

Deciphering the role of scaffold protein NEDD9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia

Thelen, Eva Lisa Diana¹

¹Department of Internal Medicine, Division, Hematology/Oncology University Hospital Cologne, Germany

The non-catalytic scaffold protein NEDD9 is the lymphocyte specific member of the CAS protein family and is frequently upregulated and hyperphosphorylated in different cancer entities, including adenocarcinomas and hematopoietic diseases. Deregulation of NEDD9 is associated with poor clinical outcome and therapy resistance. Interfering with the adapter protein NEDD9 and its signaling dependencies could provide a strategy to circumvent direct kinase inhibitor resistances and to target a plethora of oncogenic signaling pathways simultaneously.

In B cells, activation of both the B cell receptor- (BCR) and integrin-signaling pathways leads to the hyperphosphorylation of NEDD9, predominantly by Src family kinases (SFK), which promote cell adhesion, migration and chemotaxis. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), the role of NEDD9 has not been studied yet, although altered BCR signaling is a hallmark of CLL pathogenesis with the BCR downstream kinases serving as major target for molecular CLL treatment strategies.

Therefore, the main aim of this study was to characterize the role of NEDD9 in CLL pathogenesis. We found NEDD9 to be aberrantly expressed in human CLL cells. BCR stimulation induced *NEDD9* transcription in healthy B cells, whereas CLL cells failed to induce *NEDD9* mRNA expression. To define the role of NEDD9 in CLL *in vivo*, we generated and employed *Nedd9*-competent and -deficient E μ -TCL1 mice, a transgenic model mimicking human CLL. *Nedd9* deficiency delayed the development of CLL in TCL1 mice and resulted in reduced CLL cell infiltration in homing organs such as the spleen and bone marrow. Furthermore, we could show that NEDD9 expression was required for the intact migratory activity of CLL cells towards the homing chemokine CXCL12 and adhesion to fibronectin, which could explain the reduced CLL cell accumulation in homing organs upon NEDD9 deficiency. The impaired ability of CLL cell homing in *Nedd9*-deficient TCL1 mice could explain the delay in CLL development that resulted in a survival benefit of 100 days for *Nedd9*-deficient *versus* -proficient TCL1 mice.

This study provides the first direct evidence for a functional role of the adapter protein NEDD9 in CLL pathogenesis that involves CLL cell intrinsic defects in cell adhesion, migration und thus CLL cell homing. Finally, these new insights in CLL pathogenesis may

provide a basis for the design of new therapeutic strategies by disrupting CLL cell interactions with the microenvironment as an alternative to direct kinase inhibition.

Entschlüsselung der Rolle des Strukturproteins NEDD9 bei der chronischen lymphatischen Leukämie Pathogenese

Das Strukturprotein NEDD9 ist das lymphozyten-spezifische Mitglied der CAS-Proteinfamilie und wird häufig in verschiedenen Krebsarten einschließlich Adenokarzinomen und Neoplasien des Blutes hochreguliert und hyperphosphoryliert, wobei seine Deregulierung mit einem schlechten klinischen Ergebnis und Therapieresistenz assoziiert ist. Die zielgerichtete Interferenz mit dem Adapterprotein NEDD9 und seinen Signalabhängigkeiten hat das Potential direkte Kinase-Inhibitor-Resistenzen zu umgehen und eine Vielzahl von onkogenen Signalwegen gleichzeitig zu erreichen.

In B Zellen führen sowohl die Aktivierung des B Zell Rezeptors (BZR) als auch der Integrine zur Hyperphosphorylierung von NEDD9, vorwiegend durch Kinasen der Src-Familie (SFK), was die Zelladhäsion, Migration und Chemotaxis fördert. Bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurde der Einfluss von NEDD9 noch nicht untersucht, obwohl eine veränderte BZR Signalgebung ein Hauptmerkmal der CLL-Pathogenese ist und die spezifische Inhibition von Kinasen des BZR Signalwegs eine primäre Behandlungsstrategie in der CLL darstellt.

Hauptziel dieser Studie war es daher, die Rolle von NEDD9 in der CLL Pathogenese erstmalig zu charakterisieren. Die Studie ergab, dass NEDD9 in humanen CLL Zellen abweichend exprimiert wird und dass die BZR-Stimulation die *NEDD9*-Transkription in gesunden B Zellen induziert, diese jedoch in CLL Zellen ausbleibt. Um den Einfluss von NEDD9 in der CLL Pathogenese zu untersuchen, haben wir Nedd9-kompetente und -defiziente E μ -TCL1-Mäuse als transgenes Modell verwendet, welches die humane CLL nachahmt. In Nedd9-defizienten TCL1 Mäusen war die Entwicklung von CLL signifikant verzögert und führte zu einer verringerten CLL-Zellinfiltration in *Homing*-Organen wie Milz und Knochenmark.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Expression von NEDD9 für die intakte Migrationsaktivität von CLL Zellen gegenüber dem *Homing*-Chemokin CXCL12 und die Adhäsion an Fibronectin erforderlich ist, was die verringerte Ansammlung von CLL Zellen in *Homing*-Organen in Nedd9-depletierten Tieren erklären könnte. Das *Homing* von CLL Zellen ist wiederum für ihr Überleben und ihre Expansion von entscheidender Bedeutung. Daher könnte die eingeschränkte Fähigkeit des *Homing* von CLL Zellen in Nedd9-defizienten TCL1-

Mäusen die Verzögerung der CLL Entwicklung erklären, die zu einem Überlebensvorteil von 100 Tagen für Nedd9-defiziente gegenüber Nedd9-kompetenten TCL1 Mäusen führte.

Diese Studie liefert den ersten direkten Beweis für eine funktionelle Rolle des Strukturproteins NEDD9 in der CLL Pathogenese, insbesondere in Bezug auf Zelladhäsion, Migration und damit CLL *Zell-Homing*.

Diese neuen Erkenntnisse zu NEDD9 in der CLL Pathogenese haben zum Ziel als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zu dienen, in denen die CLL Zellinteraktionen mit dem Mikromilieu als Alternative zur direkten Kinaseinhibierung gestört wird.