

Die Rolle der CD44-Hyaluronan-Interaktion für die Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms: ein potenziell therapeutischer Ansatz

Antragsteller:

Name: PD. Dr. med. Elena Laakmann
Dienststellung: Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe
Institution: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut: Klinik und Poliklinik für Gynäkologie
Adresse: Martinistr. 52, 20246 Hamburg
Telefonnummer: +49 (0) 152-22827361
E-mail: e.laakmann@uke.de

Name: Prof. Dr.rer.nat Leticia Oliveira-Ferrer
Position: Laborleitung
Institution: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut: Klinik und Poliklinik für Gynäkologie - Forschungslabor N61; R306
Adresse: Martinistr. 52, 20246 Hamburg
Telefonnummer: +49 (0) 40-7410 52559
Faxnummer: +49 (0) 40-7410 54103
E-mail: ferrer@uke.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Ziele des Projektes	3
2.	Methoden & Ergebnisse	3
3.	Zusammenfassung & Auswirkung der Projektergebnisse	8

1. Ziele des Projektes

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Relevanz der CD44-Hyaluronan (HA) Interaktion für die Entwicklung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom analysiert, sowie die Eignung als therapeutisches Ziel geprüft werden. Es soll getestet werden, ob eine Herunterregulation von CD44 in MDA-MB-231-BR Zellen zu einem verminderten HA-Stoffwechsel und einem verringerten perizellulären HA-Mantel führt. Die Funktionalität dieser CD44-HA Interaktion soll speziell auf die Adhäsion an Hirnendothelzellen, die Migration durch das Hirnendothel sowie den Einfluss auf die Integrität der BHS hin untersucht werden, sowie im weiteren Verlauf in einem *in vivo* Maus-Model bestätigt werden.

2. Methoden & Ergebnisse

1. Stabiler CD44 Knockdown in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231-BR

Es wurde zunächst ein CD44 Knockdown (shCD44) in der MDA-MB-231-BR Zelllinie sowie eine entsprechende MDA-MB-231-BR Kontrollzelllinie (scramble) hergestellt. Der Erfolg der Herunterregulation von CD44 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot (Abbildung 1A) und Durchflusszytometrie (Abbildung 1B), sowie auf mRNA-Ebene mittels PCR (Abbildung 1C) bestätigt.

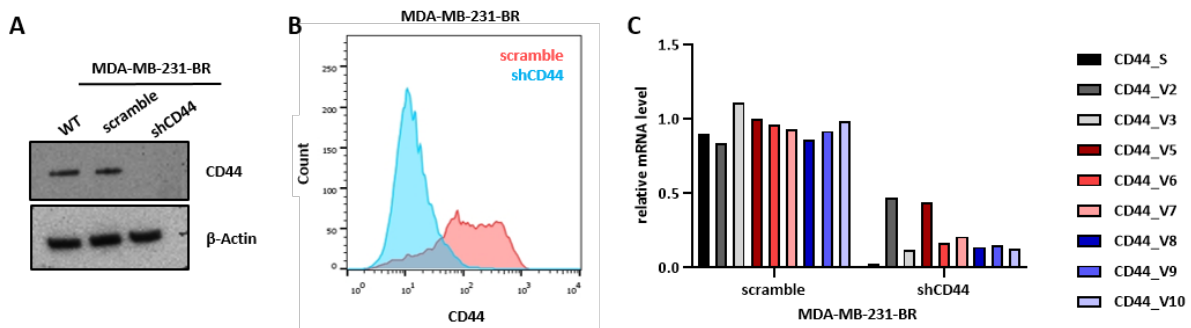


Abbildung 1: Bestätigung des CD44 Knockdowns in MDA-MB-231-BR Zellen

(A) Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten (20 µg) von MDA-MB-231-BR Kontrollzellen (Scramble) und CD44 Knockdown Zellen (shCD44) zeigt die Expression des HA-Rezeptors CD44. β-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) Histogramm mit der quantifizierten Menge an CD44, gemessen mittels Durchflusszytometrie. (C) Relative CD44 mRNA-Expression von CD44-Standard (CD44_S) und variablen Exons (CD44_V1-10) in MDA-MB-231-BR-Kontrollzellen (scramble) und CD44 Knockdown Zellen (shCD44), gemessen mittels qRT-PCR. Die Werte sind auf die entsprechende GAPDH-Expression normiert.

