

Tobias Tix
Dr. med.

A novel mass spectrometry-based approach reveals constitutive AXL receptor turnover by ectodomain shedding as a possible mechanism to prevent cell transformation.

Fach/Einrichtung: Innere Medizin/DKFZ
Doktorvater: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow

Der AXL-Rezeptor ist eine Rezeptortyrosinkinase, die nach Aktivierung durch den Liganden GAS6, unter anderem durch die Aktivierung der ERK- und AKT-Signalwege, verschiedene zelluläre Prozesse wie Überleben, Proliferation und Motilität fördert. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression des AXL-Rezeptors in verschiedenen Krebsarten mit einem schnelleren Erkrankungsprogress, einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Therapieresistenz assoziiert ist. Die Inhibition dieses Rezeptors stellt daher eine potentielle Strategie zur Behandlung von Krebspatienten dar und ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Der AXL-Inhibitor Bemcentinib (R428, BGB324) wird beispielsweise im Rahmen einer klinischen Studie an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und myelodysplastischem Syndrom getestet. Besonders interessant ist weiterhin, dass der lösliche AXL-Rezeptor, der bei Spaltung durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 – dem sogenannten Shedding – entsteht, einen vielversprechenden Biomarker für das Abschätzen von Prognose und Therapieansprechen von Krebspatienten darstellt.

Abhängig von der Wahl der untersuchten Zelllinien, der GAS6-Dosis und der zeitlichen Messpunkte zeigt der AXL-Rezeptor unterschiedliche Aktivierungskinetiken. Es mangelt jedoch an systematischen, quantitativen sowie bezüglich Zeit und Dosis hochaufgelösten Untersuchungen der GAS6-vermittelten Aktivierung des AXL-Rezeptors und dessen Signalweiterleitung. Auch der Einfluss der AXL-Rezeptor-Menge einer Zelle auf die GAS6-vermittelte Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und Proliferation ist bislang ungeklärt. Generell sind nur wenige Methoden bekannt, um die Menge des AXL-Rezeptors auf Proteinebene oder die Menge des löslichen AXL-Rezeptors zuverlässig zu bestimmen. Dementsprechend sind auch Dynamik, Regulation und Funktion des AXL-Rezeptor-Sheddings nur unzureichend verstanden.

Um zur Klärung dieser Fragestellungen beizutragen, überexprimierte ich durch Transduktion den humanen AXL-Rezeptor in der murinen Interleukin-3-abhängigen pro-B-Zelllinie BaF3. Diese, im Folgenden BaF3-hAXL genannten Zellen, zeigten im Rahmen einer Wachstumskurve eine durch GAS6 induzierte Proliferation, die durch initiale Zugabe von Bemcentinib unterdrückt werden konnte. Im daraufhin erfolgten quantitativen Immunoblotting verringerte Bemcentinib dosisabhängig sowohl die basale als auch die GAS6-induzierte Phosphorylierung des AXL-Rezeptors sowie dessen Signaltransduktion. Die mittlere inhibitorische Konzentration von Bemcentinib betrug für AXL etwa 1,9 μM , für AKT etwa 0,8 μM und für ERK etwa 0,6 μM . Im Gegensatz zu den BaF3-hAXL Zellen zeigten die endogen AXL exprimierenden UT7/Epo Zellen, eine Zelllinie einer megakaryozytischen Leukämie, in einem Zellvitalitäts-Assay keine phänotypische Reaktion auf GAS6-Stimulation. Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung generierte ich daraufhin mittels quantitativem

Immunoblotting bezüglich Zeit und Dosis aufgelöste Daten in beiden Zelllinien und untersuchte damit die Dynamik der GAS6-induzierten Signaltransduktion über den AXL-Rezeptor. Der AXL-Rezeptor zeigte dabei bereits im Ruhezustand eine ligandenunabhängige Phosphorylierung, die nach Stimulation mit GAS6 deutlich zunahm und nach einem sehr frühen Signalmaximum in eine dauerhaft erhöhte Aktivierung überging. Dabei konnte sowohl in BaF3-hAXL als auch in UT7/Epo Zellen eine Signalweiterleitung über ERK und AKT nachgewiesen werden, wenn auch mit einer deutlich geringeren Amplitude in UT7/Epo Zellen, was eine mögliche Erklärung für deren fehlende phänotypische Reaktion auf GAS6-Stimulation darstellt. Indem mittels gezielter Massenspektrometrie eine reliable und sensitive Methode zur absoluten Quantifizierung des AXL-Rezeptors entwickelt wurde, konnten in BaF3-Zellen mehr als 1,1 Millionen AXL-Moleküle pro Zelle identifiziert werden, circa 25 mal mehr als in UT7/Epo Zellen. Dieses Ergebnis impliziert, dass nicht nur der zelluläre Kontext allgemein, sondern insbesondere auch die AXL-Menge einer Zelle eine essentielle Determinante für das Ausmaß der molekularen und phänotypischen Antwort auf GAS6-Stimulation darstellt. Die Messung einer Patientenprobe mittels der neu etablierten massenspektrometrischen Methode demonstrierte die potentielle klinische Anwendbarkeit und ergab einen Referenzwert von etwa 11 500 AXL-Molekülen in einer gesunden erythroiden Vorläuferzelle. Um die AXL-Menge auf der Zelloberfläche zu bestimmen, etablierte ich ein Protokoll für eine quantitative Durchflusszytometrie. Hier zeigte sich, dass sowohl BaF3-hAXL als auch UT7/Epo Zellen nur etwa 15% bzw. 55% ihrer AXL-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentieren, während sich ein großer Teil intrazellulär befindet. Durch Adaptation der massenspektrometrie-basierten Quantifizierung von AXL wurde AXL-Shedding als ein Turnover-Mechanismus identifiziert. Der Prozess des AXL-Sheddings konnte als konstitutiv charakterisiert werden und unterlag keiner Regulation durch GAS6-Bindung oder AXL-Aktivierung. Mittels Immunoblotting und einer Wachstumskurve konnte ich daraufhin in BaF3-hAXL Zellen zeigen, dass die Inhibition des AXL-Sheddings die GAS6-induzierte Signalantwort erhöht und zu GAS6-unabhängiger Proliferation führt. Dies impliziert, dass AXL-Shedding ein zellulärer Mechanismus ist, um unkontrollierter AXL-Aktivierung und damit verbundener Teilung einer Zelle, also deren maligner Transformation, vorzubeugen.