



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7203

# **Funktion der extrazellulären Domäne von CD44 v6 als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren**

**A. Matzke**

Institut für Toxikologie und Genetik

Februar 2006



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7203

**Funktion der extrazellulären Domäne von  
CD44 v6 als Ko-Rezeptor für  
Wachstumsfaktorrezeptoren**

Alexandra Matzke

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität  
Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2006

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor  
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072032

# **Funktion der extrazellulären Domäne von CD44 v6 als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe

(TH)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

Alexandra Matzke

aus Pforzheim

**Dekan:** Prof. Dr. Holger Puchta

**Referent:** Prof. Dr. Helmut Ponta

**Korreferent:** Prof. Dr. Margot Zöller

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14.12.2005



## Zusammenfassung

Die Rezeptortyrosinkinase cMet, ihr spezifischer Ligand HGF und Isoformen von CD44, die Exon v6 kodierte Sequenzen tragen, bilden einen trimeren Komplex. Ausbildung dieses Komplexes ist in einer Vielzahl von Geweben die Voraussetzung für die Aktivierung des cMet Rezeptors und der daraus resultierenden Signalkaskaden. Diese Arbeit zeigt, dass die Aktivierung der humanen Rezeptortyrosinkinase Ron, einem weiteren Mitglied der Met Familie, durch ihren spezifischen Liganden MSP ebenfalls von CD44 v6 abhängt.

Durch eine Mutationsanalyse, einem Alaninscan des varianten Exons v6, konnte die relevante CD44 Sequenz in der Ratte ermittelt werden, die zur Ko-Rezeptor Funktion benötigt wird. Die Mutation von drei AS (Glu, Trp, Gln) konnte die Funktion von CD44 als Ko-Rezeptor verhindern, jedoch nicht die Bindung von Hyaluronsäure. Peptide, die eine minimale Sequenz von fünf AS aufweisen und die AS Glu, Trp, Gln enthalten, blockieren die cMet Aktivierung in Karzinomzellen der Ratte. Interessanterweise hatten diese Peptide keine Auswirkung auf die cMet Aktivierung in humanen Zellen. Peptide, die die Sequenz Arg, Trp, His enthalten, die der Sequenz Glu, Trp, Gln der Ratte in der humanen CD44 v6 Region entsprechen, inhibierten die Aktivierung von cMet und Ron in humanen, aber nicht in Ratten Zellen. Die Peptide verhinderten auch die physiologischen Konsequenzen der durch HGF- und MSP-induzierten Rezeptoraktivierung, wie Auswandern der Zellen aus dem Zellverband, Migration und Invasion in extrazelluläre Matrix.

Ein Beitrag von CD44 v6 zur cMet Aktivierung ist die Bindung von HGF. cMet Expression in Abwesenheit von CD44 v6 führte zu keiner Bindung von HGF. Interessanterweise unterscheidet sich diese Funktion von CD44 v6 von dem funktionellen Beitrag zur Aktivierung von cMet, wie er durch Linker Scan Analyse definiert wurde. Die v6 spezifischen Peptide, die die Aktivierung inhibierten, verhinderten nicht die Bindung von HGF.

# **The function of the extracellular domain of CD44 v6 as co-receptor for growth factor receptors**

## **Abstract**

Studies with the receptor tyrosine kinase cMet, its specific ligand HGF and isoforms of CD44 containing sequences encoded by the variant exon v6 revealed the formation of a trimeric complex. This assembly was the prerequisite for activation of the cMet receptor and its downstream targets tested in several human and rat cells. Here I show that activation of the human receptor tyrosine kinase Ron, another member of the Met family, which is activated by its specific ligand MSP, is also dependent on CD44 v6.

In a mutational analysis by an alanine scan of exon v6, the relevant rat sequence for the co-receptor function of CD44 v6 in rat cells was determined. Mutation of the three aa Glu, Trp, Gln abolished the co-receptor function of CD44 but not its binding to hyaluronic acid. Peptides with a minimal sequence of five aa comprising these three aa successfully blocked cMet activation in rat carcinoma cell lines. Interestingly the peptides had no effect on activation of cMet in human cell lines. Using peptides comprising the sequence Arg, Trp, His that corresponds to the rat Glu, Trp, Gln in human v6 inhibited activation of cMet and Ron in human cell lines but not in rat cell lines. The peptides blocked also physiological consequences of HGF- and MSP-induced receptor activation like scattering, migration and invasion in extracellular matrix.

One contribution of CD44 v6 to cMet activation is its binding to HGF. cMet expression alone, in absence of CD44 v6, did not allow HGF binding. Interestingly this function of CD44 v6 is clearly different from the functional contribution of cMet activation as determined by the linker scan analysis: inhibition of cMet activation by v6 specific peptides did not inhibit HGF binding to CD44 v6.



# Inhalt

<b>Einleitung</b>	1
Tumorsuppressorgene	3
Onkogene	4
<b>1. Die Met Rezeptor Familie</b>	5
1.1 Die Rezeptortyrosinkinase Met	6
1.1.1 Struktur von Met	7
1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Ron	8
1.3 Die Wachstumsfaktoren hepatocyte growth factor (HGF) und macrophage stimulating protein (MSP)	9
1.3.1 HGF	9
1.3.2 MSP	10
1.4 Signalweiterleitung durch Met	11
1.5 Regulation von cMet durch Oberflächenrezeptoren	12
1.6 Met und HGF in Krebs	13
1.6.1 Met Aktivierung bei Krebs	13
1.7 Ron und seine Rolle bei Krebs	14
1.8 Met, Ron, HGF und MSP <i>in vivo</i>	15
<b>2. CD44</b>	16
2.1 Struktur des CD44 Gens	17
2.2 Struktur der CD44 Proteine	17
2.3 Die extrazelluläre Domäne	18
2.4 Die Stammregion	19
2.5 Die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Region	20
2.6 Expression von CD44	20
2.7 Extrazelluläre Liganden von CD44	21
2.8 Intrazelluläre Bindungsproteine an CD44	22
2.9 Funktionen von CD44	23
2.9.1 CD44 und Entzündungsreaktionen	23
2.9.2 CD44 in der Hämatopoiese	24

2.9.3	CD44 als Homingrezeptor	24
2.9.4	CD44 in der Embryonalentwicklung	25
2.10	CD44 im intakten Organismus	26
2.10.1	CD44 knock-out Mäuse	26
2.10.2	Selektive Suppression von CD44 in Keratinozyten	27
2.11	CD44 und seine Rolle in der Tumorigenese	28
2.12	Signaltransduktion durch CD44	30
2.12.1	Interaktion von CD44 und Matrixmetalloproteinasen	31
2.12.2	CD44 als Ko-Rezeptor	31
	<b>3. Zielsetzung</b>	<b>33</b>
	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
	<b>1. Material</b>	<b>34</b>
1.1	Reagenzien, Medien und Zusätze	34
1.2	Marker	34
1.3	Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Spezialreagenzien	36
1.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
1.5	Bakterien	37
1.6	DNA-modifizierende Enzyme	37
1.7	Plasmidkonstrukte	37
1.8	Oligonukleotide	38
1.9	Antikörper	40
1.10	Zelllinien	41
1.11	Peptide	41
1.12	Transfektionsreagenzien	42
1.13	Kulturmedien für Bakterien	42
	<b>2. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>43</b>
2.1	Klonierung und Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.2	Präparation elektrokompetenter Bakterien	43
2.3	Präparation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien	44
2.4	Transformation elektrokompetenter Bakterien	44
2.5	Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien	45

2.6	Plasmid-DNA-Mini-Präparation	45
2.7	Plasmid-DNA-Maxi-Präparation	46
2.8	Phenol/Chloroform Extraktion	46
2.9	Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktions- endonukleasen	47
2.10	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	48
2.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
2.12	DNA-Präzipitation (Fällung)	49
2.13	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
2.14	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.15	Sequenzierung von DNA	50
2.16	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	50
2.17	Quik change site-directed mutagenesis Methode	51
2.18	Zellkultur	52
2.18.1	Passagieren von Zellen	53
2.18.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	53
2.18.3	Transfektion von Zellen	53
2.18.4	Transfektion von AS-Zellen	54
2.19	Aktivierung von HGF und MSP	54
2.10	Biotinylierung von HGF	54
2.21	Induzierung mit HGF, MSP und PDGF	55
2.22	Kompetition mit CD44 v6 spezifischen Peptiden	55
2.23	Proteinextraktion und Zellyse	55
2.24	Proteinbiochemisch Methoden	56
2.25	Western Blot und immunochemische Detektion	57
2.26	Immunopräzipitation	58
2.27	RNA-Interferenz (RNAi)	59
2.28	Fluorescence-activated cell sorting analysis (FACS)	59
2.28.1	HA Bindungsassay	59
2.28.2	HGF Bindungsassay	60

2.29	Scatteringassay	60
2.30	Chemotaxisassay	60
2.30.1	Invasionsassay	60
2.30.2	Migrationsassay	61
	<b>Ergebnisse</b>	62
1.	Einleitung	62
2.	In Met defizienten Zellen kommt es zur Bindung von HGF	62
3.	Identifizierung der Ko-Rezeptor relevanten CD44 v6 Sequenz	65
4.	Hemmung der Met Aktivierung durch CD44 v6 spezifische Peptide	71
5.	Homologe Sequenzen in humanem und Ratten CD44 v6 sind für die Ko-Rezeptor Funktion essentiell	74
6.	CD44 v6 ist auch ein Ko-Rezeptor für die Rezeptor- tyrosinkinase Ron	78
7.	Humane CD44 v6 Peptide blockieren auch die Aktivierung von Ron	80
8.	CD44 v6 Peptide verhindern Migration und Invasion von Tumorzellen	82
9.	CD44 v6 spezifische Peptide verhindern die HGF HGF Bindung nicht	86
10.	Die Bindung von HGF wird durch Expression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 sowie dem CD44 v6 spezifischen Antikörper verhindert	88
	<b>Diskussion</b>	91
	<b>Literatur</b>	99
	<b>Abkürzungen</b>	118

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Aufbaus der Mitglieder der Met Rezeptor Familie	8
Abb. 2	Schematische Darstellung der Exonstruktur von CD44 sowie der varianten Isoformen CD44s und CD44 v6	18
Abb. 3	Humane CD44 v6 spezifische Peptide blockieren die Aktivierung von Met auch in den humanen Zelllinien T47D und T47D2A	63
Abb. 4	HGF Bindung erfolgt auch in Abwesenheit von Met durch CD44 v6	64
Abb. 5	Met Anwesenheit verstärkt die Bindung von HGF nicht	65
Abb. 6	RNA Interferenz (RNAi) gegen CD44 v6	66
Abb. 7	Prinzip der Linker Scan Mutagenese	67
Abb. 8	Drei AS in CD44 v6 sind essentiell für die Met Aktivierung	68
Abb. 9	Verlust der Met Aktivierung durch die Is8 Mutante	69
Abb. 10	Mutationsanalyse der Aminosäuren Glu, Trp, Gln, einzeln oder in Kombination	70
Abb. 11	Die CD44 Mutante Is8 bindet Hyaluronsäure	71
Abb. 12	Aktivierung von Met wird durch ein v6 spezifisches lineares Peptid verhindert	72
Abb. 13	Ein v6 spezifisches 5mer blockiert die Aktivierung von Met	73
Abb. 14	Peptide, bei denen die essentiellen AS von AS flankiert werden, die nicht der v6 Sequenz entsprechen, hemmen die Met Aktivierung	74
Abb. 15	Hemmung der Met Aktivierung in humanen Zellen ist durch das Ratten 5mer nicht möglich	75
Abb. 16	Humane Peptide mit der Sequenz Arg, Trp, His verhindern eine Aktivierung von Erk	76
Abb. 17	Humane v6 Peptide verhindern die Aktivierung des Met Rezeptors	77

Abb. 18	Das konservierte Tryptophan ist für die Ko-Rezeptor Funktion nicht relevant	78
Abb. 19	Die Aktivierung von Ron wird durch den CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18 verhindert	79
Abb. 20	Aktivierung von Ron wird durch die humanen CD44 v6 Peptide inhibiert	80
Abb. 21	Aktivierung von Met und Ron durch CD44 v6 benötigt keine Heterodimerisierung	81
Abb. 22	Die humanen CD44 v6 spezifischen Peptide können das durch HGF induzierte Verlassen des Zellverbandes verhindern	82
Abb. 23	Humane CD44 v6 spezifische Peptide verhindern die MSP-induzierte Streuung	83
Abb. 24	CD44 v6 Peptide verhindern HGF- und MSP-induzierte Migration und Invasion	84
Abb. 25	Der MAPK-Inhibitor UO126 hat keine Auswirkung auf die Aktivierung von Met oder PI3 Kinase	85
Abb. 26	Ratten CD44 v6 Peptide verhindern die Bindung von HGF an ASv6 Zellen nicht	87
Abb. 27	Die HGF Bindung wird durch humane CD44 v6 spezifische Peptide nicht beeinflusst	88
Abb. 28	Bindung von HGF wird durch den CD44 v6 spezifischen Antikörper, sowie durch Expression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 verhindert	89

## Einleitung

Das Spektrum der Krankheiten, die die Menschheit bedrohen, hat sich in den letzten Jahrhunderten gewandelt. In den früheren Jahrhunderten zählten Infektionskrankheiten zu den Haupttodesursachen des Menschen. Beispielsweise raffte die Pest, die sich von 1347 an in ganz Europa ausbreitete, eine unglaubliche Zahl an Menschen dahin, in Florenz binnen vier Monaten 65.000, in Avignon etwa 50.000. Heute ist sie weitgehend eingedämmt, viele Infektionskrankheiten sind besiegt. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts hat sich der Schwerpunkt deutlich, u.a. auch durch eine gestiegene Lebenserwartung, verlagert. So sind Krebserkrankungen in den Industrieländern von der siebten auf die zweite Stelle vorgerückt und werden nur von Herz-Kreislaufkrankungen überholt.

Die Bezeichnung „Krebs“ steht synonym für Tumore. Tumore zeichnen sich durch abnorme, irreversible Gewebeergrößerung aus, die durch autonome, progressive und überschießende Proliferation von Zellen entsteht. Bösartige (maligne) Tumore unterscheiden sich von gutartigen (benignen) Tumoren durch infiltrierendes, destruktives Wachstum und der Fähigkeit sekundäre Tumore und Metastasen zu bilden. Haupttodesursache durch Tumore ist in der Regel nicht das Wachstum des Primärtumors, sondern die Bildung von Metastasen. Allerdings können auch benigne Tumore schwere gesundheitliche Beeinträchtigungen zur Folge haben. Beispiel hierfür sind Tumore, die in einem abgegrenzten Raum wachsen, wie es bei Hirntumoren der Fall ist. Ihr fortschreitendes Wachstum beeinträchtigt ein oder mehrere Organe zunehmend und aufgrund der Lage des Tumors oder des zu hohen operativen Risikos ist eine operative Entfernung nicht möglich.

Metastasierung beginnt mit dem Verlust des Zell-Zell-Kontaktes. Es kommt zur Infiltration des umgebenden Gewebes und schließlich zum Eindringen in das Lymph- und Blutgefäßsystem. Die meisten metastasierenden Tumorzellen

siedeln sich zunächst in den regionären Lymphknoten an. Über die efferenten Lymphbahnen und die Blutbahn gelangen sie schließlich in andere Organe.

Zellteilung, Differenzierung und Apoptose unterliegen in normalem Gewebe homöostatischen Kontrollmechanismen. In neoplastischem Gewebe jedoch kommt es zu einer Verschiebung der Homöostase zugunsten erhöhter Zellproliferation und Hemmung der Apoptose.

Verglichen mit normalen Zellen verfügen maligne Zellen über ein unlimitiertes Replikationspotential. Die Chromosomenenden (Telomere) in normalen Zellen werden bei jeder Zellteilung verkürzt, wodurch es letztendlich zu einem Verlust des Schutzes von chromosomaler DNA, zur Fusion der Enden und schließlich zum Zelltod kommt. Die Telomere maligner Zellen bleiben jedoch nach der Zellteilung unverändert. Dies wird durch eine verstärkte Expression des Enzyms Telomerase erreicht (Shay and Gazdar, 1997). Die Bedeutung der Telomerasefunktion wurde u.a. durch Analyse von Telomerase-defizienten Mäusen deutlich. Werden diese Tiere mit Mäusen gekreuzt, die eine sehr hohe Tumoranfälligkeit zeigen, so kommt es nach Exposition mit einem Karzinogen zu einer Abnahme der Tumorbildung. Einbringen von Telomerase RNA in Telomerase-defiziente Zellen führt zum Gewinn onkogener Eigenschaften (Greenberg et al., 1999).

Tumorzellen unterscheiden sich von Normalzellen auch in ihren *in vitro* Eigenschaften. Zellen benötigen zur Kultivierung in der Regel Substrat, wie z.B. Bindegewebsmatrix oder Komponenten davon. Wenn sie konfluent werden, kommt es zum Wachstumsstillstand durch Kontaktinhibition (Holley, 1975). *In vitro* Kriterien für Tumorzellen sind hingegen substratunabhängiges Wachstum (Clark and Brugge, 1995), z.B. in Weichagar oder Methylcellulose und Verlust der Kontaktinhibition im konfluenten Zustand, was sich in einem mehrschichtigen Wachstum in Gewebekultur äußert. Ein weiteres Phänomen von transformierten Zellen ist eine verzögerte oder fehlende Alterung (immortalisierte Zellen).

Die Verwandlung einer normalen Zelle in eine maligne Zelle, die letztendlich in der Entstehung eines Tumors resultiert, wird durch epigenetische und genetische Veränderungen verursacht. Epigenetische Veränderungen basieren auf



Mechanismen und Konsequenzen mitotisch stabiler Genexpressionsmuster, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen, sondern auf differentielle DNA-Methylierung, Modifikation von Chromatin und posttranskriptionelle Modifikationen zurückzuführen sind (Grewal and Moazed, 2003). Humane Tumore zeigen oftmals eine veränderte DNA-Methylierung. Dabei kann es sich um Hyper- oder Hypomethylierung handeln (Feinberg, 1999). Z.B. wurden Mäuse erzeugt, die ein hypomorphes DNA Methyltransferase 1 (Dnmt1) Allel tragen, das die Dnmt1 Expression auf 10% des Wildtyps reduziert und zu einer Hypomethylierung der DNA in allen Geweben führt. Die Mäuse werden ohne erkennbare Defekte geboren und sind lediglich kleiner als ihre Artgenossen. Bereits im Alter von vier bis acht Monaten entwickeln sie aggressive T-Zell Lymphome. Die DNA-Hypomethylierung hatte zur Destabilisierung des Genoms geführt: in fast allen Tumorzellen lag das Chromosom 15 in drei Kopien vor (Gaudet et al., 2003).

Zu den genetischen Veränderungen zählen Mutationen, die erblich sind, durch Fehler in der Replikation entstehen oder aber durch exogene Noxen induziert werden. Generell lassen sich zwei genetische Veränderungen in Tumoren unterscheiden: Gene, die durch den Funktionsausfall beider Allele zur Transformation beitragen, sog. Tumorsuppressorgene oder Gene, die durch Mutation oder Fehlregulation aktiv an der malignen Transformation beteiligt sind, sog. Onkogene.

### **Tumorsuppressorgene**

Eine Zelle, bei der nur eine Allel eines Tumorsuppressorgens defekt ist, verhält sich wie eine normale, gesunde Zelle. Genetische Veränderungen von Tumorsuppressorgenen wirken also rezessiv: Durch Ereignisse wie Punktmutationen, Deletionen, Genkonversion, Rekombination in der Mitose, sowie Fehlverteilung (Chromosomenverlust bzw. Verdopplung) kann die Funktion des zweiten Gens verloren gehen und erst dann kommt es zu einem Verlust des normalen Wachstums. Von solchen Funktionsverlusten können beispielsweise Transkriptionsfaktoren und Proteine zur DNA-Reparatur betroffen sein.

### **Onkogene**

Onkogene entstehen durch genetische Veränderungen, wie Mutationen, Polysomien oder Chromosomentranslokationen. Die Mutation eines Gens zum Onkogen ist dominant aktiv, d.h. die Mutation eines Allels ist für die Krebsentstehung ausreichend. Das normale Allel wird als Proto-Onkogen bezeichnet.

Gene für Tyrosinkinase spielen oft eine entscheidende Rolle als Onkogene. Proto-Onkogene, die für Tyrosinkinase kodieren, nehmen eine zentrale Stellung in der Regulation von Wachstumsprozessen und morphogenetischen Programmen ein. Sie sind auch häufig für maligne Transformationen verantwortlich, wenn es z.B. durch Mutationen zu einer konstitutiven Dimerisierung und damit liganden-unabhängigen Aktivierung von Rezeptoren kommt oder der Ligand zellautonom produziert wird oder der Rezeptor überexprimiert wird.

Eine weitere Gruppe von Rezeptoren, die als Onkogene wirken können sind Adhäsionsrezeptoren. Adhäsive Interaktionen von Zellen sind essentiell für Überleben, Proliferation, Differenzierung und Funktion von Zellen, aber auch für zelluläre Kommunikation bei normalen physiologischen Vorgängen, sowie im pathogenen Verlauf. Adhäsion bezeichnet den spezifischen, rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (extracellular matrix - ECM). Diese Interaktionen besitzen einerseits mechanische Funktion, die für die Gewebeintegrität oder die Zellwanderung von Bedeutung sind. Zum anderen wirken die Adhäsionsrezeptoren auch als Signalübermittler. Diese Signaltransduktionsprozesse können, wie z.B. bei den Integrinen, bidirektional verlaufen, d.h. Signale gelangen ins Zellinnere hinein (Outside-in), aber auch aus der Zelle heraus (Inside-out). Dadurch wird ein Ineinandergreifen der unterschiedlichen Funktionen der Rezeptoren ermöglicht. Durch Adhäsion werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Kann die normale Funktion eines Adhäsionsrezeptors nicht mehr gewährleistet werden, so kann es zur Absiedlung

von Zellen aus dem Zellverband kommen. Dies ist für den Metastasierungsvorgang von besonderer Bedeutung.

