manipulation und Analyse zu-

gänglich gemacht haben, konnten wir die Funktion von CD44v in diesem Prozess entschlüsseln: Die mesenchymalen Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen Wachstumsfaktorrezeptor, der über die Bindung eines Wachs-

tumsfaktors aktiviert werden muss, damit es zur Zellvermehrung kommt. Dieser Wachstumsfaktor wird von den Randleistenzellen produziert. Er kann nun aber nicht direkt an seinen Rezeptor binden, sondern benötigt

die Hilfe eines zweiten Proteins, CD44v, das ihn dem Rezeptor in geeigneter Form anbietet. Auch die molekularen Details dieser Ko-Rezeptorfunktion wurden von uns aufgedeckt [2]. Es ist eine spezifische Modifikation von CD44v durch Zuckerseitenketten (Heparansulfat), die eine entscheidende Rolle spielt. Damit war es das erste Mal gelungen, den Beitrag eines CD44v Proteins zum Mechanismus eines physiologischen Prozesses funktionell zu verstehen.

Dieser Erfolg legte die Überlegung nahe, dass CD44v vielleicht auch auf metastasierenden Tumorzellen eine ähnliche Ko-Rezeptorfunktion erfüllen könnte. Natürlich sind die Gegebenheiten auf Tumorzellen gänzlich andere als im Gliedmaßenfeld. Der Rezeptor und sein Ko-Rezeptor (CD44v) müssten auf der gleichen Zelle vorkommen. Außerdem sind die CD44v-Proteine, die in der Metastasierung wichtig sind, andere als diejenigen, die auf den Randleistenzellen vorkommen. Andererseits gibt es viele unterschiedliche Wachstumsfaktorrezeptoren (und entsprechend Wachstumsfaktoren), deren Aktivität durchaus durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden könnte. Ein Rezeptor an der Oberfläche, der Zellwanderung, Invasivität, Vermehrung beeinflusst, könnte der richtige Kandidat für die Wirkweise von CD44v sein. Aus Daten eines U.S. Labors (van der Woude) und des Max Delbrück Zentrums in Berlin (Carmen Birchmeier) ist ein solcher Rezeptor plausibel: cMet. cMet kommt einerseits auf den metastasierenden Tumorzellen,

auf denen wir ursprünglich CD44v identifiziert hatten, vor und wird andererseits auf Dickdarmtumoren vermehrt produziert, für die das Auftreten von CD44v ein Indikator für aggressives Wachstum und Metastasierung ist. Für eine humane Dickdarmzelllinie war ein Beitrag von CD44v zur Metastasierung von einer anderen Arbeitsgruppe dokumentiert worden.

Tatsächlich war in beiden Zelllinien die Aktivierung des cMet-Rezeptors völlig von der Präsenz von CD44v abhängig. Der Mechanismus, wie CD44v in die cMet-Aktivierung eingreift, unterscheidet sich allerdings wesentlich von demjenigen der Gliedmaßenentwicklung. Auf den Tumorzellen ist es ein CD44v, das nicht durch Heparansulfat modifiziert ist und es findet keine Präsentation von Zelle zu Zelle statt. Vielmehr bildet CD44v mit cMet und seinem Liganden einen ternären Komplex, über den erst die Aktivierung des cMet-Rezeptors erfolgen kann. Wie sich dieser Komplex bildet und welche Proteinteile von CD44v und des cMet-Rezeptors und seines Liganden genau für die Ausbildung des Komplexes benötigt werden, ist Teil unserer gegenwärtigen Untersuchungen. Diese Untersuchungen sind auch von direkter praktischer Relevanz, weil man aus dem Wissen die genaue Interaktion mit niedermolekulare Moleküle ableiten kann, die diese Interaktion verhindern und so vielleicht die Metastasierung blockieren können.