Sowohl die Western Blot als auch die Durchflusszytometrie Analysen zeigen eine Herunterregulation der CD44 Expression in den MDA-MB-231-BR shCD44 Zellen. Die PCR Analysen zeigen zusätzlich eine Herunterregulation des mRNA-Expressionslevels der CD44 Standardvariante (CD44_S), sowie aller möglichen Splicevarianten von CD44 (CD44_V2-V10) in den Knockdown Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (scramble).

2. Einfluss des CD44 Knockdowns auf die HA Expression

Der Einfluss des CD44 Knockdowns auf den Hyaluronsäure-Metabolismus, insbesondere auf die Menge an synthetisierter Hyaluronsäure, wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Abbildung 2A) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein CD44 Knockdown in den MDA-MB-231-BR Zellen zu keiner veränderten Menge an low-molecular-weight HA (LMW-HA) führt. Die Menge an Hyaluronsäure an der Zelloberfläche wurde mit Hilfe eines biotinylierten Hyaluronsäure-Bindeproteins immunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 2B), sowie in der Durchflusszytometrie (Abbildung 2C) quantifiziert. In diesen Analysen ist eine Reduktion des perizellulären HA-Mantels, bedingt durch den CD44 Knockdown, sowohl makroskopisch als auch quantitativ nachweisbar.