Um ein möglichst genaues Wissen über die Krebsentstehung und die fortschreitende Progression zu erhalten, müssen die molekularen Mechanismen entschlüsselt und verstanden werden. Durch Vergleiche der Gen- und Proteinexpression von metastasierenden mit nicht metastasierenden Tumorzellen konnten Proteine identifiziert werden, die in Metastasierungsvorgängen involviert sind. Bei einem der ersten Vergleiche wurden variante Isoformen von CD44 als Proteine identifiziert, die Metastasierung unterstützen (Günthert et al., 1991). Ein weiterer Vergleich in unserem Institut zwischen einer nicht metastasierenden Zelllinie und einer metastasierenden Zelllinie mit Hilfe der "suppression subtractive hybridisation" (SSH) erlaubte die Identifizierung von 125 Genen, die in der metastasierenden Zelllinie hochreguliert sind (Nestl et al., 2001; von Stein et al., 1997), darunter die Rezeptortyrosinkinase Met und das Aktin-assoziierte Protein Ezrin, sowie Metalloproteasen (MMPs) und der Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) Rezeptor. Die Rezeptortyrosinkinase Met, sowie die CD44 Proteinfamilie sollen im Folgenden näher erläutert werden, da sie eine kausale Rolle im Prozess der Metastasierung spielen und vor allem bei sehr aggressiven Krebsarten verstärkt exprimiert werden. So geht eine erhöhte Expression von Met und CD44 in der Regel mit einer sehr schlechten Prognose für Patienten einher.

## **1. Die Met Rezeptor Familie**

Die Met Rezeptor Familie bildet zusammen mit den Plexin Rezeptoren und Semaphorinen die Semaphorin Superfamilie, die sich durch das Vorhandensein einer Semaphorin Domäne im extrazellulären Bereich auszeichnet (Gherardi et al., 2004). Zur Met Rezeptor Familie zählen die Rezeptortyrosinkinasen Met, Ron, das murine Ron Homolog STK und Sea, die einen sehr ähnlichen Aufbau aufweisen. Sie besitzen im extrazellulären Bereich eine N-terminale Semaphorin

Domäne, eine PSI Domäne (Plexin-Semaphorin-Integrin) und mehreren IPT (Ig-ähnliche) Domänen (Abb. 1). Die IPT Domänen kommen auch in Immunglobulinen, Plexinen und Transkriptionsfaktoren vor (auch unter der Bezeichnung TIG Domänen bekannt). Auf die Transmembrandomäne folgt im intrazellulären Bereich eine Tyrosinkinase Domäne (TK), sowie der Carboxyterminus, der zur Signalweiterleitung benötigt wird.

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch unterschiedliche Liganden, Met wird durch HGF, Ron und STK durch MSP aktiviert, der Ligand von Sea wurde bislang noch nicht identifiziert.

### 1.1 Die Rezeptortyrosinkinase Met

Das *cMet* Proto-Onkogen wurde ursprünglich als Onkogen tpr-Met entdeckt, das *in vitro* nach Behandlung mit dem chemischen Karzinogen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in humanen Osteosarkom Zellen (HOS) entstand (Cooper et al., 1984). In diesen Zellen kam es zur Aktivierung des Met Proto-Onkogens durch chromosomales Rearrangement von Chromosom 1 und Chromosom 7 (Park et al., 1986). Durch dieses Rearrangement entstand das Hybridgen *TPR-Met*. Dieses setzt sich aus einem Bereich des TPR Lokus (translocated promoter region) und einer Sequenz zusammen, die für die intrazelluläre Kinase Domäne des Met Rezeptors kodiert (auf die Struktur von Met wird später näher eingegangen). TPR enthält zwei Leucin-Zipper-Motive zur Protein-Protein-Dimerisierung. Das TPR-Met Protein liegt im dimerisierten Zustand vor und ist liganden-unabhängig aktiviert (Rodrigues and Park, 1993).

Die Aktivierung von *cMet* erfolgt dagegen auf liganden-abhängige Weise. Der spezifische Ligand für *cMet*, HGF, wurde in unterschiedlichen Studien unabhängig voneinander identifiziert, zum einen als Motilitätsfaktor (scatter factor, SF) (Stoker et al., 1987), zum anderen als Faktor, der mitogen auf Hepatozyten wirkte (hepatocyte growth factor, HGF) (Miyazawa et al., 1994; Nakamura et al., 1989; Zarnegar and Michalopoulos, 1989). HGF wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen synthetisiert, während Met auf epithelialen Zellen exprimiert wird. Dies deutet auf eine wichtige Rolle bei

Interaktionen des Epithels mit dem Mesenchym hin, z.B. in der Organentwicklung von Lunge, Niere und Milchdrüsen (van der Voort et al., 2000).

Die zelluläre Antwort auf die Aktivierung von cMet durch HGF ist vielfältig. Hierzu zählen Zellproliferation und Überleben, Motilität, z.B. Ausbrechen aus einem Zellverband aber auch Zellwanderung durch die extrazelluläre Matrix, z.B. Unterstützung von Invasion (Jeffers et al., 1998). Physiologische Bedeutung haben die durch HGF ausgelösten Signalkaskaden durch cMet in der Embryonalentwicklung, Wundheilung, Geweberegeneration, Angiogenese, Wachstum, Invasion und Differenzierung.

Das Met Gen ist auf Chromosom 7q31 lokalisiert. Die mRNA wird durch 21 Exons kodiert. Mindestens drei Varianten wurde identifiziert, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstehen. Hierzu zählt eine in vielen Geweben vorkommende Met Isoform, der 18 AS in einem Bereich der extrazellulären Region fehlen, die von Exon 10 kodiert werden. Durch alternatives Spleißen von Exon 14 entsteht eine weitere Form, die eine in-frame Deletion von 47 AS in der membranbenachbarten Domäne des Rezeptors aufweist.

### **1.1.1 Struktur von Met**

Beim Met Rezeptor handelt es sich um ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer. Dieses entsteht durch proteolytische Spaltung des Pro-Rezeptorproteins an einem Furinrest zwischen den Aminosäuren 307 und 308, was zur Bildung einer rein extrazellulär lokalisierten  $\alpha$ -Untereinheit mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 50 kDa und einer längeren  $\beta$ -Einheit mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 145 kDa führt. Die  $\beta$ -Untereinheit umfasst, neben der extrazellulären Ectodomäne, die Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Im zytoplasmatischen Bereich befindet sich eine Kinase Domäne sowie eine Signaltransduktionsdomäne.

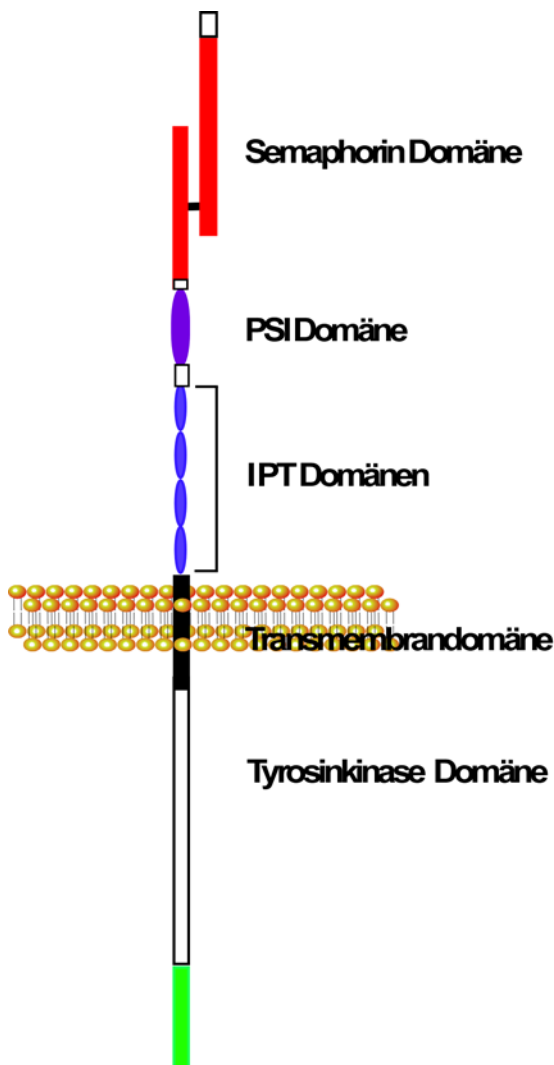


Abb. 1: **Schematische Darstellung des Aufbaus der Mitglieder der Met Rezeptor Familie:** Die Transmembranrezeptoren Met, Ron, STK und Sea enthalten eine Semaphorin Domäne (rot) im extrazellulären Bereich, die sowohl auf der  $\alpha$ - als auch auf der  $\beta$ -Untereinheit liegt. Es folgt auf der  $\beta$ -Untereinheit eine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin) Domäne (violett) und vier IPT Domänen (Immunglobulin-Plexin-Transkriptionsfaktor) (blau). Auf die Transmembrandomäne folgt der zytoplasmatische Teil des Rezeptors, der eine Tyrosinkinase Domäne enthält, die die katalytische Aktivität verleiht.

## 1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Ron

Ron (Recepteur d'Origine Nantaise) ist ein glykosyliertes Heterodimer aus einer  $\alpha$ -Untereinheit mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 35 kDa und einer  $\beta$ -Untereinheit mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 150 kDa, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Der Rezeptor entsteht durch proteolytische Spaltung aus einem Vorläufermolekül. Wie bei Met ist auch hier die  $\alpha$ -Untereinheit extrazellulär, die  $\beta$ -Untereinheit besitzt einen extrazellulären, sowie einen Transmembran- und zytoplasmatischen Bereich. Der spezifische Ligand für Ron ist MSP (macrophage stimulating protein), ein Wachstumsfaktor, der ursprünglich als Serumfaktor beschrieben wurde, der Makrophagen auf den

Komplementfaktor C5a reagieren ließ (Skeel et al., 1991). Die Kinase-Domäne von Ron hat 63% Homologie mit der Kinase Domäne von Met. Insgesamt liegt die Homologie von Met und Ron bei 33%.

Die Rezeptortyrosinkinase Ron kommt ausschließlich im menschlichen Organismus vor. Das murine Homolog zu Ron ist der Stem cell-derived Tyrosin kinase Receptor (STK) (Iwama et al., 1994).

Das Gen für Ron ist auf Chromosom 3p21 lokalisiert. Transkripte des Ron Gens ließen sich in Keratinozyten, in Lungengewebe, Herzgewebe, Pankreas, Schilddrüse, Prostata, und im Knochenmark nachweisen. Ron wurde in einer Vielzahl von Zellen identifiziert, wie beispielsweise Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und Megakaryozyten des Knochenmarks (Gaudino et al., 1995; Suda et al., 1997; Wang et al., 2000). Eine funktionelle Bedeutung hat Ron für die Entwicklung von Epithelien, Knochen (Ossifikation) und neuroendokrinen Geweben, indem Zellen zu weiterer Proliferation stimuliert werden (Gaudino et al., 1995).

### **1.3 Die Wachstumsfaktoren HGF und MSP**

HGF und MSP zählen zu den Plasminogen-verwandten Wachstumsfaktoren (plasminogen-related growth factors - PRGFs). Die Sequenz der beiden stimmt zu 45% und zu 40% mit Plasminogen überein.

#### **1.3.1 HGF**

HGF zeichnet sich durch sechs Domänen aus: einer aminoterminalen Domäne (N) mit einem Hairpin Loop von 27 AS, vier Kringel-Domänen (K1-K4) und einer Serin-Protease Homologie-Domäne (SPH), allerdings ohne enzymatische Aktivität aufgrund des Austauschs eines Serinrestes durch ein Tyrosin (Lokker et al., 1992). Wie Plasminogen wird auch HGF als einzelsträngiges, inaktives Vorläufermolekül (ca. 100 kDa) synthetisiert und wird dann proteolytisch in ein aktives Heterodimer gespalten (Naka et al., 1992). Die Spaltung findet nach der Kringeldomäne K4 zwischen zwei positiv geladenen AS (Arg<sup>494</sup>-Val<sup>495</sup>) statt und kann durch zahlreiche Serinproteinasen erfolgen, unter anderem durch die Plasminogen Aktivatoren uPa (urokinase plasminogen activator) und tPa (tissue-

type plasminogen activator), durch den HGF activator und das HGF converting enzyme (Mars et al., 1993; Mizuno et al., 1994; Naldini et al., 1992; Shimomura et al., 1995). Die Röntgenstrukturanalyse eines Fragments aus der aminoterminalen Domäne und der Kringeldomäne K1 (NK1) hat gezeigt, dass NK1 die Bindungsstelle für den Rezeptor enthält (Lietha et al., 2001; Ultsch et al., 1998). Es existieren unterschiedliche Spleißvarianten und Mutanten von HGF, wie z.B. NK2, eine Form, die die aminoterminalen Domäne und K1 und K2 enthält. NK2 fungiert als HGF-Antagonist (Chan et al., 1991). In einer anderen Variante sind 15 AS in K1 deletiert. Dies hat Konsequenzen für die Tertiärstruktur, was letztendlich zu einer Veränderung der Aktivität führt (Shima et al., 1994).

### 1.3.2 MSP

MSP wurde ursprünglich aus Peritonealmakrophagen isoliert (Leonard and Skeel, 1978; Leonard and Skeel, 1979). Wie HGF ist auch MSP aus einer aminoterminalen Domäne, vier Kringel-Domänen und einer SPH-Domäne aufgebaut. Auch MSP wird als einzelsträngiges Vorläufermolekül sekretiert, das dann gespalten wird und ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bildet (Rubin et al., 1993; Wang et al., 1994).

Von den Peptiden pro-MSP, MSP,  $\alpha$ -Strang,  $\beta$ -Strang und MSP-NK2 ist nur MSP biologisch aktiv. Der  $\beta$ -Strang zeigte sich als schwacher MSP-Antagonist (Wang et al., 1997). Im Gegensatz zu  $\beta$ -HGF bindet  $\beta$ -MSP seinen Rezeptor mit hoher Affinität, Bindung von  $\alpha$ -MSP an Ron konnte nicht nachgewiesen werden (Miller and Leonard, 1998). Trotz ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich demnach HGF und MSP deutlich in ihrem Bindungsverhalten an ihre Rezeptoren.

MSP und HGF induzieren ähnliche biologische Vorgänge: Stimulation der DNA Synthese, Induktion der Zelldissoziation, Invasion in die extrazelluläre Matrix, sowie Ausbildung tubulärer Strukturen („branching morphogenesis“) (Gaudino et al., 1994; Medico et al., 1996; Santoro et al., 1996; Wang et al., 1996).



#### 1.4 Signalweiterleitung durch Met

Die Aktivierung von cMet erfolgt durch Bindung des Liganden HGF an den  $\alpha$ -Strang und die ersten 212 AS des  $\beta$ -Stranges (Gherardi et al., 2003). Die Bindung des Liganden hat eine Autophosphorylierung der Aminosäuren Tyr<sup>1230</sup>, Tyr<sup>1234</sup> und Tyr<sup>1235</sup> im katalytischen Teil der Kinase Domäne zur Folge. Dadurch kommt es zur Aktivierung der intrinsischen Kinase Aktivität von cMet durch weitere Phosphorylierungsereignisse an vier weiteren Tyrosinresten: Tyr<sup>1349</sup>, Tyr<sup>1356</sup>, Tyr<sup>1313</sup> und Tyr<sup>1003</sup>.

Eine intrazelluläre „Plattform“ zur Bindung von Signalübermittlern wird von einer kurzen Folge von AS gebildet (Tyr<sup>1349</sup>Val-His-Val-Asn-Ala-Tyr-Tyr<sup>1356</sup>). Adapterproteine, die Src homology-2 (SH2) Domänen, Phosphotyrosin Bindungs-Domänen (phosphotyrosine binding – PTB) oder Met Bindungs-Domänen (MBD) enthalten, können an diese Sequenzen binden (Ponzetto et al., 1996; Weidner et al., 1996). Solche Adapterproteine sind Grb2 (Ponzetto et al., 1996), Shc (Pellici 1995), Gab1 (Weidner et al., 1996) und Crk/CRKL (Garcia-Guzman et al., 1999; Sakkab et al., 2000). Weitere Substrate sind Signaltransduktionsproteine wie Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K) (Graziani et al., 1993), signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) (Boccaccio et al., 1998), phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (Ponzetto et al., 1996), Ras guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless (SOS) (Graziani et al., 1993), Src Kinase (Ponzetto et al., 1996) und SHP2 Phosphatase (Fixman et al., 1996). Die Mutation dieser Multisubstrat-Bindungsdomäne hat gezeigt, dass Tyr<sup>1349</sup> und Tyr<sup>1356</sup> die Interaktion mit SHC, Src und Gab1 vermitteln. Für eine Interaktion mit Grb2, PI3K, PLC- $\gamma$  und SHP2 ist Tyr<sup>1356</sup> ausreichend (Furge et al., 2000). Außerdem kann PI3K an Tyr<sup>1313</sup> gebunden werden. Tyr<sup>1003</sup> spielt bei der Bindung von c-Cbl eine wichtige Rolle. Cbl bindet und ubiquitiniert den Met Rezeptor und führt zusammen mit dem Endophilin-CIN85 Komplex zur Internalisierung des Rezeptors (Petrelli et al., 2002).

Aus sterischen Gründen können zwei Substrate nicht gleichzeitig an die zweizählige Bindungsstelle eines Moleküls anlagern (Stefan et al., 2001). Allerdings kann Gab1 an ein phosphoryliertes Tyr<sup>1349</sup> eines Moleküls und Grb2

an phosphoryliertes Tyr<sup>1356</sup> eines zweiten Moleküls binden, wodurch es zu Interaktionen zwischen Gab1 und Grb2 zwischen Met Dimeren oder Multimeren kommen kann. Werden diese zweizählige Bindungsstellen auf andere Rezeptor-tyrosinkinasen transferiert, so werden zelluläre Antworten beobachtet, die denen von Met ähneln (Sachs et al., 1996).

Die Domäne, die im zytoplasmatischen Teil unmittelbar nach der Transmembrandomäne lokalisiert ist, wirkt mit den Aminosäuren Ser<sup>975</sup> und Tyr<sup>1003</sup> als negativer Regulator. Die Phosphorylierung von Ser<sup>975</sup> wird durch zwei Mechanismen kontrolliert: 1) durch Aktivierung von Protein Kinase C (PKC), 2) durch einen Anstieg des intrazellulären Calciumgehaltes, vermutlich durch eine Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-abhängige Kinase.

### **1.5 Regulation von cMet durch Oberflächenrezeptoren**

Die Aktivität von cMet kann durch Assoziation mit zellspezifischen Oberflächenmolekülen beeinflusst werden (Bertotti and Comoglio, 2003). Integrin  $\alpha6\beta4$  und cMet können einen Komplex in der Zellmembran von Karzinomzellen bilden. Die Aktivierung von cMet durch HGF führt dann zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teiles von  $\alpha6\beta4$  und bewirkt die Bildung einer „Plattform“ zur Rekrutierung von Shc und PI3K. Somit verhält sich  $\alpha6\beta4$  als Adaptorprotein für cMet (Trusolino et al., 2001).

Ähnlich wie  $\alpha6\beta4$  bildet auch Plexin B1 einen supramolekularen Komplex auf der Zelloberfläche mit cMet. Ungleich  $\alpha6\beta4$  agiert Plexin B1 als HGF-unabhängiger Primer der Met Aktivierung. Die Expression von cMet, Plexin B1, sowie dem Plexinliganden Semaphorin 4D (Sema4D), resultiert in der Aktivierung von cMet und in zellulären Antworten, die den durch HGF induzierten sehr ähneln. Werden Zellen mit HGF und Sema4D behandelt, kommt es zu einer Kooperation (Giordano et al., 2002).

Met kann auch mit Isoformen von CD44 interagieren (Orian-Rousseau et al., 2002). Auf diese Interaktion wird in Kapitel 2.12.2 der Einleitung eingegangen.

## 1.6 Met und HGF in Krebs

Die Fehlregulation der HGF-induzierten Signaltransduktion durch Met ist Ursache vieler Krebserkrankungen. Murine und humane Zelllinien, die Met oder HGF überexprimieren, sind tumorigen in Nacktmäusen (Rong et al., 1994). Entsprechend führte die Verringerung der Met oder HGF Expression zu einer Verringerung des tumorigenen Potentials (Abounader et al., 2002). Außerdem konnte anhand von Tiermodellen, die Met oder seinen Liganden als Transgen exprimieren, die Entwicklung verschiedener Tumorarten und deren Metastasierung beobachtet werden (Takayama et al., 1997). Eine gestörte Met Expression wurde in zahlreichen humanen und murinen Tumoren festgestellt. Hierzu zählen unter anderem Melanome, Rhabdomyosarcome, Hepatome und Osteosarkome (Di Renzo et al., 1995a; Ferracini et al., 1995; Natali et al., 1993; Prat et al., 1991; Rong et al., 1993), sowie Karzinome des Gastro-Intestinaltraktes (Di Renzo et al., 1995a; Di Renzo et al., 1995b; Kuniyasu et al., 1992).