Es genügt natürlich nicht, dass ein Wachstumsfaktorrezeptor an der Zelloberfläche aktiviert wird,

damit die Zelle sich vermehrt oder Wanderung und Invasion ausgelöst wird. Vielmehr muss das Signal – Aktivierung des Rezeptors – in den Zellkern gelangen, wo das genetische Programm auf Vermehrung etc. umgeschaltet wird. Diese „Signaltransduktion“ erfolgt über eine Reihe von intrazellulären Proteinen, die ein Netzwerk von Verschaltungen bildet. Eine Komponente nach der anderen wird aktiviert (in den meisten Fällen durch Modifikation durch Phosphorylierung). Am Ende des Netzwerks wird ein Kernprotein aktiviert, das je nach Rezeptor die Regulation von Genen steuert, welche Zellbeweglichkeit, Wanderung, Invasivität oder Vermehrung bewirken. Die Signaltransduktionskaskade, ausgehend vom aktivierten cMet-Rezeptor, ist gut bekannt. Welche Rolle spielt dabei CD44v? Für die cMet-Aktivierung genügte eine CD44v-Mutante, welche nur die extrazellulär-liegende Domäne enthält. Ein solches Protein reicht aus, um den ternären Komplex zu bilden. Eine Überraschung erlebten wir, als wir die vom aktivierten cMet-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade untersuchten. In der durch die CD44v-Mutante ausgelösten cMet-Rezeptor-Aktivierung brach die Signalweiterleitung ab und das Signal gelangte nicht in den Kern. Dies bedeutet, dass CD44v noch eine zweite Rolle in der cMet-Signalkette spielt, für die der intrazelluläre Teil von CD44v benötigt wird. Wir nehmen an – und testen dies –, dass an die intrazelluläre Domäne von CD44v ein Protein binden muss, über das dann die Signalkaskade läuft. Ein wahrscheinlicher Kandidat ist

ein Protein, das das Zytoskelett der Zelle an der Zellmembran über Bindung an Transmembranproteine wie CD44 verankert (Abb.1). Eine Mutante von CD44v, in der diese Bindefähigkeit gestört ist, kann ebenfalls das Signal nicht weiterreichen, wie die Mutante ohne intrazelluläre Domäne, ein Indiz, dass die Bindung des „Ankerproteins“ entscheidend für die Signalweiterleitung ist.

Die Ko-Rezeptorfunktion von CD44v für Wachstumsfaktorrezeptoren wie cMet, die Zellwanderung und Invasivität vermitteln, könnte eine gute Erklärung bieten, warum CD44v auf metastasierenden Tumorzellen vorkommt. Interessanterweise gibt es aber Tumore, z. B. Neuroblastome, Prostatakarzinome, einige Lymphome, in denen CD44 die genau gegenteilige Rolle zu spielen scheint: Diese Tumore entwickeln sich nur, wenn CD44 nicht auf den Zellen vorkommt. Man bezeichnet solche Gene, deren Genprodukte (Proteine) auf Tumoren abwesend sein müssen, damit sich der Tumor entwickelt, als Tumorsuppressorgene. In einer menschlichen Erbkrankheit namens Neurofibromatose Typ II (NFII) kommt es bei den betroffenen Patienten zum Auftreten von Tumoren des Nervensystems, überwiegend sogenannte „Schwannome“. In diesen Tumoren ist das Tumorsuppressorgen Merlin nicht mehr aktiv (siehe oben). Folgerichtig führt die Aktivierung von Merlin in diesen Tumorzellen zur Unterdrückung der Krebsbildung. Die Verbindung zu CD44 besteht nun darin, dass Merlin, ähnlich dem