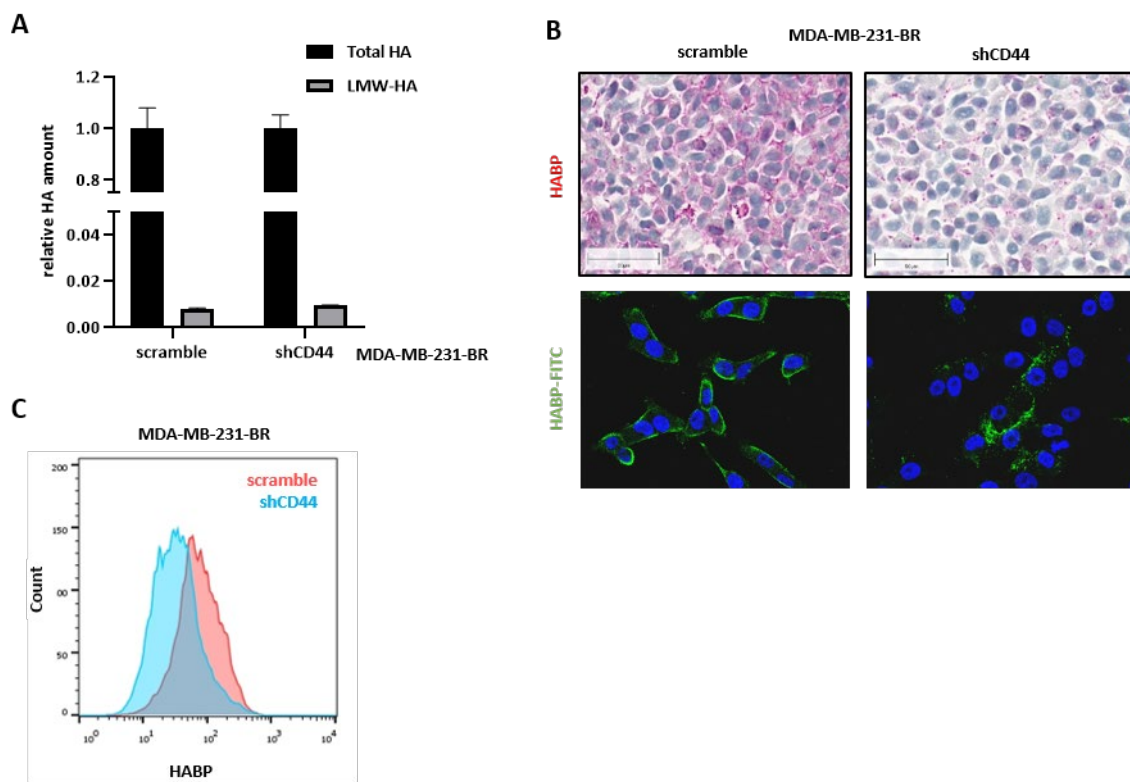


Abbildung 2: Einfluss des CD44 Knockdowns auf die HA Expression

(A) Balkendiagramm mit ELISA-Ergebnissen zum Gehalt an sezerniertem Gesamt-HA und LMW-HA (ng/10⁶ Zellen) von MDA-MB-231-BR Kontrollzellen (scramble) und CD44 Knockdown Zellen (shCD44). Der Zellüberstand wurde gesammelt und für den ELISA verwendet (Repräsentativer Versuch, n=3). (B) Immunhistochemische Färbung von Zellen in Agar für HA unter Verwendung von biotinyliertem HA-Bindungsprotein, Skala entspricht 50 µm. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (DAPI, blau) und HA (FITC, grün) unter Verwendung von biotinyliertem HABP und FITC-konjugiertem Streptavidin, Vergrößerung 60x (C) Histogramm, das die mittels Durchflusszytometrie gemessene Menge an Oberflächen-HA zeigt. Die Werte sind Mittelwerte ± s.d. *p<0,05, **p<0,005

3. Statische Adhäsionsassays an Hirndothelzellen

Abbildung 3 zeigt den Einfluss des CD44 Knockdowns auf die Adhäsion an das Hirndothel *in vitro*. Durch die Herunterregulation von CD44 in MDA-MB-231-BR Zellen kommt es im Vergleich zu den Kontrollzellen (scramble) zu einer signifikant reduzierten Adhäsionsfähigkeit an das Hirndothel.

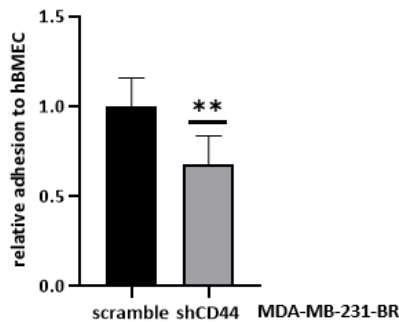


Abbildung 3: Einfluss des CD44 Knockdowns auf die Adhäsion an das Hirnendothel

Die Adhäsionsfähigkeit von MDA-MB-231-BR-Kontrollzellen (scramble) und CD44 Knockdown Zellen (shCD44) an primäre humane Hirnendothelzellen (hBMECs) wurde unter statischen Bedingungen analysiert. Dargestellt ist die relative Menge (zu scramble = 1) der adhäsiven Zellen (n=3). Die Werte sind Mittelwerte \pm s.d. *p<0,05, **p<0,005

4. Migrationsassays durch das Hirnendothel

Abbildung 4 zeigt den Einfluss des CD44 Knockdowns in MDA-MB-231-BR Zellen auf die Invasion durch das Hirnendothel *in vitro*. Neben der Adhäsion kommt es im Vergleich zu den Kontrollzellen (scramble) ebenfalls zu einer signifikant reduzierten Invasion der CD44 Knockdown Zellen durch das Hirnendothel.