### 1.6.1 Met Aktivierung bei Krebs

Die Aktivierung von Met in Tumorzellen findet meistens durch liganden-abhängige autokrine oder parakrine Mechanismen statt. Osteosarkome und Glioblastome exprimieren sowohl Met als auch HGF. Viele Karzinome exprimieren oder überexprimieren Met, der Ligand jedoch wird nicht von den Tumorzellen produziert, sondern von Stromazellen. Eine liganden-unabhängige Aktivierung wurde für Zellen mit extrem hoher Met Expression beobachtet (Wang et al., 2001). Andere Onkogene, wie z.B. aktiviertes Ras, können die Überexpression von Met durch transkriptionelle Mechanismen induzieren (Furge et al., 2001; Ivan et al., 1997).

In humanen Karzinomen des Magens nimmt das TPR-Met Rearrangement eine bedeutungsvolle Rolle ein (Soman et al., 1991). Das onkogene Potential von Tpr-Met wurde sowohl in Fibroblasten *in vivo*, als auch in transgenen Mäusen evaluiert, wo es zu Mammakarzinomen führte (Liang et al., 1996; Rodrigues and Park, 1993).

### 1.7 Ron und seine Rolle bei Krebs

Die Rezeptortyrosinkinase Ron ist ebenfalls auf einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Eine überdurchschnittlich hohe Expression (bis zu 20-fach höher) von Ron wurde auf Mammakarzinomen gefunden. Hier wurde auch eine konstitutive Phosphorylierung des Proteins an Tyrosinresten beobachtet. Aktivierung von Ron in Brustkarzinomzellen, die *in vitro* kultiviert wurden, führte zu Proliferation, Migration und Invasion. Demnach könnte Ron eine Rolle in der Progression von humanen Brustkarzinomen hin zu einem invasiven-metastasierenden Phänotyp spielen (Maggiore et al., 1998).

Eine verkürzte Ron mRNA wurde in der Lunge, dem Ovar und in Geweben des Gastrointestinaltraktes sowie auf zahlreichen Tumoren gefunden. Hierzu zählen Ovarkarzinome, Pankreaskarzinome und Leukämien. Das Transkript kodiert für ein verkürztes Ron Protein (short-form Ron - sf-Ron). Ihm fehlt ein Großteil des extrazellulären Bereiches, die Transmembranregion und die zytoplasmatische Region sind jedoch vollständig enthalten. Sf-Ron zeigt Tyrosinkinase Aktivität und ist konstitutiv phosphoryliert. Epitheliale Zellen, die mit sf-Ron transfiziert sind, weisen einen aggressiven Phänotyp auf: sie zeigen eine nicht-epitheliale Morphologie, können keine Zellaggregate ausbilden, wachsen extrem schnell in Zellkultur, sind im Wachstum unabhängig von Verankerung an Substrat und werden motil (Bardella et al., 2004).

In humanen, erblich bedingten Nierenkarzinomen (human hereditary renal carcinoma - HPRC) kommen gehäuft Keimbahnmutationen in cMet, und zwar hauptsächlich in der Tyrosinkinase Domäne, vor (Schmidt et al., 1997). Ähnliche Mutationen wurden in murines Ron (STK) eingebracht. Zellen, die diese Ron-Mutanten, aber auch den Ron Wildtyp exprimierten, waren stark tumorigen *in vivo*. Somit kann Ron als äußerst aggressives Onkogen fungieren, wenn es zu Überexpression oder Aktivierung durch Mutation kommt (Peace et al., 2001). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Ron und Met in mehr als der Hälfte der untersuchten humanen Ovarkarzinome überexprimiert wurden und in 42% der untersuchten Fälle ko-exprimiert wurden. Motilität und Invasivität von Ovarkarzinomzellen, die Met und Ron ko-exprimieren, wurden durch HGF und in einem geringeren Ausmaß von MSP ausgelöst. Somit kann die Ko-Expression

von Met und Ron die Progression von Ovarkarzinomen begünstigen (Maggiara et al., 2003).

### **1.8 Met, Ron, HGF und MSP *in vivo***

Um die Funktion von Proteinen im lebenden Organismus zu analysieren, werden Proteine in einem geeigneten Modellorganismus, vorwiegend in Mäusen, ausgeschaltet. MSP knock-out Mäuse zeigen einen normalen Entwicklungsverlauf, sie sind fruchtbar und erreichen das Erwachsenenalter. Sie zeigen lediglich Veränderungen in der Leber aufgrund lipidhaltiger Vakuolen in Hepatozyten, die jedoch zu keiner offenkundigen Störung der Leberfunktion führen. Die Hematopoiese scheint nicht betroffen, obwohl die Aktivierung der Makrophagen in Abwesenheit von MSP verzögert ist. Außerdem wurde eine normale Wundheilung beobachtet. Generell scheint MSP nicht notwendig für die Embryogenese, Fruchtbarkeit oder Geweberegeneration zu sein (Bezerra et al., 1998). Mäuse, bei denen das STK-Gen, das Maus-Homolog von Ron, deletiert wurde, zeigten ebenfalls einen normalen Entwicklungsverlauf (Correll et al., 1997).

HGF und Met knock-out Mäuse sind dagegen nicht lebensfähig. Die Tiere sterben während der Embryonalentwicklung, was für eine äußerst wichtige Rolle von HGF und Met spricht. Beide Moleküle üben eine kausale Funktion bei der Ausbildung von Skelettmuskeln aus Vorläuferzellen aus. Das Ausschalten dieser Gene führt zum Verlust ganzer Muskelgruppen, die aus diesen Vorläuferzellen entstehen. Wandernde Muskelvorläuferzellen (myogenic cells) entstehen durch epitheliale-mesenchymale Transition aus dem Dermomyotom. Diese Zellen wurden in HGF und Met knock-out Mäusen nicht beobachtet. Umgekehrt führte die Behandlung im Hühnerembryo an Stellen, die normalerweise keine HGF Expression aufweisen, mit HGF zu epithelialer-mesenchymaler Transition und zum Auswandern der dermomyotomalen Zellen (Bladt et al., 1995; Brand-Saberi et al., 1996).

Die Deletion des HGF sowie des Met Gens führt auch zu einem Phänotyp in der Leber und in der Plazenta, sowie im Nervensystem. Die Tiere weisen eine deutlich verkleinerte Leber auf, weil Met-negative embryonale Leber-

Stammzellen nicht zur Entwicklung der Leber beitragen. Bei Met-defizienten Embryos kommt es aufgrund des Plazentadefektes zu einer schlechten Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). Letztendlich führt diese Unterversorgung zum Tod der HGF- bzw. Met-defizienten Embryos *in utero*.

Sowohl HGF als auch Met tragen zur Entwicklung des Nervensystems bei. HGF bzw. Met knock-out Mäuse zeigen nämlich auch Anomalien in den motorischen Neuronen, die die Gliedmaßen versorgen (Ebens et al., 1996). Jedoch ist eine weitere Interpretation der funktionellen Konsequenzen im Nervensystem sehr schwierig, da in der zweiten Entwicklungshälfte der Embryonalentwicklung eine normale Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen des Embryos aufgrund der plazentalen Malformierung nicht mehr gewährleistet ist und dies unweigerlich eine Auswirkung auf Nervenzellen hat. Die embryonale Letalität durch Deletion des HGF bzw. Met Gens macht es unmöglich, die Rolle dieser Moleküle im adulten Organismus zu untersuchen (Birchmeier and Gherardi, 1998).

Obwohl HGF und MSP sowie Met und Ron zu den gleichen Familien zählen und gleiche biologische Funktionen *in vitro* ausüben, scheinen sie unterschiedliche Funktionen im Organismus zu erfüllen.

## 2. CD44

Für zahlreiche biologische Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, Migration und Metastasierung spielen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen eine entscheidende Rolle. Moleküle, die an diesen Prozessen beteiligt sind, sind Vertreter der CD44 Familie. Dabei handelt es sich um eine Familie von TypI-Transmembranglykoproteinen, die auf einer Vielzahl von Zellen vorkommen, die sowohl epithelialen, als auch mesenchymalen oder hämatopoietischen Ursprungs sein können.

CD44 wurde erstmals durch einen monoklonalen Antikörper auf hämatopoietischen Zellen nachgewiesen (Dalchau et al., 1980). Später wurden andere Formen, mit einem variierenden scheinbaren Molekulargewicht von

80-200 kDa, auf zahlreichen anderen Zelltypen nachgewiesen. CD44 ist auch unter den Bezeichnungen phagozytotisches Glycoprotein 1 (Pgp-1) (Hughes et al., 1983) extrazellulärer Matrixrezeptor II (ECMR-II) (Carter and Wayner, 1988), HUTCH-1 (Gallatin et al., 1989), HCAM (Goldstein et al., 1989) und Hermes Antigen (Jalkanen and Jalkanen, 1992) bekannt.

## 2.1 Struktur des CD44 Gens

CD44 Proteine werden durch ein einziges, evolutionär konserviertes Gen kodiert, das beim Mensch auf Chromosom 11p13 (Goodfellow et al., 1982), bei der Maus auf Chromosom 2 (Colombatti et al., 1982) liegt. Die enormen Unterschiede im scheinbaren Molekulargewicht entstehen durch zwei unterschiedliche Mechanismen. Zum einen durch alternatives Spleißen von zehn varianten Exons im extrazellulären Bereich (Abb. 2), zum anderen durch post-translationale Modifikationen (Naor et al., 2002).

Die mRNA von CD44 wird durch 20 Exons kodiert (Screaton et al., 1992; Tölg et al., 1993). Davon werden 10 Exons für alle CD44-Proteine verwendet (konstante Exons). Exon 1 bis 5 und Exon 16 und 17 kodieren für den konstanten extrazellulären Bereich, Exon 18 für die hydrophobe Transmembrandomäne und Exon 19 und 20 für den zytoplasmatischen Teil. Die Expression von Exon 6 bis 15 (auch als v1-v10 bezeichnet) ist durch alternatives Spleißen reguliert (Abb. 2). Ebenfalls durch alternatives Spleißen der Exons 18 und 19 entsteht entweder eine kurze Form (drei AS) oder eine lange Version (70 AS) des zytoplasmatischen Endes. Allerdings ist das Vorkommen der kurzen Form äußerst selten und seine physiologische Bedeutung unklar (Goldstein and Butcher, 1990; Screaton et al., 1992). CD44 Isoformen, die Exon v1 enthalten, findet man beim Menschen nicht, da das humane Exon v1 ein Stopcodon enthält (Screaton et al., 1993; Tölg et al., 1993).

## 2.2 Struktur der CD44 Proteine

Es wurden mindestens 20 unterschiedliche Transkripte von CD44 nachgewiesen (Herrlich et al., 1993). Zu den bisher charakterisierten Proteinen zählt CD44E (CD44 v8-v10), eine epitheliale Isoform (Stamenkovic et al., 1991), die

hämatopoietische Form CD44s (standard), und CD44 v3-v10, eine 230 kDa schwere Isoform, die auf Keratinozyten vorkommt (Hofmann et al., 1991). Die am häufigsten vorkommende, kleinste Isoform von CD44 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 85 kDa ist CD44s. Diese enthält keine durch variante Exons kodierte Sequenzen. Sie besteht aus einer 270 AS großen extrazellulären Domäne, einer 23 AS umfassenden Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne aus 70 AS (Brown et al., 1991; Stamenkovic et al., 1989).

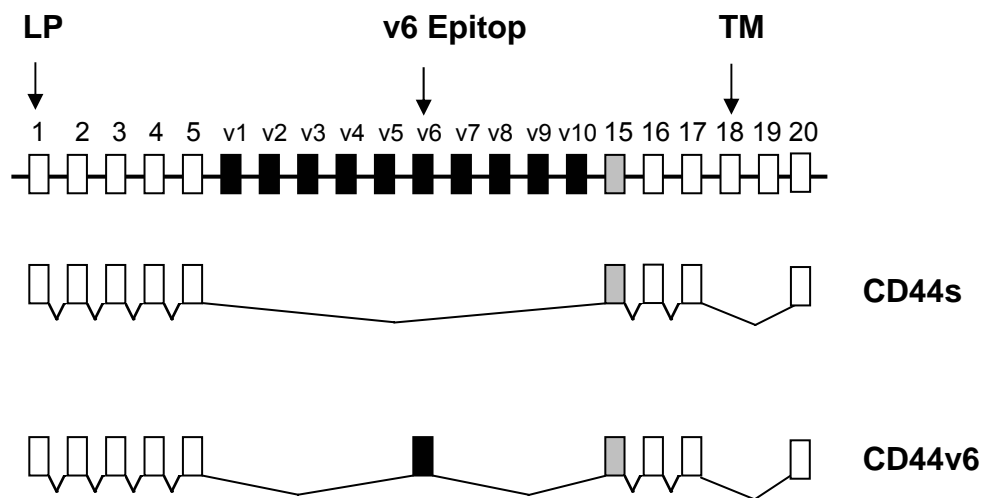


Abb. 2: **Schematische Darstellung der Exonstruktur von CD44 sowie der varianten Isoformen CD44s und CD44 v6.** Die Exons werden durch Rechtecke dargestellt, die Introns durch Linien. Exon 1-5 und 15-19 kodieren für den konstanten Bereich. Die variable extrazelluläre Region wird von Exons 6-15, hier als v1-v10 bezeichnet, kodiert. Exon 1 kodiert für das Leader Peptid (LP), Exon 18 für die Transmembrandomäne und Exon 19 und 20 für den zytoplasmatischen Teil von CD44. Die Standardform CD44s enthält keine varianten Exons, die variante Isoform CD44 v6 enthält das variante Exon v6.

### 2.3 Die extrazelluläre Domäne

Die extrazelluläre Region wird in eine aminoternale, eine variable, sog. Stammregion, und eine membran-nahe Domäne unterteilt.

Die ersten fünf (konstanten) Exons kodieren für eine globuläre Protein-Domäne (Goldstein et al., 1989). An der Ausbildung dieser globulären Domäne sind Disulfidbrücken zwischen vier Cysteinen beteiligt (Day and Sheehan, 2001). Insgesamt befinden sich in der aminoternalen Region sechs Cysteine, die,



außer in der Ratte (hier kommen nur fünf vor), konserviert sind (Günthert et al., 1991). Die beiden anderen Cysteine werden für eine korrekte Faltung und für Bindung von Hyaluronsäure benötigt (Banerji et al., 1998).

Die aminoternale Domäne enthält die sog. Link-Domäne, die für die Bindung von Hyaluronsäure benötigt wird. Es handelt sich dabei um eine Folge von 90 AS, die eine zu 80-90% konservierte Sequenz zwischen den Säugerspezies aufweist und Ähnlichkeit mit Domänen des „cartilage link protein“ und des „proteoglycan core protein“ hat (Deak et al., 1986; Doege et al., 1986; Neame et al., 1986; Stamenkovic et al., 1989). Die extrazelluläre Domäne von CD44 wird durch Glykosylierung modifiziert, die zelltyp-abhängig ist. Eine Region, die Serin- und Threonin-Cluster sowie saure Aminosäuren und Proline im Bereich der membran-nahen Domäne enthält, wird durch O-Glykosylierungen modifiziert, vier Ser-Gly Motive können durch Glucosaminoglycane modifiziert werden, von denen nur eine einzige Bindungsstelle in einem von Exon 5 kodierten Bereich verwendet wird. Hier kommt es hauptsächlich zu Bindung von Chondroitinsulfat (Goodfellow et al., 1982; Greenfield et al., 1999).

## **2.4 Die Stammregion**

Die aminoternale Region wird von der Transmembrandomäne durch eine Stammregion getrennt, welche eine Sequenz zur proteolytischen Spaltung enthält (Bazil and Strominger, 1994; Campanero et al., 1991; Katoh et al., 1994). Die Stammregion umfasst bei CD44s lediglich 46 Aminosäuren, wird aber bei den varianten Isoformen um die varianten Exons erweitert. Diese kann auf bis zu 381 Aminosäuren (humanes CD44 v2-v10), bzw. 423 Aminosäuren (murines CD44 v1-v10) vergrößert werden. Die variable Region wird zwischen den AS 202 und 203 eingebaut. Der Einbau solcher varianten Exons hängt unter anderem von mitogenen Signalen ab, die das alternative Spleißen regulieren. Bereiche, die durch variante Exons kodiert werden, enthalten zahlreiche Stellen für N- und O-Glykosylierungen und Modifikationen durch Glukosaminoglykane, z.B. ist die Modifikation durch N- und O-Glykosylierung von CD44E (CD44v8-v10) möglich (Brown et al., 1991). Isoformen, die von Exon v3 kodierte Sequenzen enthalten,

können durch Heparinsulfat (HS) und Chondroitinsulfat modifiziert werden (Bennett et al., 1995).

### 2.5 Die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Region

Die Transmembrandomäne von CD44 setzt sich aus 23 hydrophoben Aminosäuren zusammen. Sie ist zwischen Mensch, Ratte und Maus identisch. Darin enthalten ist ein Cystein (Cys<sup>286</sup>), das an der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen einzelnen CD44 Molekülen beteiligt ist und somit zur Clusterbildung beitragen kann (Liu and Sy, 1996). Post-translationale Modifikation der Transmembrandomäne entsteht durch Palmytoylierung, die der Interaktion von CD44 mit dem Partnerprotein Ankyrin dient (Bourguignon et al., 1991; Lokeshwar et al., 1994).

Der zytoplasmatische Teil spielt für die Signalweiterleitung und die Organisation des Zytoskeletts eine essentielle Rolle. Er umfaßt 70 AS, die zu über 83% zwischen Mensch, Ratte und Maus konserviert sind (Isacke, 1994; Sheikh et al., 1998) zu denen vier Serine (Ser<sup>291</sup>, Ser<sup>316</sup>, Ser<sup>323</sup> und Ser<sup>325</sup>) zählen. Durch Mutation dieser Aminosäuren, einzeln oder in Kombination, wurde gezeigt, dass Ser<sup>323</sup> und Ser<sup>325</sup> *in vivo* phosphoryliert werden können, wobei die Phosphorylierung an Ser<sup>325</sup> überwiegt. Die Mutation dieser AS verhinderte CD44 abhängige Zellmigration. Die Hyaluronsäurebindung wurde durch diese Mutation allerdings nicht beeinträchtigt (Peck and Isacke, 1998). Ser<sup>291</sup> wird durch Protein Kinase C (PKC) *in vitro* phosphoryliert. Nach Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) kommt es zu einer Dephosphorylierung von Ser<sup>325</sup> und Phosphorylierung von Ser<sup>291</sup>. Die Phosphorylierung von Ser<sup>291</sup> reguliert die Interaktion von CD44 mit Ezrin, einem Aktin-assoziierten Protein (Legg et al., 2002).

### 2.6 Expression von CD44

CD44s wird praktisch ubiquitär im adulten und embryonalen Organismus exprimiert. Hierzu zählen beispielsweise alle hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, sowie teilweise auch Neuralzellen (Dalchau et al., 1980; Nottenburg et al., 1989; Picker et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989). Hingegen kommen die CD44-Varianten nur auf

wenigen Zelltypen vor, wie z.B. aktivierten Immunzellen, sowie Monozyten und dendritischen Zellen (Arch et al., 1992; Lesley et al., 1993), proliferierenden Epithelzellen (Stamenkovic et al., 1991) und Keratinozyten (Picker et al., 1989; Stamenkovic et al., 1991). Verstärkt werden CD44 Varianten auf metastasierenden Tumorzellen exprimiert. Eine lösliche Form von CD44 wurde in Serum und Synovialflüssigkeit detektiert (Dalchau et al., 1980; Fraser et al., 1983).

## 2.7 Extrazelluläre Liganden von CD44

Hyaluronsäure (HA), ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, ist der am besten charakterisierte extrazelluläre Ligand von CD44 (Aruffo et al., 1990). Es handelt sich dabei um ein hydrophiles, lineares Polysaccharid, das ein scheinbares Molekulargewicht von bis zu 10000 kDa aufweist. Das Molekül setzt sich aus sich wiederholenden Einheiten von D-Glucuronsäure (1- $\beta$ -3) und N-Acetyl-D-glucosamin (1- $\beta$ -4) zusammen.

HA wird bevorzugt an der N-terminalen Link-Protein Domäne von CD44 gebunden (He et al., 1992). Allerdings ist auch eine Bindung von HA nahe der Transmembrandomäne möglich (Peach et al., 1993). Die Bindung von HA an die extrazelluläre Domäne von CD44 kann über ein C(X<sub>7</sub>)B-Motiv stattfinden (B repräsentiert eine der basische Aminosäure Arg oder Lys und X<sub>7</sub> eine beliebige Abfolge von AS) (Yang et al., 1994). CD44 fungiert demnach über eine Kombination der Link-Domäne und einer Folge positiv geladener AS als HA Rezeptor (Yang et al., 1994).

Die Bindung von HA an CD44 ist ein präzise regulierter Prozess. Obwohl alle CD44 Isoformen eine konservierte aminoterminal Domäne, die den Bereich zur Bindung von HA enthält, tragen, wird HA nicht immer konstitutiv gebunden. Insgesamt wurden drei Möglichkeiten der Bindung von HA an CD44 beschrieben (Lesley et al., 1992): 1) eine konstitutive Bindung: Expression von CD44 auf der Zelloberfläche ermöglicht HA-Bindung, 2) induzierbare Bindung: trotz der Präsenz von CD44 können die Zellen HA erst nach Behandlung mit CD44 spezifischen Antikörpern, Zytokinen oder Reagenzien wie Phorbol ester binden,

3) nicht-bindend: trotz Präsenz von CD44 kommt es unter keiner Bedingung zur Bindung von HA.