„Ankerprotein“, an Transmembranproteine binden kann. Wir untersuchten zwei Fragen: 1. Kann Merlin auch an CD44 binden? 2. Wenn ja, ist diese Bindung für die tumorsuppressive Wirkung von Merlin wichtig? Das Bild, das diese Untersuchungen lieferten, ist folgendes [3]: Merlin kann tatsächlich, ähnlich dem „Ankerprotein“, an CD44 binden, allerdings nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen, nämlich dann, wenn die Zellen „ausreichend dicht“ in Kultur gewachsen sind. Dann werden Phosphatmodifikationen am Protein entfernt, Merlin bindet an CD44 und unterbricht die Signaltransduktion in der Zelle. Als Konsequenz wird das genetische Programm der Zelle zur Vermehrung nicht aktiv und die Zelle stoppt ihr Wachstum. Diesen Prozess bezeichnet man als Kontaktinhibition – ein Vorgang, dem Krebszellen nicht mehr unterliegen, sie können „unkontrolliert“ wachsen. Woher „wissen“ die Zellen, dass sie dicht gewachsen sind (im Tier ist dies wahrscheinlich das Erkennen von Gewebegrenzen)? Auch hier spielt CD44 die entscheidende Rolle. Eine Komponente, die an den extrazellulären Teil von CD44 binden kann, ist eine Bindegewebssubstanz. Die Konzentration dieser Substanz, die von den Zellen selbst produziert wird, ist entscheidend. Ist diese Konzentration hoch genug (bei hoher Zelldichte), besetzt diese Substanz alle CD44-Proteine, die Bindung führt zu Konformationsänderung von CD44, in der Folge zur Bindung von Merlin etc., siehe oben. Über diesen Mechanismus könn-

te CD44 als Tumorsuppressor wirken.

Wenn Merlin in Zellen nicht produziert wird (z.B. in NFII-Patienten), dann ist klar, dass Kontaktinhibition nicht funktioniert und die Zellen zu Tumorzellen entarten können. In vielen Tumorzellen wird aber Merlin produziert, trotzdem unterliegen sie nicht der Kontaktinhibition und sind transformiert. Warum? Eine Erklärung könnte darin liegen, dass in normalen Zellen bei Erreichen von „dichtem Wachstum“ Merlin nicht nur über Bindung an CD44 aktiviert wird, sondern auch die Mengen an Merlin in der Zelle um das Drei- bis Vierfache ansteigt. In Tumorzellen bleibt die Merlinkonzentration immer auf niedrigem Niveau. Zu verstehen, wie diese Mengenregulation von Merlin erfolgt, könnte ein Schlüssel dafür sein, die tumorsuppressive Wirkung von Merlin in Tumorzellen zu aktivieren und dadurch deren Wachstum zu hemmen.

Jüngste Untersuchungen einer amerikanischen Arbeitsgruppe (McClatchey) zeigen, dass Merlin nicht nur entscheidend für die Krebsentstehung, sondern auch für die Bildung von Metastasen ist. In Mäusen, in denen das NF2-Gen verändert ist und die kein Merlin bilden können, entwickeln sich nicht nur mehr Tumore, sondern diese Tumore wachsen wesentlich aggressiver und bilden vermehrt Metastasen. In diesem Sinne könnte Merlin im Zusammenwirken mit CD44 als „Metastasensuppressor“ wirken.

CD44 kontrolliert also gegensätzliche Prozesse in der Zelle (Abb. 1). Einerseits Vermehrung, Wan-

derung und Invasivität der Zellen (was zum Beispiel während der Embryogenese oder während der Wundheilung wichtig ist), als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren. Andererseits Vermehrungsstopp und Wanderungsarrest (wenn Gewebegrenzen erreicht sind oder Zellen in vitro dicht genug gewachsen sind)

durch Bindung einer Bindegewebssubstanz und Rekrutierung von Merlin. Wenn einer der Mechanismen aus dem Lot gerät, kann es zur Tumorentstehung und Metastasierung kommen. Die molekularen Details dieser beiden Prozesse werden uns zeigen, an welchen Stellen in transformierten Zellen am einfachsten

Umpolung zur „Normalität“ in einer Tumorzelle erreicht werden kann und so das Tumorwachstum und Absiedlung von Metastasen gehemmt oder sogar unterbunden werden kann.

Literatur

- [1] U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haußmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich, *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 65, 13-24 (1991).*
- [2] L. Sherman, D. Wainwright, H. Ponta, P. Herrlich, *A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. Genes Dev. 12, 1058-1071 (1998).*
- [3] H. Morrison, L. S. Sherman, J. Legg, F. Banine, C. Isacke, C. A. Haipek, D. H. Gutmann, H. Ponta, P. Herrlich, *The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. Genes Dev 15, 968-80 (2001).*