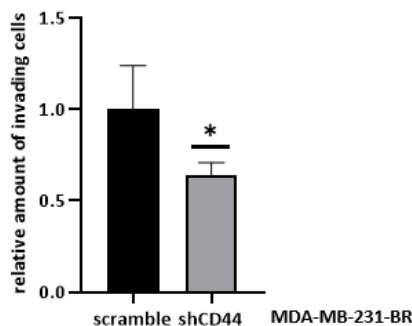


Abbildung 4: Einfluss des CD44 Knockdowns auf die Invasion durch das Hirnendothel

Invasionspotenzial von MDA-MB-231-BR Kontrollzellen (scramble) und CD44 Knockdown Zellen (shCD44) durch hBMECs, gemessen in einem Transwell-Assay (n=3). Die Werte sind Mittelwerte \pm s.d. *p<0,05, **p<0,005

5. Interaktion mit der Bluthirnschranke

Der Einfluss auf die Integrität der Bluthirnschranke (BHS) wird durch die Messung des Transendothelialen Widerstandes (TEER) analysiert. Der Widerstand wurde bei einer Frequenz von 4kHz, welche die Barrierefunktion widerspiegelt, gemessen. Ein sinkender R-Wert entspricht dabei einem Verlust der BHS-Integrität. Abbildung 5A zeigt einen repräsentativen Verlauf eines Versuches. Nach Zugabe der Tumorzellen (Zeitpunkt = 0h) kommt es im Falle der Kontrollzellen (scramble) zu einem Abfall des Resistenzwertes und somit zu einem Verlust der BHS-Integrität. Die CD44 knockdown Zellen (shCD44) hingegen können den Resistenzwert nicht senken und haben demnach keinen

messbaren Einfluss auf die BHS-Integrität. Dieser unterschiedliche Effekt zwischen CD44 knockdown und Kontrollzellen ist statistisch signifikant (Abbildung 5B, n=3).

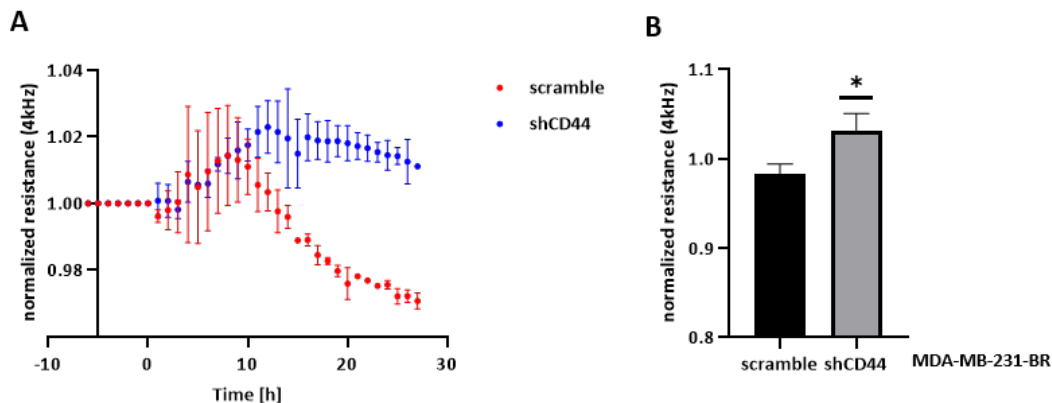


Abbildung 5: Einfluss des CD44 Knockdowns auf die Integrität der Blut-Hirn Schranke *in vitro*

(A) Normalisierter Widerstand bei 4 kHz (Werte wurden als 1 vor der Behandlung gesetzt; repräsentatives Experiment; n=3)

(B) Balkendiagramme, die die relativen Widerstandswerte bei 4 kHz unter dem Einfluss verschiedener Tumorzellen anzeigen (n=3). Die Werte sind Mittelwerte ± s.d. *p<0,05, **p<0,005

6. *In vivo* Hirnmetastasierungs-Modell

Ein Mausmodell für die Entwicklung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom mittels intrakardialer Injektion war in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert. Eine beispielhafte Darstellung zur Detektion der Tumorzellen in der Maus ist in Abbildung 6 gezeigt. Das Signalmuster gibt dabei Auskunft über den Ort der Tumorzellausbreitung, wohingegen die Signalstärke der gemessenen Biolumineszenz einen Hinweis bezüglich der Tumorlast in den unterschiedlichen Organen gibt.