Unterschiede der einzelnen CD44 Isoformen bezüglich ihres Bindungsverhaltens für HA wurden beobachtet. CD44 v4-v7 zeigte eine höhere Bindungsaffinität als CD44s (Sleeman et al., 1997; Sleeman et al., 1996), was für eine Regulierung der Spezifität zur Bindung von HA durch alternatives Spleißen sprach (Sleeman et al., 1997). Am wahrscheinlichsten aber scheinen Unterschiede im Bindungsverhalten hervorgerufen durch verschiedene Arten und die Stärke der Glykosylierung. Durch Behandlung mit Neuraminidase wurde herausgefunden, dass Sialylierung von CD44 auf Monozyten die HA Bindung verhindert (Kato et al., 1995).

CD44 übernimmt bei der Internalisierung und beim Abbau von HA eine wichtige Funktion. So konnte gezeigt werden, dass Rinder-Chondrozyten, menschliche Alveolarmacrophagen und transformierte Maus-Fibroblasten markierte HA in Abhängigkeit von CD44 binden und internalisieren (Culty et al., 1992; Hua et al., 1993). Allerdings ist CD44 nicht in der Lage HA zu degradieren (Culty et al., 1992; Culty et al., 1994).

### **2.8 Intrazelluläre Bindungsproteine an CD44**

Zu den Proteinen, die an den zytoplasmatischen Bereich von CD44 binden, zählen Ankyrin, Merlin und Mitglieder der ERM-Familie (Ezrin, Radixin und Moesin). Ankyrin wird in einem Bereich zwischen Asn<sup>304</sup> und Leu<sup>318</sup> (in der Maus AS 305-319) gebunden (Lokeshwar et al., 1994).

Die Interaktion des zytoplasmatischen Endes von CD44 mit dem N-terminalen Ende der ERM Proteine wurde durch Präzipitationsexperimente in BHK Zellen (Tsukita et al., 1994) und *in vitro* Studien (Hirao et al., 1996) gezeigt. Sie dient der Regulation der Zellmigration. Sowohl Mitglieder der ERM-Familie als auch Ankyrin dienen als „Verbindung“ der Zellmembran mit dem Zytoskelett (Tsukita et al., 1994). Während die ERM Proteine eher tumorpromovierend sind, gibt es ein Tumorsuppressorprotein, Merlin, das eine Ähnlichkeit zu den ERM Proteinen zeigt. Das Protein Ezrin ist mit Merlin zu 46% identisch. Die größte Homologie ist im N-terminalen Bereich vorhanden, der für die Bindung an die

Transmembranproteine benötigt wird. Der C-Terminus, der in Ezrin zur Assoziation mit dem Zytoskelett verwendet wird, divergiert in Merlin und hat keine Zytoskelett-Bindungsaktivität. Interessanterweise sind unter Konditionen, in denen Merlin aktiv ist, die ERM Proteine nicht aktiv. Bei hoher Zelldichte liegt Merlin im aktivierten, dephosphorylierten Zustand vor (Morrison et al., 2001). Die Zellen unterliegen dann einem Proliferationsstopp und vermitteln damit Kontaktinhibition. Für diese wachstumshemmende Funktion bindet Merlin an CD44. In Merlin-defizienten Zellen fällt daher Kontaktinhibition aus. Die Überexpression des zytoplasmatischen Teils von CD44 und damit die Sequestrierung von Merlin führte zu einer Inhibierung der Wirkung als Tumorsuppressor (Morrison et al., 2001).

## **2.9 Funktionen von CD44**

CD44 Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Organentwicklung, der Entwicklung und Funktion des Immunsystems und Hämatopoiese, sowie in der Tumorbildung.

### **2.9.1 CD44 und Entzündungsreaktionen**

In Entzündungsreaktionen spielen CD44 sowie der Ligand HA auf verschiedene Weise eine kausale Rolle (Pure and Cuff, 2001). Während Entzündungsprozessen exprimieren Leukozyten und Parenchymzellen verstärkt CD44 (Foster et al., 1998). Der Verlust von CD44 scheint ein Hauptkriterium zu sein um CD44- und HA-abhängige Zell-Matrix Interaktionen an den Entzündungsstellen zu vermeiden. Ein Antikörper, der die Bindung von HA an CD44 hemmt, führte zu einer Abnahme der Entzündungssymptome, ein Antikörper, der die Bindung von HA an CD44 verstärkt, zu einer Verschlechterung der Symptomatik (Mikecz et al., 1999).

In einem Modell für Multiple Sklerose und allergische Encephalomyelitis in der Maus, haben CD44 Antikörper bewirkt, dass T-Zellen die Blut-Hirn Schranke nicht passieren und somit keine Läsionen im Gehirn verursachen können (Brocke et al., 1999).

CD44 Antikörper konnten außerdem in der Maus entzündliche Darm-erkrankungen (bowel disease) (Camp et al., 1993), Hautentzündungen (Camp et al., 1993) und IL-2-induziertes Vascular Leak Syndrome (VLS) (Rafi-Janajreh et al., 1999) inhibieren.

Expression von HA in kultivierten Endothelzellen und primären Endothezellkulturen ist nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder dem Lipopolysaccharid aus Bakterien deutlich erhöht. Diese Induktion scheint auf Endothelzellen begrenzt zu sein, die von mikrovaskulären und nicht von größeren Gefäßen stammen (Mohamadzadeh et al., 1998).

### **2.9.2 CD44 in der Hämatopoiese**

In Langzeitknochenmarkkulturen (Long Term Bone Marrow Culture - LTBMCS) zum Studium der Prozesse während der Hämatopoiese führten einige CD44 Antikörper zur einer Inhibierung der Hämatopoiese (Khaldoyanidi et al., 1996; Miyake et al., 1990), andere zu einer Steigerung (Ghaffari et al., 1997; Khaldoyanidi et al., 1996; Rossbach et al., 1996). Monoklonale Antikörper gegen CD44 v4 und CD44 v6 stimulierten die Myelopoiese, Antikörper gegen CD44 v6 außerdem auch die Lymphopoiese. Beide Antikörper förderten die Produktion von Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), der CD44 v6 Antikörper auch die Produktion von Interleukin-6 (IL-6). Man nimmt an, dass die Bindung der Antikörper an CD44 Isoformen mit CD44 v4 und CD44 v6 Epitopen vermutlich Ligandenbindung nachahmen und dadurch die Produktion von GM-CSF oder IL-6 stimulieren (Khaldoyanidi et al., 2002).

### **2.9.3 CD44 als Homingrezeptor**

Ein weiterer Prozess, an dem CD44 Proteine beteiligt sind, ist das Lymphozyten Homing, dem Vorgang der Rückkehr von Lymphozyten aus der Blutbahn in die lymphatischen Organe (Shimizu and Shaw, 1991; Zöller, 1996). CD44 fungiert als Homingrezeptor für wandernde Thymus-Vorläuferzellen. CD44<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks, die mit Antikörpern behandelt wurde, konnten sich nicht mehr im Thymus von bestrahlten Mäusen ansiedeln (O'Neill, 1989). Dagegen war die Wanderung von Lymphozyten in Lymphknoten und in andere Organe nicht

betroffen (Camp et al., 1993). Eine Beteiligung am Homing zeigte auch die Verwendung des CD44 Antikörpers Hermes-1, der die Anheftung humaner Lymphozyten an Venolen mit hohem Endothel (high endothelial venules - HEV), beeinflusst (Jalkanen et al., 1986). MEL-14, ein spezifischer Antikörper gegen Rezeptoren des Lymphozyten Homings, zeigte eine Kreuzreaktion mit CD44 (Jalkanen et al., 1987). Allerdings wurde durch die Klonierung des Gens, das für das MEL-14 Protein kodiert, nicht CD44, sondern L-Selectin als Lymphozyten Homing Rezeptor identifiziert (Lasky et al., 1989; Siegelman et al., 1989). Trotzdem ist CD44 beim Lymphozytenhoming beteiligt, wenn auch nicht als Homing Rezeptor.

Außerdem ist CD44 in der Extravasation von Lymphozyten involviert. Dies geschieht durch „Lymphocyte Rolling“, einem Vorgang bei den Lymphozyten auf der Oberfläche von Endothelzellen in Lymphbahnen entlang wandern. Das Rolling konnte durch Behandlung mit CD44 spezifischen Antikörpern, aber auch durch HA verhindert werden (DeGrendele et al., 1996).

Eine Glykoform von CD44 fungiert auf hematopoietischen Zellen als Ligand für L-Selectin (Dimitroff et al., 2000) und für E-Selectin (Dimitroff et al., 2001). In humanen hematopoietischen Vorläuferzellen wurde E-Selectin an N-Glykosylierungen von CD44s gebunden, während in einer Colonkarzinomzelllinie die relevante Interaktion an O-Glykosylierungen von CD44 Variantenproteinen stattfand (Hanley et al., 2005) .

#### **2.9.4 CD44 in der Embryonalentwicklung**

Da Adhäsionsrezeptoren unentbehrlich für die Bildung von Zellverbänden während der Embryonalentwicklung sind, ging man davon aus, dass CD44 auch hier eine tragende Funktion ausübt. CD44 Proteine übernehmen wichtige Aufgaben bei der Entwicklung der Extremitäten. Isoformen, die CD44 v3 enthalten, werden benötigt um den Mesenchymzellen die Wachstumsfaktor FGF-8 und FGF-4 zu präsentieren um somit deren Proliferation zu induzieren (Sherman et al., 1998). Die CD44 Isoformen sind zeitlich und räumlich mit FGF-8 und FGF-4 in den Randleistenzellen ko-lokalisiert. Sie binden die FGFs in Abhängigkeit von Heparinsulfat Modifikationen. In einem Transplantations-

experiment wurden die Randleistenzellen entfernt, mit CD44 spezifischen Antikörpern behandelt und wieder an der Entnahmestelle eingepflanzt. Durch die Behandlung mit CD44 Antikörpern wurde die Knospung/weitere Entwicklung der Extremität verhindert. CD44s wird auf Mesenchymzellen der Extremitäten der Ratte während der frühen Extremitätenentwicklung exprimiert. Die Funktion von CD44s könnte in der Adhäsion von HA innerhalb des Mesenchyms oder aber in der Degradierung von HA bestehen.

Desweiteren sind CD44 Proteine in der Migration unreifer T-Zellen und deren Reifung im Thymus beteiligt. Während der Entwicklung des Thymus können sich nur fötale Leberzellen (FL-Zellen), die CD44 exprimieren und adulte Zellen des Knochenmarks im fötalen Thymusstroma ansiedeln und zu reifen T-Zellen entwickeln (Kawakami et al., 1999).

CD44s wurde sowohl auf Epithelzellen des Thymus als auch auf Thymozyten 8 Wochen nach Beginn der Embryonalentwicklung detektiert. Zellen, die v4, v6 und v9 CD44 Isoformen exprimieren, treten später in der Embryonalentwicklung auf (10 Wochen nach Befruchtung). Antikörper gegen diese Isoformen verhinderten die Entwicklung der Thymozyten in fötalen Organkulturen (Mackay et al., 1994; Terpe et al., 1994).

### **2.10 CD44 im intakten Organismus**

Die Vielseitigkeit der Funktionen, die CD44 Moleküle übernehmen, ließ drastische Folgen bei der Deletion des CD44 Gens vermuten. *In vivo* Studien wurden anhand von Keimbahndeletionen unterschiedlicher Regionen des CD44 Gens (Camenisch et al., 2000; Protin et al., 1999; Schmits et al., 1997; Wittig et al., 2000) oder anhand transgener Expression von antisense RNA durchgeführt (Kaya et al., 1997; Kaya et al., 1999).

#### **2.10.1 CD44 knock-out Mäuse**

CD44 knock-out Mäuse wurden durch Deletion des 3'Endes von Exon 2 und des gesamten Exon 3 des CD44 Gens und durch Einbau einer Neomycinkassette erzeugt. Erstaunlich war der Befund, dass diese Mäuse lebensfähig waren und einen normalen Entwicklungsverlauf zeigten. Sie wiesen lediglich einen relativ



geringfügigen Phänotyp auf, der sich vor allem auf die Entwicklung des hämatopoietischen Systems beschränkt, sowie Homing oder Migration von Lymphozyten zu Lymphknoten oder Thymus und Ansiedlung im Knochenmark (Schmits et al., 1997).

Eine weitere knock-out Maus wurde durch Einbringen einer lacZ/neo Kasette in die für das Leaderpeptid kodierenden Sequenzen erzeugt. Auch diese Mäuse entwickelten sich normal ohne einen bemerkenswerten Phänotyp. Nur CD44-defiziente Lymphozyten waren in ihrer Immigration in den adulten Thymus beeinträchtigt, obwohl die Entwicklung der Lymphozyten anscheinend nicht betroffen ist (Protin et al., 1999).

Interessanterweise überleben aktivierte T-Zellen länger in knock-out Tieren als im Wildtyp (Chen et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Hepatitisresistenz, die sich durch eine mögliche Rolle von CD44 in der pro-apoptotischen Signalübermittlung erklären lässt. Dies würde auch mit der Beobachtung einhergehen, dass CD44 Spleißvarianten in T-Zellen von Fas-defizienten Mäusen erhöht sind, nachdem sie mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden (Fuse et al., 1997).

Die Infektion mit *Cryptosporidium parvum* führte zu einer verstärkten Granulombildung in knock-out Tieren, was auf Defizite der T-Zell Funktion schließen lässt (Schmits et al., 1997).

In einer anderen Studie hatte die intratracheale Gabe von Bleomycin eine erhöhte Ansammlung von apoptotischen Neutrophilen und HA Fragmenten in knock-out Tieren zur Folge (Teder et al., 2002). Durch Injektion von CD44-positiven Leukozyten konnte der Tod der Tiere vermieden werden, was für eine Beteiligung von CD44 in anti-inflammatorischen Prozessen spricht.

### **2.10.2 Selektive Suppression von CD44 in Keratinozyten**

Widersprüchliche Resultate zu denen mit CD44 knock-out Mäusen lieferten Mäuse, die durch Expression von antisense CD44 cDNA unter der Kontrolle eines Keratin-5-Promotors, der ab Stadium E11.5 der Embryonalentwicklung aktiv ist, erhalten wurden (Kaya et al., 1997). Entgegen den knock-out Tieren, die

sich normal entwickelten, war in diesen Mäusen die Haut verdickt und brüchig. Auch wiesen die „Keratinozytenmäuse“ eine verzögerte Wundheilung und Defizite in der Haarentwicklung auf. Außerdem kam es zu einer extrem verstärkten Ansammlung von HA in der superfiziellen Dermis und im cornealen Stroma. Nach Behandlung mit karzinogenen Substanzen blieb eine Hyperplasie der Epidermis aus, wie sie in normalen Mäusen beobachtet wird.

Diese widersprüchlichen Resultate zwischen den knock-out und „Keratinozyten“-Mäusen legen die Vermutung nahe, dass der Verlust von CD44 während der frühen und späten Embryogenese unterschiedliche Konsequenzen hat. Eine Erklärung dafür könnte die Übernahme der Funktionen von CD44 durch ein oder mehrere Kompensationsmoleküle in der frühen Embryogenese sein, bevor die wichtigsten Differenzierungsvorgänge stattgefunden haben, während in späteren Stadien (wenn der Keratin-5-Promotor aktiv wird, siehe oben) eine Kompensation nicht mehr möglich ist. Zu diesem Schluss führte auch eine Studie über die Extremitätenentwicklung in CD44 knock-out Mäusen: hier wurde gezeigt, dass mesenchymale Zellen der Extremitätenknospen von Wildtyp-Tieren heparin-sulfatmodifiziertes CD44 und FGF zur Proliferation benötigen, dagegen proliferierten mesenchymale Zellen der Tiere auf Behandlung mit FGF alleine (Ponta et al., 2003).

### **2.11 CD44 und seine Rolle in der Tumorigenese**

Isoformen von CD44, vor allem variante, nehmen bei der Krebsentwicklung eine bedeutende Stellung ein. Der Nachweis, dass die CD44 v4-v7 Isoform für die Metastasierung in Pankreastumoren der Ratte wichtig ist (Günthert et al., 1991), führte zu zahlreichen Studien, in denen CD44 und seine Spleißvarianten als diagnostischer und prognostischer Parameter für Tumore untersucht wurde. Eine verstärkte CD44 v6 Expression in colorektalen Tumoren ging mit einer erhöhten Tumorprogression bzw. einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium und Metastasierung einher (Heider et al., 1993; Mulder et al., 1994; Tanabe et al., 1995; Wielenga et al., 1993). Eine Expression von CD44 Isoformen auf Cervixkarzinomen, die v7, v8 und vor allem v6 enthalten, ist mit einer deutlich

schlechteren Prognose assoziiert (Kainz et al., 1995). Variante Formen von CD44 eignen sich bei vielen Krebsarten, wie z.B. Darmkrebs, Brustkrebs und Melanomen als diagnostische und prognostische Marker (Kaufmann et al., 1995; Simon et al., 1996; Wielenga et al., 1993).

Allerdings kann auch CD44s in Tumorwachstum involviert sein. Eine Burkitt Lymphom Zelllinie, die keine CD44 Isoformen exprimiert, führte nicht zur Metastasierung in immunodefizienten Mäusen, im Gegensatz zu Zellen, die CD44s exprimierten (Sy et al., 1991). Wurden diese Zellen mit anderen CD44 Varianten transfiziert (z.B. CD44 v8-v10), nahm die Fähigkeit Tumore zu bilden ab (Sy et al., 1991; Sy et al., 1992). Expression von CD44s in humanen Non-Hodgkin's Lymphomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Pals et al., 1997). In CD44-negativen Melanom Zelllinien führte die Transfektion von CD44s zu Tumorwachstum nach subkutaner Injektion in Mäuse, jedoch nicht die Transfektion von CD44 v8-v10. Lokale Injektion eines löslichen CD44-Ig Fusionsproteins führte zur Inhibierung des Tumorwachstums (Bartolazzi et al., 1994).

Kausal konnte die Bedeutung von CD44 für Tumormetastasierung mit CD44 v6 spezifischen Antikörpern und Transfektionen gezeigt werden (Günthert et al., 1991; Seiter et al., 1993). Seine Bedeutung konnte auch durch Kreuzungsexperimente von CD44 knock-out Mäusen mit p53<sup>+tm1</sup> Mäusen (Mäuse mit tm1 (targeted mutation 1) Mutation des p53 Gens) bestätigt werden. Diese Tiere entwickelten benigne Osteosarkome, die Kontrolltiere hingegen maligne Tumore. Allerdings war die Tumorentstehung nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtungen bestätigen, dass CD44 nicht essentiell für Ausbildung des Tumors ist, jedoch für den Metastasierungsprozess (Weber et al., 2002).

Deshalb waren die Befunde, dass CD44 auch als Tumorsuppressor fungieren kann, sehr überraschend. Im Gegensatz zu Zellen, die sich aus dem Neuralrohr ableiten, exprimieren Neuroblastomzellen kein CD44. Diese Repression der CD44 Expression könnte der Grund für ihr hohes metastatisches Potential sein (Shtivelman and Bishop, 1991). Durch Überexpression von CD44s in einer Prostata Karzinom Zelllinie wurde die Metastasierung unterdrückt (Gao et al., 1997). SV40-transformierte Fibroblasten erwiesen sich als tumorigen in

Nacktmäusen. Wurden diese Zellen mit einem retroviralen Konstrukt infiziert, das CD44s exprimiert, so kam es zu einer drastischen Inhibierung des Tumorwachstums (Schmits et al., 1997).

### **2.12 Signaltransduktion durch CD44**

Obwohl Adhäsionsproteine keine Aktivierungsdomänen wie Wachstumsfaktorrezeptoren besitzen, sind viele an der Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere beteiligt. Dass CD44 in der Signaltransduktion involviert ist, konnte in Lymphozyten gezeigt werden. Eine durch Antikörper gegen CD44 ausgelöste Signalkaskade ähnelt der durch Aktivierung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex induzierten Signalweiterleitung. Es kam zu einer verstärkten Phosphorylierung der Tyrosinkinase p56lck (Lck), sowie zur Phosphorylierung von ZAP-70, dem Substrat von Lck (Ilangumaran et al., 1998; Taher et al., 1996). Die Tyrosinkinase Lck ist durch Lipidmodifikationen in der Plasmamembran verankert und ist für Interaktionen mit anderen Transmembranrezeptoren (z.B. CD4) bekannt. Sie kann mit CD44 ko-immunopräzipitiert werden (Taher et al., 1996). CD44 kann auf verschiedene Art und Weise in die Signaltransduktion eingreifen.

#### **2.12.1 Interaktion von CD44 und Matrixmetalloproteinasen**

CD44 assoziiert an der Oberfläche von Melanomzellen und Mammakarzinomzellen mit einer proteolytisch aktiven Form der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9). Diese Assoziation führt zum Abbau von Collagen IV *in vitro* und vermittelt die Tumorzellinvasion von G8 Myoblasten (Yu and Stamenkovic, 1999). Der entscheidende Prozess scheint allerdings die Spaltung des inaktiven Vorläufermoleküls des Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in die aktive Form zu sein, der letztlich zur Invasivität führt (Yu and Stamenkovic, 2000).

Heparansulfat modifizierte CD44 v3 Isoformen bilden zusammen mit MMP-7 und dem Vorläufer des Heparin-bindenden Epidermal growth factor (pro-HB-EGF) einen Komplex auf Mammakarzinomzellen, der zur proteolytischen Spaltung des Vorläufers zu HB-EGF führt (Yu et al., 2002). HB-EGF aktiviert seinen

spezifischen Rezeptor ErbB4, was letztendlich zum Überleben von Zellen und zur Neubildung von weiblichem Fortpflanzungsgewebe führt (Yu et al., 2002). Dies ist eine Erklärung, weshalb in schwangeren CD44 knock-out Mäusen die Laktation post partum beeinträchtigt war und außerdem eine verzögerte Rückbildung der Plazenta nach der Schwangerschaft und der Brustdrüsenzellen nach der Stillperiode beobachtet wurde. Letztendlich führte die Rekrutierung von MMP-7 durch CD44 zur Unterdrückung von Apoptose, wie sie auch in Tumorzellen beobachtet wird (Yu et al., 2002). Demnach kann CD44 als „Plattform“ für Enzyme wie Metalloproteinasen fungieren, damit diese ihre Funktion in der Signaltransduktion durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren ausüben können.

### **2.12.2 CD44 als Ko-Rezeptor**

Eine Vielzahl an extrazellulären Signalen wird von Zellen durch Rezeptortyrosinkinasen, wie dem Met Rezeptor, wahrgenommen. Deren zytoplasmatische Domäne verfügt über eine katalytische Kinaseaktivität und Phosphorylierungsmotive, die bei Aktivierung des Rezeptors zur „Plattform“ für Moleküle zur intrazellulären Signalweiterleitung werden (siehe Abb. 1). Interessanterweise benötigen zumindest einige Rezeptortyrosinkinasen einen sog. Ko-Rezeptor zu ihrer Aktivierung. Beispielsweise kollaboriert das Adhäsionsmolekül NCAM mit dem FGF Rezeptor 4 (FGFR4) (Cavallaro et al., 2001). Der Ko-Rezeptor, der selbst über keine Kinaseaktivität verfügt, wird zur Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase benötigt.

Eine solche Funktion als Ko-Rezeptor übt auch CD44 aus. Isoformen von CD44, die Exon v6 exprimieren, agieren als Ko-Rezeptor für die Rezeptortyrosinkinase Met (Orian-Rousseau et al., 2002). In zahlreichen Zelllinien, einschließlich unterschiedlichen Tumorzelllinien, sowie in primären Keratinozyten, kommt es zur Ausbildung eines trimeren Komplexes zwischen CD44, Met und seinem Liganden HGF. Die durch HGF induzierte Signaltransduktionskaskade von Met kann durch Antikörper gegen CD44 Exon v6 kodierte Sequenzen blockiert werden (Orian-Rousseau et al., 2002). Die nicht metastasierende AS-Pankreaszelllinie Bsp73AS, die keine CD44 Varianten exprimiert, jedoch den Met

Rezeptor, reagiert nicht auf den Liganden HGF. Werden diese Zellen mit einer CD44 Isoform transfiziert, die von Exon v6 kodierte Sequenzen enthält, so kann Met aktiviert werden. Aktivierung von Met hängt ausschließlich von der Präsenz der von Exon v6 kodierten Proteinsequenz ab. Solche CD44 Isoformen katalysieren zwei unterschiedliche und unabhängige Schritte der HGF abhängigen Met Signalkaskade: Für die Autophosphorylierung von Met wird die extrazelluläre Domäne von CD44 benötigt, das zytoplasmatische Ende von CD44 wird benötigt um eine erfolgreiche Signalweiterleitung ausgehend von dem aktivierten Met Rezeptor zu gewährleisten (Orian-Rousseau et al., 2002). Dazu muss der zytoplasmatische Teil von CD44 mit dem Aktin-bindenden Protein Ezrin assoziieren, was auf eine Beteiligung des Zytoskeletts bei der Signaltransduktion hinweist (Orian-Rousseau et al., 2002).

### 3. Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Funktion von CD44 v6 als Ko-Rezeptor. Zunächst sollte der Schritt untersucht werden durch den CD44 die Aktivierung des Met Rezeptors erlaubt. Hierzu sollten Bindungsstudien mit HGF durchgeführt werden. Desweiteren sollte aufgeklärt werden, ob CD44 exklusiv für die Rezeptortyrosinkinase Met als Ko-Rezeptor fungiert oder ob es diese Aufgabe auch für weitere Mitglieder der Met Rezeptor Familie übernimmt. Außerdem sollte die exakte Sequenz des v6 Bereiches ermittelt werden, der für die Aktivierung von Met herangezogen wird. Dies sollte durch schrittweise Mutation der kompletten CD44 v6 Sequenz, sog. Linker Scan Mutation, erreicht werden. Schließlich sollten Peptide identifiziert werden, die die Rezeptortyrosinkinasen (Met evtl. Ron) blockieren. Solche Peptide sollten auch auf ihr Potential zur Hemmung metastasierungsrelevanter Prozesse getestet werden, die durch Met oder Ron induziert werden.

## Material und Methoden

### 1. Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien lagen in der höchst möglichen Reinheitsstufe vor. Für wässrige Lösungen wurde Wasser verwendet, das zuvor entsalzt wurde. Die Lösungen wurden in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert bzw. sterilgefiltert.

#### 1.1 Reagenzien, Medien und Zusätze

Acrylamid+N,N'-Methylenbisacrylamid (30%:0,8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roche, Mannheim
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Roth, Karlsruhe
Bacto Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Bacto nutrient broth (NaCl frei)	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (bovine serum albumin)	PAA, Marburg
1-Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbeccos modified Eagle's medium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Flucka, Neu-Ulm
dNTP	Promega, Heidelberg
DTT(Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Easy Pure Kit	Biozym, Oldendorf
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	PAA, Marburg
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe,
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Roche, Mannheim
IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D- galactopyranosid)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe



Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadate	Merck, Darmstadt
Oligonucleotidprimer	MWG, Ebersberg, Sigma, Deisenhofen
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml Penicillin, 10000µg/ml Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Quiagen-Plasmid-Maxi-Kit	Quiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin 0,25%	Difco, Detroit
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto- -pyranosid)	Sigma, Deisenhofen

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analytischer Reinheit von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

## 1.2 Marker

### DNA-Marker

1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

### Protein-Marker

SeeBluePlus 2 prestained protein ladder (4-250 kDa)	Invitrogen, Karlsruhe
BenchMark prestained protein ladder (8-180 kDa)	Invitrogen, Karlsruhe

### 1.3 Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Spezialreagenzien

rekombinantes humanes HGF	R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes humanes MSP	R&D Systems, Wiesbaden
PDGF	Calbiochem, Darmstadt
MAPK-Inhibitor UO126	Promega, Mannheim
Hyaluronsäure, Healon (MW: 4-5x10 <sup>3</sup> kDa)	Pharmacia&Upjohn, St-Louis; USA
ECL-Detection Kit	Amersham, Freiburg
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Bonn
Matrigel	BD Bioscience, Heidelberg

### 1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarose Gelelektrophorese Apparatur	PeqLab, Erlangem
Bakterien Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Bakterien-Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator Steri Cult 200	Labotech, Göttingen
Cryotubes	Greiner, Frickenhausen
Eagle Eye	Stratagene, La Jolla, USA
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elektroporator	BioRad, München
Elisa Reader ELX 808	Biotek, Bad Friedrichshall
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Kontron-Hermle-Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckmann, Stuttgart
Kühlzentrifuge Hermle ZK 401	Hermle, Gosheim
Megafuge1.0	Heraeus, Hanau
Netzgerät Power-Supply	BioRad, München
PCR-Cycler (Gene Amp 2400)	Perkin, Elmer
PCR Reaktionsgefäße	Stein, Wilferdingen
Pipetten Pipetman	Gilson, Langenfelden
Röntgenfilm Hyperfilm ECL&MP	Amersham Buchler, Braunschweig
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polystyrenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Schüttler	Heidolph, Kehlheim
Spektralphotometer (Spektol UV/Vis)	Zeiss, Jena
Sterilfilter	Millipore, Bradford, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Transfer Membran Immobilon-P (PVDF)	Millipore, Bredford, USA
Transwell- Kammer	Costar
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg

Whatman 3 MM-Papier	Bender&Hohbein, Karlsruhe
Westernblot Transferkammer	BioRad, München
Vortex	Bender&Hohbein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen

## 1.5 Bakterien

### **E.coli DH5 $\alpha$ :**

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie;

Genotyp: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>)  
*phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1*

Invitorgen, Karlsruhe

### **E.coli XL1 Blue:**

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie, elektroporationskompetent

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1-hsdR17 supE44 relA1 lac*

[F 'pro AB lac<sup>9</sup>Z $\Delta$ M15T<sub>n</sub>10(Tet') ]

Stratagene, La Jolla, USA

## 1.6 DNA-modifizierende Enzyme

Pwo Polymerase	Roche, Mannheim
Pfu Polymerase	Stratagene, Amsterdam
Platinum Polymerase	Invitorgen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	Invitrogen, Karlsruhe

## 1.7 Plasmidkonstrukte

**pGKs6:** Das Plasmidkonstrukt pGKs6 wurde von Dr. Jonathan Sleeman zur Verfügung gestellt. pGKs6 enthält den Phosphoglycerat Kinase Promoter und die CD44 standard type cDNA einschließlich dem varianten Exon v6. Das Konstrukt wurde angefertigt durch Schneiden der pGKvKassette mit Aval und BglIII und anschließender Ligation mit einem kleinen Fragment der pSVKassette, das durch Schneiden mit Aval und BglIII erhalten wurde.

**pBabe:** Vektor, der Pyromycinresistenz trägt, und zur Selektion verwendet wurde.

## 1.8 Oligonukleotide

**DNA-Oligonukleotidprimer** (Die Notation erfolgte gemäß 5' nach 3')

### Primer für Mutagenese

Primer Is1

TTCTGTTGTGCTATTAGGGGCGCCTGCGGTGGCCAGGGTGCTCCC  
GGGAGCACCTGGCCACCGCAGGCGCCCCTAATAGCACAAACAGAA

Primer Is2

TGCTTCTTCTGTTGTAGCGGCCGCATCTGCCCAGGTGGC  
GCCACCTGGGCAGATGCGGCCGCTACAACAGAAGAAGC

Primer Is3

CTGGGTAGCTGCTTCAGCGGCCGCGCTATTAGGATCTGC  
GCAGATCCTAATAGCGCGGCCGCTGAAGCAGCTACCCAG

Primer Is4

CTTCTCCTTCTGGGTTCCGCCTGCTTCTGTTGTGCTATTAGG  
CCTAATAGCACAAACAGAAGCAGGCGGAACCCAGAACGAGAAG

Primer Is5

TCAAACCACCTTCTCAGCGGCCGCAGCTGCTTCTTCTGT  
ACAGAAGAAGCAGCTGCGGCCGCAGAGAAGGTGGTTTGA

Primer Is6

CCATTCAATTCTCAAAGCGGCCGCCTTCTGGGTAGCTGC  
GCAGCTACCCAGAAGGCGGCCGCTTTTGAAGAATGAATGG

Primer Is7

CTTCCCCTGCCATTCAGCGGCCGCCACTTCTCCTTCTG  
CAGAAGGAGAAGTGGGCGGCCGCAGAATGGCAGGGGAAG

Primer Is8

GGGTGGGTTCTTCCCAGCGGCCGCATTCTCAAACCACTT  
AAGTGGTTTGAAGAATGCGGCCGCTGGGAAGAACCCACCC

Primer Is9

ACTTGGGGTGGGTGGAGCGGCCGCCTGCCATTCATTCTC  
GAGAATGAATGGCAGGCGGCCGCTCCACCCACCCCAAGT

Primer Is10

GGAGTCTTCACTTGGAGCGGCCGCGTTCTTCCCCTGCCA  
TGGCAGGGGAAGAACGCGGCCGCT CCAAGTGAAGACTCC

Primer Is11

TGTCACATGG (GAGTCAGCGGCCGCGGTGGGTGGGTTCTT  
AAGAACCACCCACCGCGGCCGCTGACTCCCATGTGACA

Primer Is12

TGTCCCTTCTGTCACAGCGGCCGCTTACTTGGGGTGGG  
CCCACCCCAAGTGAAGCGGCCGCTGTGACAGAAGGGACA

Primer Is13

TCACCCAGTTGTCCCAGCGGCCGCATGGGAGTCTTCACT  
AGTGAAGACTCCCATGCGGCCGCTGGGACAACTGGGTGA

Primer Is14

GAGTCTCCATCACCCAGCGGCCGCTTCTGTACATGGGA  
TCCCATGTGACAGAAGCGGCCGCTGGGTGATGGAGACTC

Primer Is8 1,2:

CAAGAAGGGGACCGCCGCTAAGAGTTTGGTGAA  
TTCACCAAACCTTAGCGGCGGTCCCCTTCTTG

Primer Is8 2,3

ACCCAAGAAGGGCGCCGCAAGTAAGAGTTTGGT  
ACCAAACCTTACTTGCGGCGCCCTTCTTGGGT

Primer Is8.1

CAAGAAGGGGACGGTCGCTAAGAGTTTGGTGAA  
TTCACCAAACCTTAGCGACCGTCCCCTTCTTG

Primer Is8.2

ACCCAAGAAGGGGACCGCAAGTAAGAGTTTGGT  
ACCAAACCTTACTTGCGGTCCCCTTCTTGGGT

Primer Is8.3

CCCACCCAGAATGGCGCGGTAAGTAAGAGTTT  
AAACTCTAACTTACCGCGCCCTTCTTGGGTGGG

**Primer für Sequenzierung:** GGA TCC ACC ATT GAG AAG AGC

**siRNA Oligonukleotide:**

control (non-silencing) siRNA

Quiagen,Hilden

AATTCTCCGAACGTGTCACGT

CD44 v6 siRNA

AAGCAGCTACCCAGAAGGAGA

MWG, Ebersberg

### 1.9 Antikörper

Primärantikörper	Isotyp	Epitop	Firma
phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204)	IgG <sub>1</sub> ; polyklonal aus dem Kaninchen	phosphoryliertes Erk1/2 bei Ratte, Mensch, Maus,	Cell signaling, Beverly; England
Erk1 (K-23): sc-94	IgG <sub>1</sub> ; polyklonal aus dem Kaninchen	Erk1/2 bei Ratte, Mensch, Maus,	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
Ron β (C-20): sc-322	IgG <sub>1</sub> ; polyklonal aus dem Kaninchen	Epitop im C-Terminus von humanem Ron	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
hMet (C-12): sc-161	IgG <sub>2a</sub> ; monoklonal aus der Maus	humanes cMet	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
mMet (B-2): sc-8057	IgG <sub>2a</sub> ; monoklonal aus der Maus	murines cMet, Ratten cMet	Santa Cruz, Heidelberg; Deutschland
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	IgG <sub>2bκ</sub> ; monoklonal aus der Maus	Tyrosin phosphorylierte Proteine	Biomol, Hamburg, Deutschland
VFF18, human anti-CD44 v6	IgG <sub>1</sub> ; monoklonal aus der Maus	von Exon v6 kodiertes Epitop in CD44 v Isoformen	Bender, Wien; Österreich
IM7 pan CD44	IgG <sub>2bκ</sub> ; monoklonal aus der Maus	alle murinen CD44 Isoformen	von Hybridomen isoliert
CD44 5G8	IgG <sub>1</sub> ; monoklonal aus der Maus	Epitop 15 von Ratten CD44	von Hybridomen isoliert
CD44 KlonJ173	IgG <sub>1</sub> ; monoklonal aus der Maus	humanes CD44	Immunotech, Marseille; Frankreich
CD44 v6 Klon 1.1ASML	IgG <sub>1</sub> ; monoklonal aus der Maus	von Exon v6 kodiertes Epitop auf CD44 v6 Isoformen der Ratte	
Hermes 3	IgG <sub>1</sub> ; monoklonal aus der Maus	alle humane CD44 Isoformen	erhalten von Sirpa Jalkanen, Turku, Finnland
PI3K	IgG <sub>1</sub> ; polyklonal aus dem Kaninchen	gegen AS333-430 von PI3K p85 $\alpha$ humanen Ursprungs gerichtet	Santa Cruz

#### Sekundärantikörper:

HRP-Mouse IgG  
 HRP-Rat IgG  
 HRP-Rabbit IgG  
 FITC-Streptavidin

Dako, Hamburg  
 Dako, Hamburg  
 Dako, Hamburg  
 Dako, Hamburg

Sekundärantikörper wurden in der Regel in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

### 1.10 Zelllinien

Name	Herkunft	Kulturmedium	Quelle
BSp73AS10 (AS)	Ratten Pankreas-Karzinom	RPMI1640, 10%FCS	(Günthert et al., 1991)
ASv4-v7	AS10 mit CD44v4-v7 transfiziert, ohne Exon 15	RPMI1640, 10%FCS, 0,3 g/l G418	(Günthert et al., 1991)
ASv6	AS10 mit CD44v6 transfiziert, mit Exon 15	RPMI1640, 10%FCS, 0,3 g/l G418	(Günthert et al., 1991)
HT29	humanes Colon-Karzinom	DMEM, 10%FCS	erhalten von A. Zweibaum, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Frankreich
HCT116	humanes Colonkarzinom	McCoy's, 10% FCS	American Tissue Culture Collection, ATCC, Wesel; Deutschland
293	humane Nierenzellen	DMEM, 10%FCS	American Tissue Culture Collection, ATCC, Wesel; Deutschland
AS Is1-Is14	AS10 transfiziert mit den Mutanten Is1-Is14 und pBabe, einem Vektor, der Pyromycinresistenz trägt.	RPMI1640, 10% FCS, 1µg/ml Pyromycin	(Matzke et al., 2005)
T47D	humanes Mamma-karzinom	DMEM, 10%FCS	erhalten von M. Park, Montreal, Kanada
T47D2A	humanes Mamma-karzinom	DMEM, 10%FCS	erhalten von M. Park, Montreal, Kanada

### 1.12 Peptide

#### Peptide (Ratte)

A: WADPNSTTEEAATQ  
 B: KEKWFENEWQGKNP  
 C: PTPSEDSHYTEGTT  
 3mer: EWQ

Invitrogen; Karlsruhe  
 Invitrogen; Karlsruhe  
 Invitrogen; Karlsruhe  
 NMI, Tübingen

5mer rat: NEWQG	NMI, Tübingen
5mer mut rat: NAAAG	NMI, Tübingen
Is7mut rat: AAAEWQ	NMI, Tübingen
rat 5mer-2-Ala: NEAQQ	IBG, Forschungszentrum KA
rat 5mer-1-2-Ala: NAAQG	IBG, Forschungszentrum KA
rat 5mer-2-3-Ala: NEAAG	IBG, Forschungszentrum KA
5mer rat: NEWQG	IBG, Forschungszentrum KA

### Peptide (human)

A: QATPSSTTEETATQ	erhalten von G2M Cancer Drugs AG, Frankfurt;
B: KEQWFGNRWHEGYR	erhalten von G2M Cancer Drugs AG, Frankfurt
C: QTPREDSHSTTGTA	erhalten von G2M Cancer Drugs AG, Frankfurt
5mer hum: NRWHE	NMI, Tübingen
10mer human: WFGNRWHEGY	NMI, Tübingen
Is9mut hum: RWHAAA	NMI, Tübingen
hum 5mer-2-Ala: NRAHE	IBG, Forschungszentrum KA
hum 5mer-1-2-Ala: NAAHE	IBG, Forschungszentrum KA
hum 5mer-2-3-Ala: NRAAE	IBG, Forschungszentrum KA
5mer hum: NRWHE	IBG, Forschungszentrum KA
Kontrollpeptid: HNREQANLNSRTEETI	erhalten von Jonathan Sleeman, ITG, Forschungszentrum KA

### 1.12 Transfektionsreagenzien:

Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofektamine	Invitrogen, Karlsruhe
Tfx-50	Promega, Mannheim

### 1.13 Kulturmedien für Bakterien

**LB Agar:** 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Bactoagar

**LB-Selektivagar:** 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Bactoagar; 100 µg/ml Ampicillin

**LB-Medium:** 1% BactoTrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl

**LB-Selektiv-Medium:** 1% BactoTrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 100 µg/ml Ampicillin

**NZY+Broth:** 1% Casein Hydrolysat; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7 einstellen (2 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 4 mM Glucose werden erst vor Gebrauch zugegeben)

**SOB-Medium:** 1% Bacto-Trypton; 0,25% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 25 mM Kcl



**SOC-Medium:** 1% Bacto-Trypton; 0,25% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 25 mM KCl (2 mM MgSO<sub>4</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 4 mM Glucose werden erst kurz vor Gebrauch zugegeben)

**YENB-Medium:** 0,8% Bacto-nutrient broth; 0,75% Hefeextrakt

**2xYT:** 1,6% Bacto-Trypton; 10% Hefeextrakt; 1% NaCl

## 2. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologischen Standardmethoden und Standardlösungen wurden aus den Nachschlagewerken „Molecular Cloning“ von Maniatis et. al. bzw. „Molecular Cloning“ von Sambrook und Russel entnommen. Veränderte Protokolle sind angegeben.

### 2.1 Klonierung und Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Durch Klonierung können Fragmente genomischer DNA oder cDNA von Eukaryoten in Plasmide eingebracht werden. Die erzeugten ringförmigen DNA-Moleküle (Vektoren) werden in Bakterien, z.B. *E.coli*, eingeschleust. Plasmide replizieren, da sie einen eigenen Replikationsursprung besitzen (*origin of replication-ori*), unabhängig vom Bakterien-Chromosom und kommen deshalb in vielfacher Kopie in einer Zelle vor. Die Anzahl ist dabei abhängig von Art und Größe des Plasmids, sie variiert zwischen 20 und 1000. Bei der Zellteilung werden die Kopien auf die Tochterzellen übertragen, um dort wieder vermehrt zu werden. Durch die kurze Generationszeit von Bakterien (*E. coli*: 20 min) ist innerhalb weniger Stunden eine exponentielle Vervielfältigung des ursprünglichen DNA-Fragments zu erreichen. Die Plasmide eines Bakterienklons müssen vor weiteren Arbeitsschritten isoliert und aufgereinigt werden.