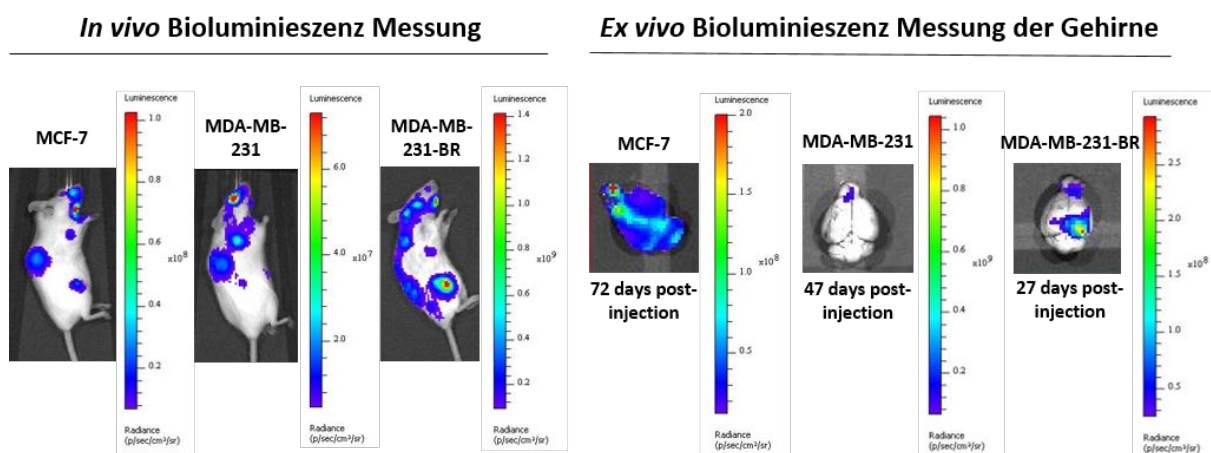


Abbildung 6: Biolumineszenz Messungen eines intrakardialen Mausmodells für die Entwicklung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom

Repräsentative *in vivo* und *ex vivo* (Gehirn) Biolumineszenz-Bilder von verschiedene Testgruppen, injiziert mit MaCa Zelllinien von unterschiedlichem molekularen Subtyp (MCF-7, MDA-MD-231, MDA-MB-231-BR)

Eine beispielhafte Darstellung zur Detektion der Tumorzellen in der Maus ist in Abbildung 6 gezeigt. Das Signalmuster gibt dabei Auskunft über den Ort der Tumorzellausbreitung, wohingegen die Signalstärke der gemessenen Biolumineszenz einen Hinweis bezüglich der Tumorlast in den unterschiedlichen Organen gibt.

In diesem Zusammenhang wurden MDA-MB-231-BR CD44 knockdown und Kontrollzellen (jeweils 1×10^6 Zellen) intrakardial in den linken Ventrikel von ca. 6 Wochen alten weiblichen SCID Mäusen (jeweils $n=10$) injiziert. Um die Metastasenausbreitung in den Mäusen zu beobachten und die Tumorlast ex vivo mittels Biolumineszenz zu quantifizieren, wurden die Zelllinien zuvor mit dem Luciferase-Gen transduziert. Aufgrund der Komplexität des intrakardialen Injektionsschrittes mussten mehrere Mäuse aus dem Experiment entfernt werden, wodurch sich die Anzahl der untersuchenden Mäuse in beiden Versuchsgruppen ($n=6$) reduzierte.

Hinsichtlich der Entwicklung von Hirnmetastasen war das beschriebene intrakardiale Mausmodell in beiden Gruppen erfolgreich. Abbildung 7A zeigt die Quantifizierung der ex vivo Biolumineszenz-Signale in Gehirn und Lunge. Es zeigt sich eine leichte Tendenz in der Auswertung der Metastasierung im Gehirn in die Richtung, dass die Zellen mit CD44 knock-down weniger Metastasen bilden als die Kontrollzellen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In der Lunge konnte kein Unterschied beobachtet werden. Die Quantifizierung der Metastasen mittels ALU-PCR bestätigte diese Ergebnisse nicht. Wie in Abbildung 7B zu sehen ist, gibt es keinen Unterschied zwischen der Anzahl der Tumorzellen (DTC: disseminated tumor cells) im Gehirn und in der Lunge.,

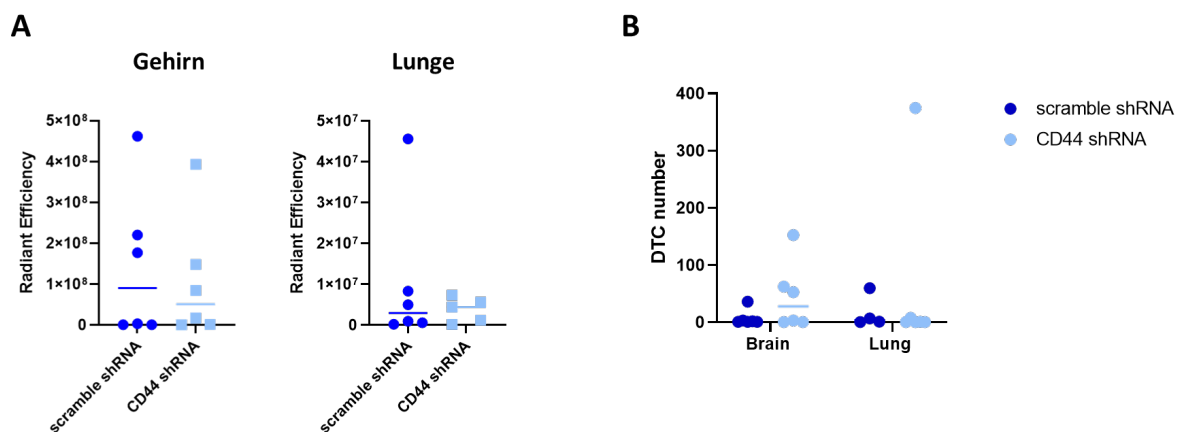


Abbildung 7: Auswertung der Hirn- und Lungenmetastasierung im intrakardialen Mausmodell mit MDA-MB-231-BR CD44 Knockdown und den Kontrollzellen. (A) Auswertung der Biolumineszenzsignale ex vivo und (B) Auswertung der Metastasenlast mittels ALU-PCR.

3. Zusammenfassung und Auswirkung der Projektergebnisse:

Eine Reduktion der CD44-Expression in der triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-BR führt zu einer signifikanten Reduktion der perizellulären Hyaluronan-Schicht auf diesen Zellen und damit zu einer verminderten Adhäsion und Invasion von Tumorzellen durch das Hirnendothel. Daher könnte die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und insbesondere den Hyal-1-generierten LMW-HA-Fragmenten und dem HA-Rezeptor CD44 ein potenzieller Angriffspunkt für zukünftige Therapieoptionen bei Brustkrebspatientinnen mit hohem Risiko für die Entwicklung von Hirnmetastasen sein. Die Ergebnisse der in vitro Analysen dieses Projektes wurden in der Publikation über die Rolle des CD44-Liganden Hyaluronsäure: *Key Role of Hyaluronan Metabolism for the Development of Brain Metastases in Triple-Negative Breast Cancer*, von Hamester et al. (DOI: 10.3390/cells11203275), veröffentlicht.

Aufgrund der negativen Ergebnisse im anschließenden in vivo Modell wurde ein ursprünglich geplanter weiterführender Projektantrag mit CD-44 als therapeutischem Ziel nicht weiterverfolgt. Allerdings wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Windhorst (Biochemie, UKE) ein Projektantrag bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) eingereicht, der sich mit den genaueren Mechanismen der Hyaluronsäure-assozierten Hirnmetastasierung beim Mammakarzinom beschäftigt. In diesem Projekt wird u.a. die Rolle von CD44 bei der Hyal-1- bzw. Hyaluronsäure-vermittelten Hirnmetastasierung weiter untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeiten sehr interessante Erkenntnisse gewonnen werden konnten, die erfolgreich publiziert wurden und darüber hinaus die Grundlage für weitere spannende Projekte bilden.