### 2.2 Präparation elektrokompetenter Bakterien

300 ml SOB-Medium werden mit 1ml einer ÜN-Kultur von *E.coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3-0.4 inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte werden sie für 3 min bei 37°C in einem Wasserbad wärmebehandelt und anschließend für 20 min bei 18-20°C inkubiert. Die

Bakterienlösung wird dann auf vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit 3500 x g, 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterienpellets in 50 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Es folgt nun eine erneute Zentrifugation. Der Waschschrift wird dreimal wiederholt. Zum Schluss wird das Pellet in 80 µl eiskaltem Wasser suspendiert, mit 7% (f.c.) DMSO versetzt, auf 40µl Aliquots verteilt und mit Flüssigstickstoff schockgefroren.

### 2.3 Präparation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien

*E.coli* werden durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht. Dabei wird die Zellwand poröser und es kommt zu einer gesteigerten Enzymaktivität. Durch Zugabe des Plasmids und anschließender Hitzeschockbehandlung kommt es zum Einbau der Plasmid-DNA.

300 ml SOB-Medium werden mit 1 ml einer ÜN-Kultur von *E.coli* angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3-0.4 inkubiert. Die Bakteriensuspension wird dann in ein 50 ml Falcon überführt und 10 min in Eiswasser gekühlt. Anschließend werden die Bakterien 10 min bei 3500 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Medium wird verworfen und die Bakterien in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Danach werden die resuspendierten Bakterien nach Zugabe von 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran erneut 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterien vorsichtig auf Eis in 100 mM CaCl<sub>2</sub>/ 20% Glycerol resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.4 Transformation elektrokompenter Bakterien

Pro Transformation wurde ein 40 µl Aliquot kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10-100 ng wässriger DNA-Lösung wurde der Bakterien-DNA-Mix in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,6 kV und einer Kapazität von 25 µF am Elektroporationsgerät (*E.coli*-Pulser) bei einer Zeitspanne von 3,5–5,0 ms. Danach wurden 450 µl raumtemperiertes LB-

Medium in die Küvette gegeben und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Die gewünschte Menge (in der Regel 100 µl) wurde auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Die langfristige Lagerung erfolgt als Glycerinkultur bei -80°C. Dafür werden 0,75 ml der Bakterienkultur mit 0,25 ml Glycerin (87%) versehen und eingefroren.

### **2.5 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien**

1 ng Plasmid DNA bzw. x µl eines 20 µl Ligationsansatzes werden zu 100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz für 45 s bei 42° C wärmebehandelt ("Hitzeschock") und mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt. Dann wird der Ansatz für 45 min bzw. 1 h bei 37°C geschüttelt. Das Volumen wird auf 100 µl eingengt und dann auf Agarplatten ausgestrichen.

### **2.6 Plasmid-DNA-Mini-Präparation**

Eine Methode, in Bakterien transformierte und amplifizierte Plasmid-DNA zu isolieren und zu reinigen, ist die Minipräp-Methode.

Dabei werden einzelne Bakterienkolonien, die auf einer Selektionsplatte als positiv erkannt wurden, über Nacht in je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml) bei 37°C (geschüttelt) hochgezüchtet. Je 1,5 ml dieser Flüssigkulturen werden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 5000 x g für 1 min abzentrifugiert. Das Medium wird verworfen. Die Bakterien werden in 100 µl Lysozymbelösung (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0; 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und anschließend mit 200 µl alkalischer SDS-Lsg. (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen und 5 min Inkubation bei RT werden dann 150 µl Natriumacetat zugegeben und nochmals vermischt. Die Reaktionsgefäße werden dann für 5 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran für 20 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Dies dient zur Sedimentation der Zellmembranen und der genomischen DNA der Bakterien, während die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt.

Der Überstand wird vollständig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird nach Zugabe von 1 ml Ethanol (100%) für 10 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 14.000 rpm und RT 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit Ethanol (70%) gewaschen und nochmals bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet an der Luft vollständig getrocknet und dann in 30-50 µl Wasser aufgenommen.

### **2.7 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation**

Bakterien werden in 200 ml Selektiv LB-Medium über nacht bei 37°C kultiviert (geschüttelt). Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgt nach dem Protokoll „Quiagen-Plasmid-Maxi-Kit“. Durch die Zugabe von SDS bildet sich ein klares Lysat, da SDS eine Solubilisierung der Phospholipide sowie der Proteinbestandteile bewirkt und NaOH, die dadurch freigesetzten Proteine und die DNA denaturiert. Die saure Kaliumacetatlösung bewirkt die Neutralisierung. Durch die hohe Salzkonzentration kommt es zum Ausfallen von SDS und damit die denaturierten Protein, chromosomale DNA und andere Zelltrümmer. Da die kleinere DNA kovalent geschlossen ist und in Lösung bleibt, kommt es zur Renaturierung und kann somit durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden. Eine Anionenaustauschsäule dient zur Immobilisierung der Plasmid-DNA, zur Aufreinigung. Schließlich wird die DNA eluiert. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol. Anschließend wird für 30 min bei >15000g und 4°C zentrifugiert, dann mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird die DNA in destilliertem Wasser oder TE (pH 8,0) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im Photometer bei 260 nm. Dazu wird die Probe 1:100 mit destilliertem Wasser versetzt und gemessen.

### **2.8 Phenol/Chloroform Extraktion**

Um Nukleinsäuren von Kontaminierung zu reinigen, wird eine Mischung von Phenol/Chloroform und Isopropanol (2-Propanol) im Verhältnis 25:24:1 auf die DNA enthaltende Lösung gegeben und gevortext.

Die Phasen werden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min getrennt. Die obere Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um einer nochmaligen Extraktion mit Chloroform/Isopropanol im Verhältnis 24:1 unterworfen zu werden. Nach wiederholter Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min wird die wäßrige Phase abgenommen und die DNA mit 100% Ethanol ausgefällt.

## **2.9 Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

### **Vollständiger Verdau**

Bakterien besitzen verschiedene Restriktionsenzyme zum Abbau von fremder DNA (z.B. als Abwehrmechanismus gegen Viren). Die Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA erfolgt dabei durch die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen. Das Schneiden der erkannten DNA kann unmittelbar in der Erkennungssequenz erfolgen. Enzyme dieses Typs werden in der molekularen Genetik verwendet.

Durch versetzte Schnitte der Einzelstränge können an den entstehenden DNA-Enden 3'- oder 5'-Überhänge erzeugt werden. Werden beide Stränge an der gleichen Position getrennt, sind die Enden glatt.

In einer wässrigen DNA-Lösung wird durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer-Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2-3U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Volumen des Restriktions-Verdaus beträgt mindestens das 10-fache des Volumens der zugegebenen Enzym-Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgt (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 1 h. Die verdauten Nukleinsäuren werden per Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt um im UV-Durchlicht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

### **Partieller Verdau**

Um einen partiellen Verdau durchführen zu können, darf die DNA nur einen Bruchteil der sonst üblichen Zeit mit dem Restriktionsenzym inkubiert werden.

Dabei wird das Restriktionsenzym in einer bestimmten Verdünnung eingesetzt um somit zu vermeiden, daß es zu einem vollständigen Verdau der DNA kommt. Die Bedingungen müssen ganz individuell auf Enzym und vorhandene DNA-Menge abgestimmt werden. Von Vorteil ist es, wenn gleich mehrere Ansätze zum Vergleich parallel durchgeführt werden.

### **2.10 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren besitzen durch die Ladung der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts eine negative Gesamtladung. Die DNA-/RNA-Moleküle wandern daher bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode (Pluspol). Je nach Größe der zu trennenden Nukleinsäure-Fragmente werden 0,6 - 1,5% Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nachdem das Gel etwas abgekühlt ist, wird 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel-Volumen zugegeben, bevor es in die vorbereitete horizontale Gel-Kammer gegossen wird. Nach dem Überschichten des Gels mit 1 x TAE-Puffer werden die mit 10 x Ladepuffer versehenen Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt mit 10 V/cm Gellänge. Im Anschluss kann man die aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmente, aufgrund des interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromids, unter UV-Licht sichtbar machen.

**5x DNA loading buffer:** 50% Glycerol, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 20 mg Bromphenolblau

**50x TAE (pH 7,9):** 2 M Tris, 100 mM EDTA, 2 M Essigsäure

### **2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde unter Verwendung des Easy Pure Kits (Biozym) durchgeführt. Die benötigte Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach werden 3 Volumen (100 mg - 100 µl) Melt Puffer zugegeben und 5 min bei 55°C inkubiert. Nach Zufügen von „Bind“ wird das Gemisch 5 min bei RT inkubiert und dann 5 s bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wird mit „Wash“-Lösung

gewaschen und nochmals 5 s bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wird dann in 10-20 µl. Wasser (bidest.) oder TE Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen, 5 min bei RT inkubiert und für 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

### **2.12 DNA-Präzipitation**

Zur DNA-Lösung werden 1/10 ihres Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und das Dreifache des Volumens an Ethanol (99%) gegeben. Danach wird „gevortext“ und für mindestens 5 min bei -25°C inkubiert. Anschließend zentrifugiert man bei 10000 x g für 15 min, wäscht mit 1 ml Ethanol (70%) und zentrifugiert bei 10000 x g für 5 min. Der überstehende Ethanol wird abgegossen und es wird nochmals bei 10000 x g für 3 min zentrifugiert. Der nun noch vorhandene Ethanol wird vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Das Pellet wird nun bei Raumtemperatur für 10–25 min getrocknet.

### **2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren besitzen typische Absorptionsmaxima im UV-Licht. Zur genauen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird die Absorption (A) von UV-Strahlung der Wellenlängen  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm beim Durchtreten einer Nukleinsäurelösung, im Abgleich gegen das jeweilige Lösungsmittel, in einem Spektralphotometer gemessen. Eine A<sub>260</sub>-Einheit entspricht dabei einer Konzentration von 50 mg/ml, einer RNA-Konzentration von 40 mg/ml und einer Einzelstrang-Oligonukleotid-Konzentration von 20 mg/ml.

Proteine, die als Verunreinigungen in Nukleinsäurelösungen enthalten sein können besitzen bei  $\lambda = 280$  nm ein Absorptionsmaximum. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm zueinander ist daher ein Indikator für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Es nimmt bei optimaler Reinheit von DNA einen Wert 1,8 und von RNA den Wert 2,0 an.

### 2.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Zum Verbinden der Plasmid DNA mit dem aufgereinigten DNA-Fragment als Insert wird ein Reaktionsansatz hergestellt, in dem die heterologe DNA in einem molaren Überschuss vorliegen sollte. Die zu ligierenden DNA-Fragmente werden mit 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht im Wasserbad bei 16°C inkubiert. Die Ligation wird durch die Zugabe von 2 µl Natriumacetat (3 M), 2 µl Glycerin und 50 µl Ethanol (99 %) mit Hilfe einer Standard-Präzipitation terminiert.

### 2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma MWG (<http://www.mwg.de>) durchgeführt

### 2.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Eine Standardtechnik zur kontrollierten Amplifikation von DNA ist die PCR. Diese Methode macht sich die Enzymaktivität und Thermostabilität der Taq-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) zunutze. Die Eigenschaften dieses Enzyms ermöglichen es, die einzelnen Schritte der PCR:

- Schmelzen der DNA (*denaturation*) bei 94 °C (30 s)
- Paaren von Oligonukleotiden als Primer (*annealing*) ca 4°C unterhalb der Primer-Schmelztemperatur (30 s)
- Vervollständigung des komplementären DNA-Stranges (*elongation*) bei 72°C (60 s)

periodisch und ohne Unterbrechung als Zyklen ablaufen zu lassen.

Ein typischer PCR-Ansatz umfasst bei 20 µl Volumen:

- 5,0 µl Template-DNA (10-100 ng)
- 5,8 µl H<sub>2</sub>O (steril, bidest.)
- 3,0 µl Glycerin
- 2,0 µl PCR-Puffer 10x (MgCl<sub>2</sub>-frei)
- 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1,5 µl dNTPs (2,5 mM pro Nucleotid)
- 1,0 µl *sense*-Primer (25 µM)
- 1,0 µl *antisense*-Primer (25 µM)
- 0,1 µl Taq-Polymerase (0,5 U)



### 2.17 Quik change site-directed mutagenesis Methode

Die Durchführung dieser Methode erfolgt laut der vom Hersteller empfohlenen Anleitung zu „Quik change site directed mutagenesis kit“ (Stratagene). Im ersten Schritt erfolgt die Mutagenese durch PCR. Die Angaben im Protokoll sind hierzu folgende:

Reaktionsansatz für 50 µl Endvolumen:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 10 µl dsDNA template (Stratagene empfiehlt mehrere Ansätze von 5-25 ng)
- 5 µl Oligonukleotidprimer 1
- 5 µl Oligonukleotidprimer 2
- 1 µl dNTP's
- 23 µl bidest. Wasser
- 1 µl Pfu Turbo DNA Polymerase (2.5 U/µl)

Um die einzelnen Schritte überprüfen zu können, wird die Verwendung der mitgelieferten Kontrollen empfohlen. Die Kontrolle zur PCR basiert auf einem pWhitescript Plasmid, in welches eine Punktmutation eingeführt werden soll.

Kontrollansatz für 50 µl Endvolumen:

- 5.0 µl 10x Reaktionspuffer
- 2.0 µl (10 ng) pWhitescript 4.5 kb Kontrollplasmid (5 ng/µl)
- 1.25 µl (125 ng) Oligonukleotidprimer 1 (34-mer 100 ng/µl)
- 1.25 µl (125 ng) Oligonukleotidprimer 2 (34-mer 100 ng/µl)
- 1.0 µl dNTP's
- 39.5 µl bidest. Wasser
- 1.0 µl Pfu Polymerase

Die PCR Konditionen sind folgende:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 s
12-18	95°C	30 s
	55°C	1 min
	68°C	2 min pro kb Plasmidlänge
19-20	68°	10 min
21	4°	bis zur weiteren Verwendung

Die Anzahl der Zyklen hängt von der Art bzw. der Größe der einzuführenden Mutation ab. Für die hier durchzuführenden Mutationen müssen 18 Zyklen durchlaufen werden, da die Sequenz multipler Aminosäuren ausgetauscht

werden soll. Die Kontrollreaktion wird jeweils nach 12 Zyklen beendet, da lediglich eine Punktmutation einzuführen ist. Nach Beenden der PCR müssen die Proben für mind. 2 min auf Eis gestellt werden, da die Reaktionen eine Temperatur von  $\leq 37^{\circ}\text{C}$  erreichen müssen. Im Anschluss daran werden 10  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und durch Elektrophorese überprüft.

Danach wird ein DpnI-Verdau durchgeführt. Der letzte Schritt beinhaltet die Transformation des PCR-Amplifikats in XL1-blue superkompetente Zellen. Hierzu werden die Zellen auf Eis aufgetaut. Für jede Kontroll- und Probenreaktion werden 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Dann werden 5-10  $\mu\text{l}$  der DpnI behandelten DNA in die entsprechenden Gefäße überführt. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wird eine weitere Kontrolle mit einem pUC18 Plasmid (0,1 ng/ $\mu\text{l}$ ) durchgeführt (Ansatz: 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension + 1  $\mu\text{l}$  pUC18). Die Transformationsansätze müssen sorgfältig vermischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert werden. Danach werden die Ansätze 45 s bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. In die Reaktionsgefäße werden 0,5 ml NZY<sup>+</sup>Medium gegeben, das zuvor auf  $42^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt wurde. Die Ansätze werden dann 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Inkubator geschüttelt und auf LB-Selektiv-Agarplatten ausplattiert. Die Platten für den PCR-Kontrollansatz, sowie die Transformationskontrolle müssen vor dem Ausplattieren für ein Blue-White-Color-Screening vorbereitet werden. Dazu werden 30 min vor dem Ausplattieren mit 100  $\mu\text{l}$  10 mM IPTG und 100  $\mu\text{l}$  2% X-Gal behandelt. Die Platten werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### **2.18 Zellkultur**

Alle Zelllinien werden in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jegliche Behandlung der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen. Die kultivierten Zellen werden ab 80%iger Konfluenz in neue Zellkulturschalen passagiert.

### **2.18.1 Passagieren von Zellen**

Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen 5 min mit einer 0,25%igen Trypsinlösung/EDTA bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden dann in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Kulturplatten oder -flaschen ausgesät.

### **2.18.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen werden in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  pro ml eingefroren. Dazu werden die Zellen für 5 min trypsinisiert und in Kulturmedium überführt um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (3 min, bei 12000 rpm) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in eiskaltem Kryomedium (90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und die Suspension auf Kryoröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgt langsam in speziellen Behältnissen, die Isopropanol enthalten. Die Zellen werden nach einigen Tagen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgt möglichst schnell, die Kryoröhrchen werden auf Eis zum Zelllabor transportiert. Der aufgetaute Inhalt (bei 37°C im Wasserbad) wird in 10 ml Medium aufgenommen und für 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in frischem Medium resuspendiert und zur Kultivierung ausgesät.

### **2.18.3 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion von DNA in Zellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Zum einen mittels Transportreagenzien, die Komplexe mit der DNA bilden und letztendlich eine Durchlässigkeit der Membran verursachen. Zum anderen durch Elektroporation, bei der die Membran durch eine kurze elektrische Entladung durchlässig für DNA wird.

Die Aufnahme von Plasmiden ist reversibel und somit verlieren die meisten Zellen diese innerhalb weniger Tage (transiente Transfektion). Kommt es zum

Einbau der DNA in das Genom spricht man von stabiler Transfektion. Durch zusätzliche Zugabe eines Resistenzmarkers, können stabile Klone durch Zugabe eines Antibiotikums selektiert werden. Werden mehrere Klone weiterkultiviert, spricht man von Massenkultur (mass culture).

### **2.18.4 Transfektion von AS-Zellen**

Die Transfektion von AS-Zellen wurde mit Tfx-50 gemäß der Anweisung des Herstellers durchgeführt. Massenkulturen der unterschiedlichen Linker scan Mutanten wurden durch Ko-Transfektion des Plasmids pBabe puro und anschließender Puromycin-Selektion (1 µg/ml) erhalten.

### **2.19 Aktivierung von HGF und MSP**

HGF liegt als monomere Proform vor. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung einer Disulfidbrücke durch Proteasen. Nach der Aktivierung liegt eine  $\alpha$ -Untereinheit von 60 kDa und ein  $\beta$ - Untereinheit von 30 kDa vor. Um eine Aktivierung der Proform zu bewirken, werden 50 µl der HGF-Proform (10 µl/ml in PBS + 0,3% BSA) mit 25 µl FCS und 425 µl PBS über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung kann durch Western Blot mit Antikörper gegen den  $\alpha$ - Untereinheit von HGF nachgewiesen werden. Hierdurch kann die aktivierte Form (60 kDa) von der Proform (90 kDa) unterschieden werden.

Die Aktivierung von MSP erfolgt analog.

### **2.20 Biotinylierung von HGF**

Die Biotinylierung von HGF erfolgt in zwei Schritten: Konjugation und Dialyse. Zur Konjugation von HGF werden 25 µg des Wachstumsfaktors in 50 µl PBS gelöst und mit 1 µl Sulfo-NHS-LC-Biotin (10 mg/ml) versehen und 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Dialyse. Dazu werden 51 µl des biotinylierten HGF in Minidialysevorrichtungen pipettiert. Diese kommt in einem Ständer in ein Becherglas mit 50 ml PBS für 2 h. Nach erneuter Inkubation mit frischem PBS für weitere 2 h erfolgt dieser Vorgang nochmals für 2 h bei 4°C.

### **2.21 Induzierung mit HGF, MSP und PDGF**

Vor der Behandlung mit Wachstumsfaktoren müssen die Zellen 20-24 h gehungert werden. Dabei wird das Kulturmedium gegen serumfreies Medium ausgetauscht, da im Serum Wachstumsfaktoren enthalten sind. Die Induzierung mit HGF, MSP und PDGF erfolgt in der Regel, wenn nicht extra vermerkt 5 min in serumfreiem Medium bei 37°C mit 10 respektive 50 ng/ml für HGF und MSP bzw. 10 ng/ml für PDGF.

### **2.22 Konkurrenz mit CD44 v6 spezifischen Peptiden**

Die Zellen werden in 6-well-Platten in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ well ausgesät. Wenn sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, werden sie für 24 h gehungert. Zur Konkurrenz mit Peptiden werden die Zellen mit frischem serumfreiem Medium versehen und die Peptide in einer Konzentration von 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml dazu gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Induzierung mit Wachstumsfaktoren (10 ng/ml oder 50 ng/ml) für 5 min bei 37°C. Zur Zellernte wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit SDS-Lysepuffer versehen

### **2.23 Proteinextraktion und Zellyse**

Die Zellen werden lysiert, indem die Zellen mit Laemmli Lyse-Puffer aufgenommen wurden, nachdem zuvor das Medium abgesaugt wurde. Die Denaturierung der Proteine erfolgt mittels reduzierender Reagenzien wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT; 1M, Verdünnung 1:10), die zur Spaltung der Disulfidbrücken dienen.

Die so erhaltene DNA wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle geschert, um die Viskosität herabzusetzen. Damit wird die Möglichkeit der Auftrennung der Proteine verbessert. Die Proben wurden dann zur Denaturierung für 5 min bei 99°C erhitzt. Dies erfolgte im Heizblock unter ständigem Schütteln damit ein hoher Wärmeübergang gewährleistet werden kann. Abschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min dient der

Sedimentation von unlöslichen Bestandteilen. Die Proben können nach diesem Schritt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

**Probenpuffer:** 100 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau

### 2.24 Proteinbiochemisch Methoden

SDS-PAGE (denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese)

Proteine, die von dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) umlagert sind, können in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Größe der negativ geladenen Proteine korreliert mit ihrer Masse, welche anhand eines mitlaufenden Markers ermittelt werden kann. Die Proteine werden in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wird nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche durch mm dicke Abstandhalter voneinander werden. Nach Überschichten mit Isopropanol lässt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach der Polymerisation wird das Isopropanol entfernt, mit Wasser gewaschen und dann das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen. Nach Einsetzen des Kammes lässt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wird das Gel in eine speziell dafür vorgesehene Gelkammer eingespannt, deren Reservoirs mit Elektrophoresepuffer gefüllt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Regel bei einer Spannung von 100-120 V.

**Trenngel:** 6-12% Acrylamid, 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1 %Temed

**Sammelgel:** 4% Acrylamid, 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% Temed

**Elektrophoresepuffer:** 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% SDS

## 2.25 Western Blot und immunochemische Detektion

Proteine, die über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, werden in einer Naßtransferkammer (Transblot, BioRad) auf eine Nitrocellulose-Membran (PVDF) transferiert. Dazu wird das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen „Whatman“-Papier, das zuvor mit Transferpuffer befeuchtet wurde, gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Kammer wird mit Laufpuffer gefüllt. Die durch SDS negativ geladenen Proteine werden in Richtung der Anode auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 30 V bei 4°C, unter Kühlung kann aber auch in kürzerer Zeit (2-3 h) bei bis zu 1,5 A transferiert werden. Nach erfolgtem Transfer wird die Immunodetektion vorgenommen. Dabei wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 5% BSA in TBS-Tween inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder empirisch ermittelten Verdünnung). Danach wird die Membran dreimal 10 min in TBS-Tween gewaschen und mit dem Sekundärantikörper beprobt. Nach erneutem, dreimaligem Waschen in TBS-Tween werden die Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtet sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Hier wurden Antikörper verwendet, die an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Zur Detektion wurde die Membran 1 min mit ECL-Lösung behandelt, die Wasserstoffperoxid und Luciferase enthält. Bei der Zersetzung des Wasserstoffperoxids entsteht aktivierter Sauerstoff, der Luciferase aktiviert. Mit der abgegebenen UV-Strahlung wird ein Röntgenfilm belichtet. Um den Blot mit einem zweiten Antikörper zu beproben, muss der erste entfernt werden. Dies erfolgt durch Schütteln bei 55°C im Wasserbad für 40 min in „stripping-Lösung“.

**Transferpuffer:** 20 mM Tris; 192 mM Glycin, 10% Methanol

**TBS:** 20 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,6

**TBS-Tween:** TBS + 0,05% Tween 20

**Stripping-Lösung:** 62,5 mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 50 mM DTT

### 2.26 Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation (IP) wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe von hochaffinen Antikörpern aus dem Zellysat komplexiert. Zur Affinitätsreinigung wird Sepharose-gekoppeltes Protein A/G/A+G zugegeben. Somit können die gebildeten Komplexe der Lösung entzogen und sedimentiert werden. Protein A (aus Staphylokokken) ist gegen Maus IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgA, Kaninchen pAKs, humanes IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub>) gerichtet, Protein G (aus Streptokokken) gegen Maus IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub>, gegen Ratte IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>2c</sub>, gegen Kaninchen und Ziege pAKs und gegen humanes IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> gerichtet. Während des Präzipitationsvorganges müssen die Zellen und Lysate unbedingt auf Eis,  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ , gehalten werden, damit die Proteinkomplexe eine möglichst große Stabilität erhalten und die Aktivität von Proteasen, Kinasen und Phosphatasen zu minimieren.

#### Vorschrift für die IP von Met aus HT29

Im Anschluss an die Induzierung mit HGF werden die Zellen mit eiskalten PBS gewaschen; mit 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Lysepuffer befindet sich NaF und Na-Orthovanadate, die als Breitbandinhibitoren für Serin-/Threonin Phosphatasen und Tyrosin-Phosphatasen eingesetzt werden. Die Lysate werden in Reaktionsgefäße überführt und die DNA gesichert. Anschließend wird für 20 min bei 12000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach der Zugabe von 12,5  $\mu\text{l}$  humanem Met-Antikörper werden die Proben für über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert. Zu jeder Probe werden 50  $\mu\text{l}$  „bead“-Suspension (Protein A+G-gekoppelte Agarose-beads) gegeben, welche zuvor mit Lysepuffer gewaschen wurden. Die Lysate lässt man weitere 4 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotieren. Danach werden die Proben abzentrifugiert und mit Lysepuffer gewaschen. Der Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Zum Schluss wird jegliche überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die „beads“ mit 25  $\mu\text{l}$  SDS-Ladepuffer versetzt.



**Lysepuffer:** 30 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,5% Na-deoxycholat, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na-Orthovanadate, 1 mM Aprotinin und 1 mM Leupeptin

### **IP Ron**

Die Immunopräzipitation von Ron wurde nach der Induktion mit MSP analog der von Met durchgeführt (Lysepuffer ebenfalls identisch). Zur IP von Ron wurde der Ron Antikörper C-20 verwendet.

### **IP PI3 Kinase**

Die Präzipitation wurde analog der von Met durchgeführt. Zur IP von PI3K wurde der PI3K Antikörpers Z-8 verwendet. Lediglich der IP-Puffer variierte von dem für Met und Ron verwendeten.

**Lysepuffer:** 25 mM Hepes (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glyzerol, 1% NP 40, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

## **2.27 RNA-Interferenz (RNAi)**

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $4 \times 10^4$ /well in 24 well Platten ausgesät. siRNA gegen CD44 v6 oder einer Kontroll-siRNA wurde mit Oligofectamine in Zellen laut Vorschrift des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden für 24 h starviert, anschließend mit HGF (10 ng/ml) behandelt und dann lysiert.

## **2.28 Fluorescence-activated cell sorting analysis (FACS)**

### **2.28.1 HA Bindungsassay**

Die Zellen werden mit PBS/EDTA geerntet und in 100 µl PBS, 3% BSA resuspendiert.  $1 \times 10^6$  Zellen werden mit FITC-konjugierter Hyaluronsäure (10 µg/ml) für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend dreimal gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt.

### **20.28.2 HGF Bindungsassay**

Das Vorgehen erfolgt analog der Vorbereitung der Zellen zur FACS Analyse. Die Zellen wurden vor der Induktion mit biotinyliertem HGF (10 und 30 ng/ml) mit dem CD44 v6 Antikörper VFF18, oder den unterschiedlichen Peptiden inkubiert, oder aber mit verschiedenen Vektoren (soluble CD44s oder soluble CD44 v6) transfiziert. Die Induktion mit HGF erfolgte im Dunkeln bei RT für 30 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit FITC-Streptavidin inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, resuspendiert und am FACScan Durchflußzytometer gemessen.

### **2.29 Scatteringassay**

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $4.5 \times 10^4$ /well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 24 h gehungert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von Peptiden (100 ng/ml) für 30 min bzw. eines MAPK-Inhibitors, Kontrollen wurden nicht mit Peptiden behandelt. Anschließend wurde der Wachstumsfaktor in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben. Die Zellen wurden nach 12 h und 24 h auf das Migrationsverhalten am Phasenkontrastmikroskop untersucht.

### **2.30 Chemotaxisassay**

#### **2.30.1 Invasionsassay**

Das Experiment wurde in 12 well Transwell Einheiten mit Filtern mit einer Porengröße von 8  $\mu$ m (Costar) durchgeführt. Die Filter wurden mit Matrigel beschichtet (70  $\mu$ g pro Filter wurden für 1 h bei 37°C inkubiert). Das tiefer liegende Kompartiment der Transwell-Einheit enthielt entweder ausschließlich 600  $\mu$ l DMEM-Medium (zur Kontrolle) oder DMEM mit HGF (50 ng/ml). Dann wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in das aufgesetzte Kompartiment auf den Filter gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen auf der Oberseite des Filters mit einem Wattestäbchen entfernt. Die im Matrigel und an der Unterseite des Filters verbliebenen Zellen wurden mit 70%igem Ethanol fixiert, mit 0.1%igem Kristallviolett gefärbt und mit Essigsäure lysiert. Die OD wurde mit einem ELISA

Reader gemessen. Im Falle einer Vorbehandlung mit Peptiden, MAPK-Inhibitor oder Antikörper ist dies vermerkt.

### **2.30.2 Migrationsassay**

Die Durchführung erfolgte analog zum Invasionsassay, jedoch wurden hier die Filter nicht mit Matrigel behandelt.

## Ergebnisse

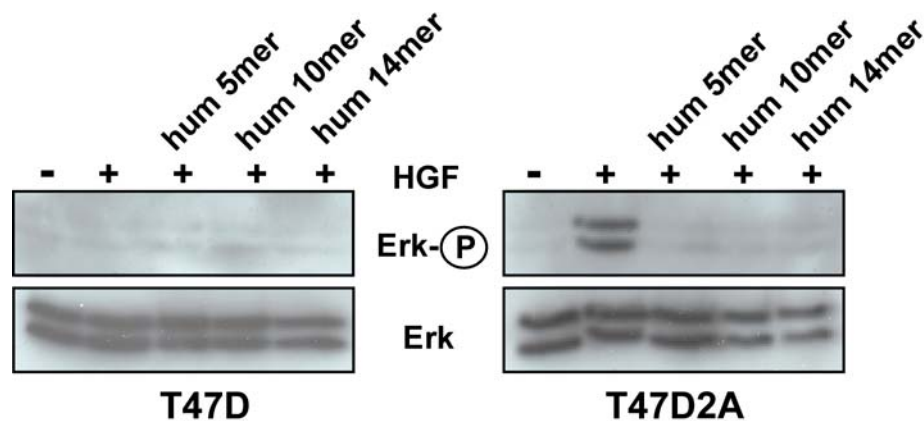
### 1. Einleitung

Eine Beteiligung von CD44 an der Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase Met durch ihren Liganden HGF wurde durch Verwendung von CD44 v6 spezifischen Antikörpern und Transfektionsexperimenten nachgewiesen. Nur die CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18 (Mensch) und 1.1ASML (Ratte), jedoch nicht die beiden Antikörper IM7 und J173, die Epitope erkennen, die weit entfernt von v6 Sequenzen liegen, verhinderten die Aktivierung von Met, sowie von Erk, einer Komponente des MAPK-Signalweges. Die Funktion von CD44 v6 als Ko-Rezeptor wurde auch durch Transfektion der Zelllinie BSp73AS (hier künftig als AS bezeichnet) mit CD44 v6 bestätigt. In AS Zellen, die den Met Rezeptor und CD44s exprimieren, kann der Met Rezeptor durch HGF nicht aktiviert werden. Durch Transfektion dieser Zellen mit der CD44 v6 Isoform wurde die ASv6-Zelllinie erhalten, in der die Behandlung mit HGF zur Phosphorylierung von Met führt (Orian-Rousseau et al., 2002).

### 2. In Met defizienten Zellen kommt es zur Bindung von HGF

Die Funktion von CD44 v6 als Ko-Faktor für die Met Aktivierung könnte darin bestehen, in einem ternären Komplex die Bindung des Liganden zu ermöglichen, oder aber selbst den Liganden zu binden und dem Met Rezeptor zu „präsentieren“. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden wurde die Bindung von HGF (es wurde biotinyliertes HGF zum Nachweis in der FACS Analyse verwendet) an Zellen, die entweder Met und CD44, oder nur CD44 exprimieren, untersucht. Verwendet wurden die Zelllinien AS, ASv6, HT29, T47D und T47D2A. HT29 Zellen entstammen einem humanen Colonkarzinom. Diese Zellen exprimieren Met und unterschiedliche Isoformen von CD44, u. a. auch Isoformen, die v6 enthalten (Orian-Rousseau et al., 2002). Bei T47D Zellen handelt es sich um eine humane Mammakarzinomzelllinie, die verschiedene CD44 Isoformen, darunter CD44 v6, jedoch nicht den Met Rezeptor exprimieren. Behandlung der T47D Zellen mit HGF führte zu keiner Aktivierung des Met

Rezeptors, dagegen kommt es in der Zelllinie T47D2A, die mit Met transfiziert wurde, zu einer Aktivierung des Rezeptors (Abb. 3). Diese Aktivierung ist strikt von CD44 v6 abhängig, da sie durch CD44 v6 spezifische Peptide (siehe Kapitel 4) verhindert werden konnte (Abb. 3). Generell wurden jegliche in dieser Arbeit gezeigten Experimente mehrmals wiederholt (mindestens 3x) und lieferten vergleichbare Resultate zu den in den Abbildungen gezeigten.

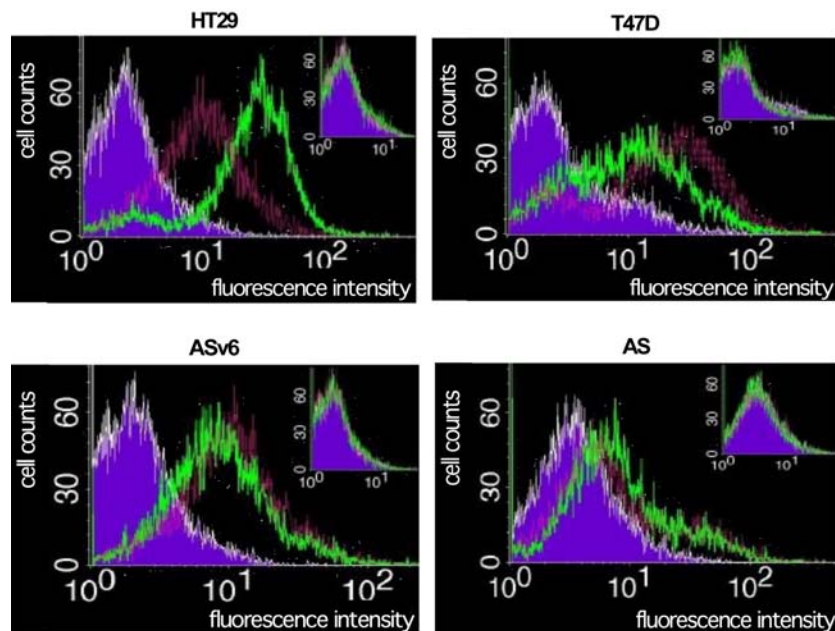


**Abb. 3: Humane CD44 v6 spezifische Peptide blockieren die Aktivierung von Met auch in den humanen Zelllinien T47D und T47D2A.** Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well (6-well-Platte) kultiviert und für 24 h in Abwesenheit von Serum gehalten. Die Behandlung mit den humanen CD44 v6 spezifischen 5mer, 10mer und 14mer Peptiden (50 ng/ml; siehe Kapitel 4) erfolgte für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Im Anschluss wurde mit HGF (10 ng/ml) für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  induziert. Es wurden Zellysate hergestellt, die Proteine der Zellysate wurden über SDS-PAGE (10% Gel) aufgetrennt. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe), sowie gegen Erk (untere Reihe; Ladekontrolle) nachgewiesen.

Wie erwartet kam es auf ASv6 Zellen zu einer Bindung von HGF. Erstaunlicherweise wurde HGF nicht an die parentalen AS Zellen, die nur Met aber kein CD44 v6 exprimierten, gebunden (Abb. 4). Die Bindung mit biotinyliertem HGF (bioHGF) wurde bei Raumtemperatur und auf Eis durchgeführt, letzteres um eine Internalisierung des Rezeptors zu vermeiden. Ein Unterschied für die beiden Temperaturbedingungen konnte für AS und ASv6 Zellen nicht festgestellt werden. Auch HT29 Zellen binden wie erwartet HGF, wobei hier die Induktion auf Eis zu einer stärkeren Bindung führte. Äußerst

überraschend war die Beobachtung, dass es in T47D Zellen zu einer Bindung von HGF kommt, obwohl in diesen Zellen der authentische Rezeptor für HGF nicht exprimiert wird. Die Bindung erfolgte hier verstärkt bei Raumtemperatur (Abb. 4). Diese Bindung von HGF wird nicht durch die Anwesenheit von Met verstärkt, wie der Vergleich von T47D und T47D2A in der FACS Analyse zeigte (Abb. 5). Biotinyliertes HGF verhält sich gleich dem unmarkierten HGF, es führt zur Met Aktivierung. Die Bindung von bioHGF wurde durch Überschuss an unmarkiertem HGF unterbunden (Abb. 4 kleine Fenster rechts oben).

Demnach kann HGF an CD44 v6 auch in Abwesenheit von Met binden, während Met alleine für die Bindung nicht ausreicht.



**Abb. 4: HGF Bindung erfolgt auch in Abwesenheit von Met durch CD44 v6.**

Fluorescence activated cell sorting (FACS) der Zelllinien HT29, T47D, AS und ASv6.  $1 \times 10^6$  Zellen, die zuvor 24 h ohne Serum kultiviert wurden, wurden mit bioHGF (10 ng/ml) auf Eis (grüne Linie) bzw. bei Raumtemperatur (rote Linie) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, in 100  $\mu$ l PBS, 3% FCS resuspendiert und mit FITC-Streptavidin (10  $\mu$ g/ml) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, resuspendiert und am FACScan Durchflußzytometer gemessen. In violett sind die Zellen dargestellt, die nur mit FITC-Streptavidin inkubiert wurden (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung). Im kleinen Fenster rechts oben sind zur Kontrolle die Zellen gezeigt, die mit einem Überschuss an unmarkiertem HGF (50 ng/ml) und bioHGF (10 ng/ml) behandelt wurden.

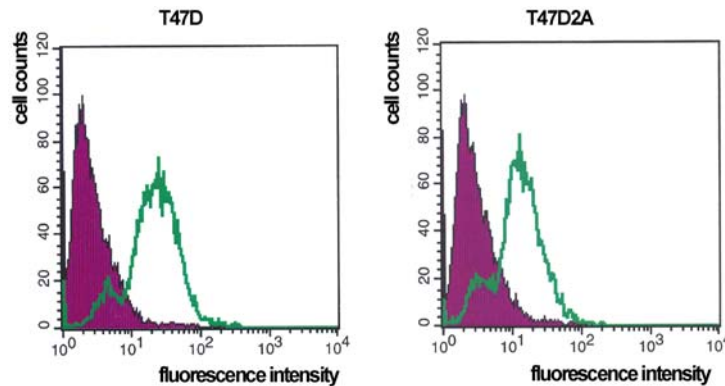


Abb. 5: **Met Anwesenheit verstärkt die Bindung von HGF nicht.** Fluorescence activated cell sorting (FACS) der Zelllinien T47D und T472A. Das experimentelle Vorgehen war wie in Abb. 4 beschrieben. Die Induktion mit bioHGF erfolgte bei Raumtemperatur. In violett sind die Zellen nach Behandlung mit FITC-Streptavidin dargestellt, die grüne Linie zeigt die Zellen nach der Behandlung mit bioHGF.

### 3. Identifizierung der Ko-Rezeptor relevanten CD44 v6 Sequenz

Für die Charakterisierung der Ko-Rezeptor Funktion von CD44 wurde das AS-Zellsystem gewählt. Da die Analyse durch Transfektion von Mutanten in AS-Zellen durchgeführt werden sollte, wurde durch RNA Interferenz (RNAi) abgesichert, dass in dieser Zelllinie tatsächlich CD44 v6 zur Aktivierung von Met benötigt wird. Die RNA-Interferenz ist eine Methode, bei der durch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA) die Expression spezifischer Gene unterdrückt wird. Ziel war es durch Verwendung von CD44 v6 spezifischer siRNA eine Verminderung der varianten Isoform CD44 v6 zu erhalten und die Auswirkung auf die Met Aktivierung zu testen.

Die Zelllinien ASv6 und AS (diente als Negativkontrolle) wurden mit v6 spezifischer siRNA sowie mit Kontroll siRNA transfiziert und nach 48 Stunden auf CD44 v6 Expression analysiert. Die v6 spezifische siRNA führte zu einer deutlichen Abnahme der CD44 v6 Expression in ASv6 Zellen. Wurden diese Zellen mit HGF behandelt führte dies zu keiner Erk Aktivierung im Unterschied zu unbehandelten Zellen. Eine Kontroll siRNA hatte sowohl auf die CD44 v6 Expression als auch auf die HGF-induzierte Signalkaskade keinerlei Auswirkung (Abb. 6). Durch RNAi konnte somit die Funktion von CD44 v6 als Ko-Rezeptor bestätigt werden.

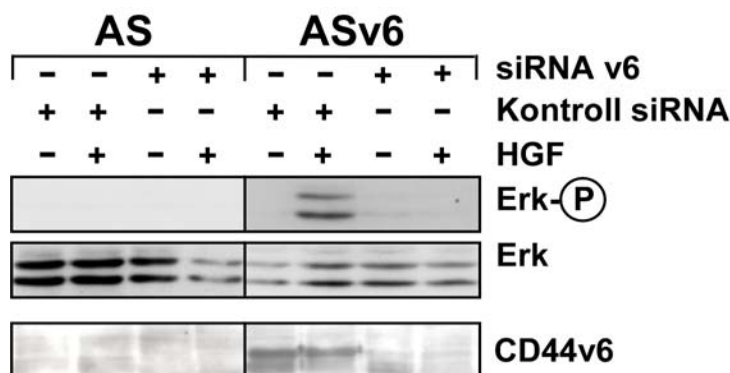


Abb. 6: **RNA Interferenz (RNAi) gegen CD44 v6.** ASv6 und AS Zellen wurden in 24-well Platten in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/well ausgesät. Die Transfektion mit v6 spezifischer siRNA bzw. Kontroll siRNA erfolgte nach 24 h. Die Zellen wurden danach für 24 h im Wachstumsmedium kultiviert und weitere 24 h ohne Serum gehalten. Dann wurde mit HGF (10 ng/ml) für 5 min bei 37°C induziert und im Anschluss Zellysate hergestellt. Die Proteine der Lysate wurden über SDS-PAGE (10% Gel) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte durch Antikörper, die entweder phosphoryliertes Erk (obere Reihe), Erk (mittlere Reihe) oder CD44 v6 (Ratte) erkennen (untere Reihe; v6 spezifischer Antikörper 1.1ASML).

Zur Identifikation der Aminosäuren in CD44 v6, die benötigt werden um den Met Rezeptor zu aktivieren, wurde eine Linker Scan Mutagenese des gesamten Exons v6 durchgeführt. Dabei werden die Mutationssequenzen so gewählt, dass eine Restriktionsstelle (in diesem Fall eine Not I Stelle) eingebaut wird, die einen einfachen Nachweis der erfolgreichen Mutation ermöglicht. Es wurden Linker Scan (ls) Mutanten durch fortlaufenden Austausch von 9 bp Segmenten erzeugt, wobei die Originalsequenz des Exon v6 durch Alanin kodierende Sequenzen ausgetauscht wurde. Im Fall von Alanin kodierender Originalsequenz wurden Glycin kodierende Sequenzen eingeführt. Insgesamt wurden 14 Plasmide isoliert (Abb. 7 A und B).

Diese Mutanten wurden in AS Zellen transfiziert um zu testen, ob sie in der Lage sind als Ko-Rezeptor für Met zu fungieren. Zur Identifizierung der transfizierten Zellen wurde ein Vektor, der für ein Pyromycinresistenzgen kodiert, ko-transfiziert. Somit konnte durch Zugabe von Pyromycin ins Selektionsmedium



erreicht werden, dass alle nicht transfizierten Zellen absterben. Bei dieser Methode der Transfektion erhält man Kulturen, die von vielen unterschiedlichen transfizierten Zellen abstammen (Massenkultur). Damit ist klonale Variation ausgeschaltet.

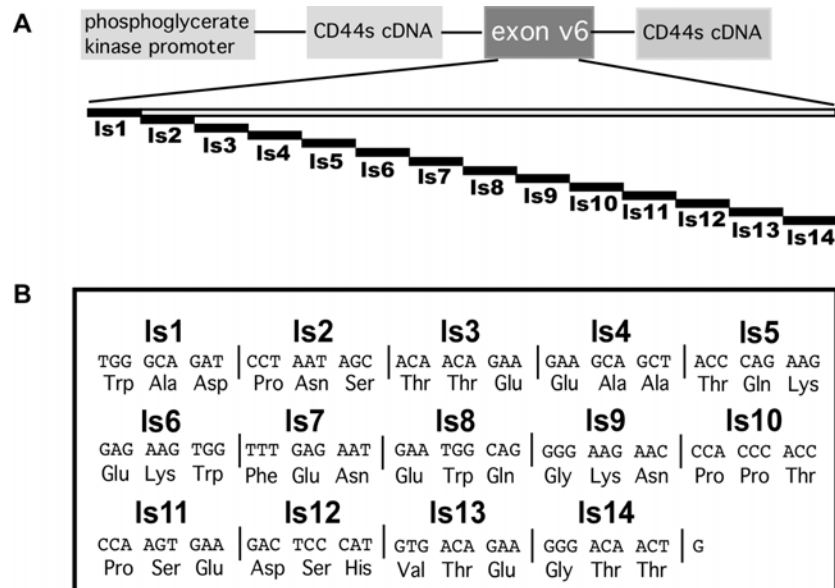


Abb. 7: **Prinzip der Linker Scan Mutagenese.** (A) Schematische Darstellung: Die Mutation des Exon v6 erfolgte in fortlaufenden Schritten von 9 bp. Der Einbau einer Not I Schnittstelle ermöglichte eine schnelle Selektion der Mutanten. Zur vollständigen Mutation von Exon v6 wurden 14 Mutanten benötigt, bei denen die Originalsequenzen durch Alanincodons ausgetauscht wurde. Im Fall von Alanin kodierenden Sequenzen im Originalplasmid erfolgte die Substitution durch Glycin-kodierende Sequenzen. (B) Exonsequenz von CD44 v6 und Anordnung der Mutanten.

Die mit den verschiedenen Linker Scan Plasmiden transfizierten Massenkulturen wurden auf Aktivierung von Erk nach HGF-Behandlung getestet. Fast alle Mutanten waren in der Lage, ähnlich dem Wildtyp CD44 v6, als Ko-Rezeptor zu agieren. Lediglich die Mutante Is8 reagierte nicht auf die Behandlung mit HGF, es wurde keine Phosphorylierung von Erk beobachtet (Abb. 8 A). Sie hatte die Ko-Rezeptorfunktion verloren. Diese ausbleibende Erk Aktivierung durch die Is8 Mutante kann nicht durch mangelhafte Expression erklärt werden (Abb. 8 B).

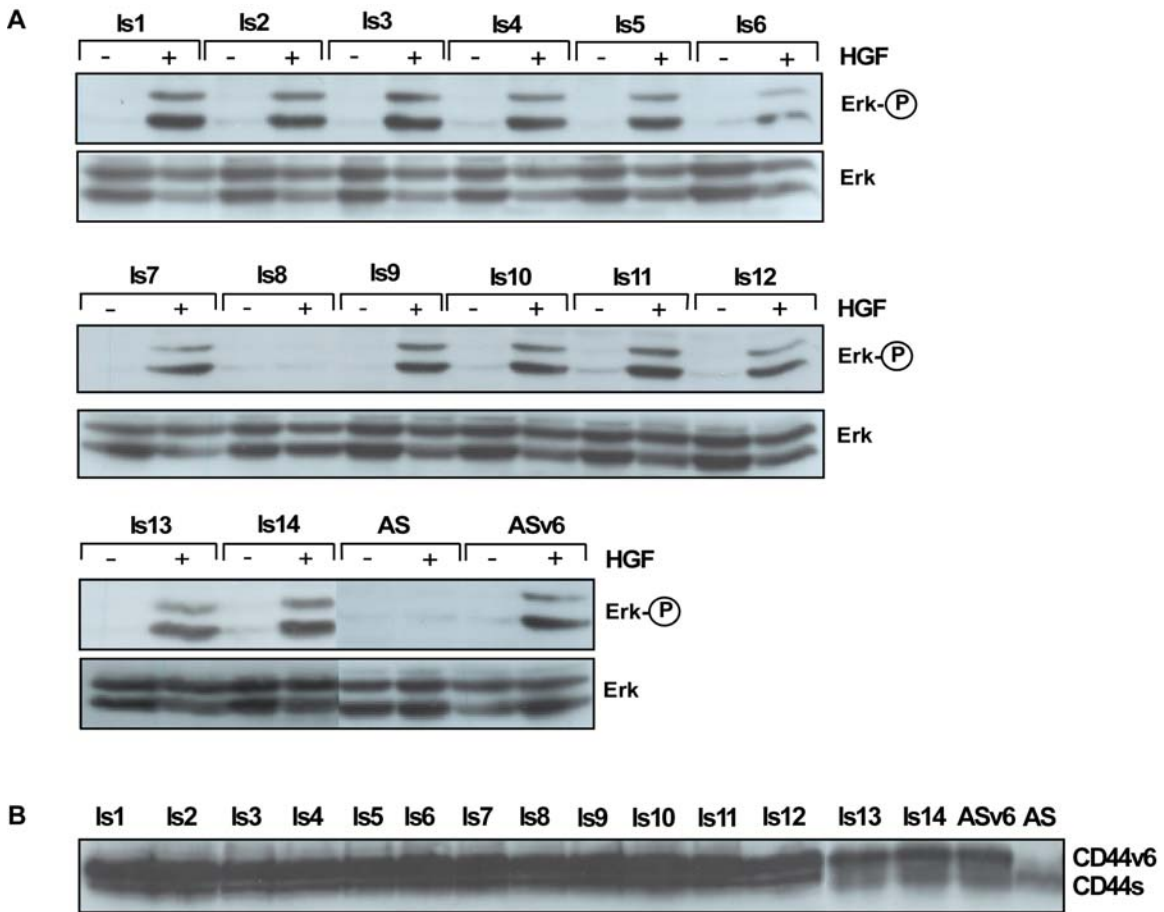


Abb. 8: **Drei AS in CD44 v6 sind essentiell für die Met Aktivierung.** (A) AS Zellen wurden mit den Linker Scan Mutanten Is1-Is14 sowie mit dem Vektor pBabe, der für ein Pyromycinresistenzgen kodiert, transfiziert. Nach erfolgter Selektion mit Pyromycin (1 µg/ml) wurden die transfizierten Zellen, sowie AS und ASv6 Zellen zur Kontrolle, in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/well in 24-well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h unter Serumentzug gehalten, dann mit HGF (10 ng/ml) für 5 min bei 37°C induziert. Die Proteine aus den hergestellten Zelllysaten wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (10% Gel). Durch Antikörper gegen phosphoryliertes Erk (obere Reihe) und Erk (untere Reihe) wurden die spezifischen Proteine im Western Blot nachgewiesen. Erk diente als Ladekontrolle. (B) Die Zelllysate wurden auf Expression von CD44 durch den CD44 Antikörper 5G8 überprüft, der sowohl die Isoformen CD44s und CD44 v6 erkennt.

Die Is8 Mutation betrifft offensichtlich die Sequenz in v6, die für die Ko-Rezeptor-funktion notwendig ist. Um zu zeigen, dass die Is8 Mutation direkt die Aktivierung des Met Rezeptors betrifft und nicht nur intrazelluläre Signalkinasen, wurde die Aktivierung des Met Rezeptors durch Immunopräzipitation und Tyrosin-

phosphorylierung bestimmt. Tatsächlich kann durch Behandlung mit HGF in Is8 transfizierten Zellen auch eine Aktivierung von Met nicht mehr erreicht werden. Die benachbarte Mutante Is9 erlaubte Phosphorylierung von Met, ebenso wie ASv6 Zellen, die als Positivkontrolle dienten (Abb. 9). Die von der Is8 Mutation betroffenen AS Glutaminsäure, Tryptophan und Glutamin (Abb. 7 B) scheinen somit essentiell für die Aktivierung von Met in Abhängigkeit von CD44 v6 zu sein.

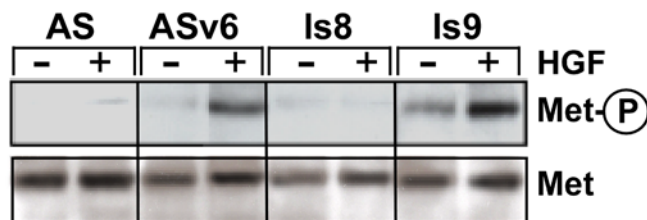


Abb. 9: **Verlust der Met Aktivierung durch die Is8 Mutante.** Die Is8 und Is9 transfizierten Zellen sowie AS und ASv6 Zellen zur Kontrolle wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/10 cm Platte ausgesät. Auf 24 h Hungern der Zellen folgte die Behandlung mit HGF (50 ng/ml) für 5 min bei 37°C. Die Zellen wurden lysiert und im Anschluss daran Met mit dem mMet Antikörper (B-2) immunopräzipitiert. Die Immuno-Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (10% Gel). Met Phosphorylierung wurde mit dem Phospho-Tyrosin Antikörper 4G10 detektiert (obere Reihe). Der Antikörper wurde von der Membran entfernt und Met wurde zur Ladekontrolle mit dem Met-spezifischen Antikörper mMet (B-2) nachgewiesen (untere Reihe).

Doch werden für die Interaktion tatsächlich alle drei Aminosäuren herangezogen? Um diese Frage zu beantworten wurden Einzel- und Doppelmutanten erzeugt. Dazu wurde Glutaminsäure zusammen mit Tryptophan, sowie Tryptophan in Kombination mit Glutamin mutiert, außerdem jede Aminosäure einzeln. Die Substitution der Originalsequenz erfolgte wieder durch Alanin-kodierende Sequenzen (Abb. 10 A).

Die Analyse der Doppelmutanten, sowie der Einzelmutanten, ergab, dass transfizierte Zellen mit allen Mutanten auf die Behandlung mit HGF mit Aktivierung des Met Rezeptors antworten (Abb. 10 B).

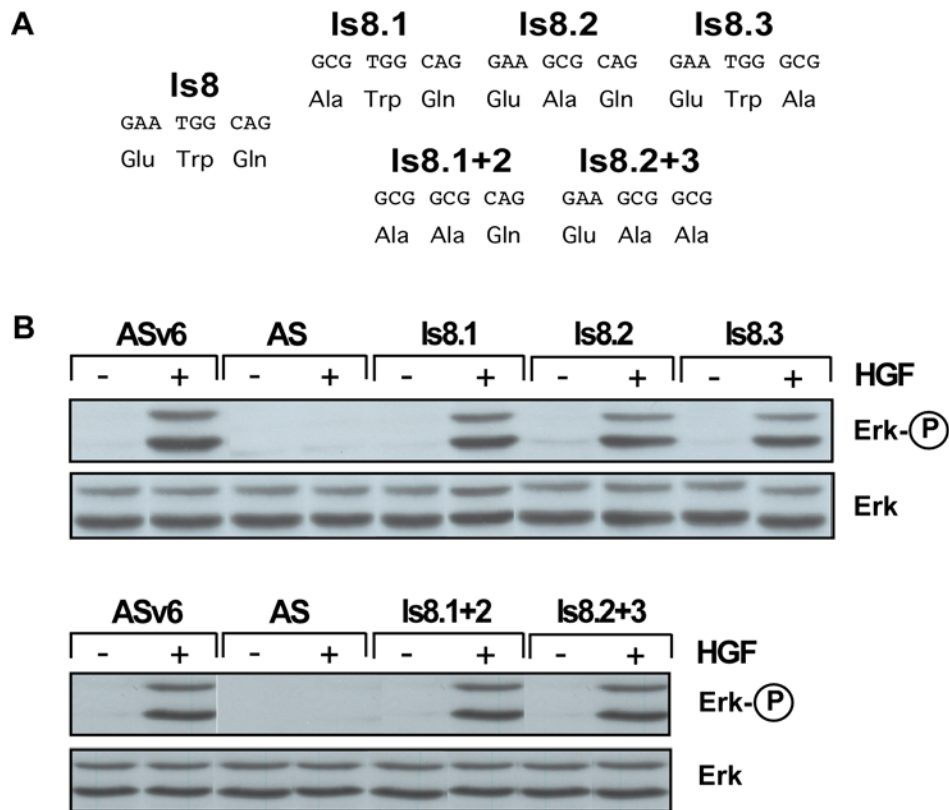


Abb. 10: **Mutationsanalyse der Aminosäuren Glu, Trp, Gln, einzeln oder in Kombination.** (A) Prinzip der Einzel- und Doppelmutanten, die von dem Bereich angefertigt wurden, der anhand der Linker Scan Mutagenese identifiziert wurde. Die Mutation der drei AS erfolgte einzeln bzw. in Kombination von 1. und 2. AS bzw. 2. und 3. AS, im Austausch gegen Alanin-kodierende Sequenzen. (B) Die mit den Einzelmutanten transfizierten Zellen Is8.1, Is8.2, Is8.3 bzw. mit den Doppelmutanten transfizierten Zellen Is8.1+2 und Is8.2+3 wurden wie beschrieben (Abb. 8) mit HGF induziert. Zur Kontrolle wurden AS Zellen und ASv6 Zellen verwendet. Die Detektion der spezifischen Proteine im Western Blot erfolgte mit Antikörpern gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und Erk (untere Reihe). Erk diente als Ladekontrolle.

Somit ist der Austausch von einer bzw. zwei Aminosäuren nicht ausreichend, um die Funktion als Ko-Rezeptor zu verlieren. Demnach scheinen für die Aktivierung von CD44 v6 mit Met die drei Aminosäuren Glutaminsäure, Tryptophan und Glutamin von grundlegender Bedeutung zu sein.

Eine Funktion von CD44, die unabhängig von der Met Aktivierung sein sollte und die durch den N-Terminus ausgeübt wird, ist die Bindung an Hyaluronsäure (HA). Aus diesem Grund wurde diese Funktion als Kontrolle gewählt, um zu zeigen,

dass die Is8 Mutante nicht generell inaktiv ist. Ls8 Zellen, ASv6 Zellen und AS Zellen wurden mit FITC-HA behandelt und in einer FACS-Analyse auf Bindung von HA untersucht. In der Tat können Zellen, die die Mutante Is8 exprimieren, HA binden, mit vergleichbarer Intensität zu ASv6 Zellen. AS Zellen, die CD44s exprimieren, zeigen dagegen ein sehr schwaches Bindungsverhalten (Abb. 11). Die Bildung von CD44 Clustern durch CD44 v6, die die Bindung von HA begünstigt (Sleeman et al., 1996), hängt offensichtlich nicht von der Sequenz ab, die in der Mutante Is8 betroffen ist.

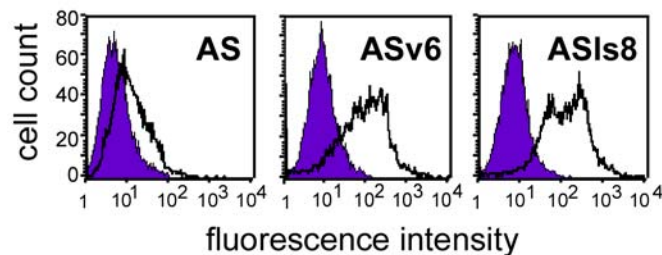


Abb. 11: **Die CD44 Mutante Is8 bindet Hyaluronsäure.** Fluorescence activated cell sorting (FACS) der AS-Transfektante Is8 sowie der AS und ASv6 Zellen zur Kontrolle:  $1 \times 10^6$  Zellen wurden geerntet, in 100  $\mu$ l PBS, 3% FCS resuspendiert und mit FITC-konjugierter HA (10  $\mu$ g/ml) für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden nach mehrmaligem Waschen in PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte mit dem FACScan Durchflußzytometer. Die blaue Fläche repräsentiert die ungefärbten Zellen, die schwarze Linie die Zellen, die mit HA behandelt wurden.

#### 4. Hemmung der Met Aktivierung durch CD44 v6 spezifische Peptide

Durch Transfektion von ASv4-v7 Zellen, die sowohl Met als auch CD44 v4-v7 exprimieren und in der der Met Rezeptor aktiviert werden kann, mit einem Expressionsvektor für die Ectodomäne von CD44 v4-v7 (lösliche extrazelluläre Domäne) wurde die Aktivierung von Met gehemmt (Orian-Rousseau et al., 2002). Offensichtlich kompetiert die Ectodomäne mit endogenem CD44 v6 um die Met Aktivierung. Die Konkurrenz war von der v6 enthaltenden Variantensequenz abhängig, da die Ectodomäne von CD44s keinen Effekt auf die Met Aktivierung hatte. Ich habe nun getestet, ob auch kleine Peptide als Hemmer wirken können. Zunächst wurden 14mer Peptide der v6 Region analysiert. Die Peptidsequenzen

entsprachen der Unterteilung der v6 Sequenz in drei gleich große Teile von jeweils 14 AS (Abb. 12 A).

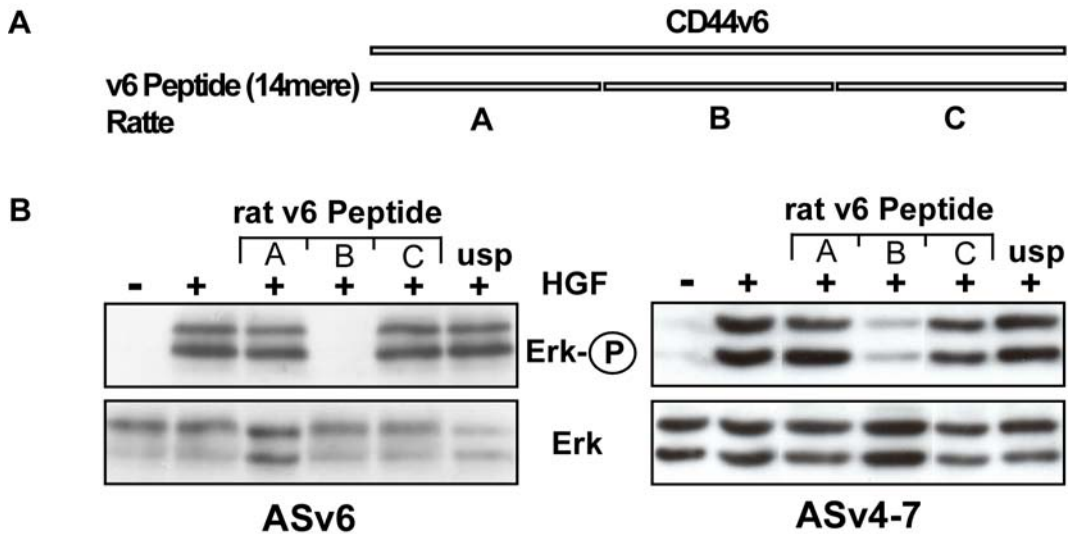


Abb. 12: **Aktivierung von Met wird durch ein v6 spezifisches lineares Peptid verhindert.** (A) Schematische Darstellung der v6 spezifischen 14mere: Peptid A, B und C. (B) AS Zellen, die die v6- (ASv6) bzw. v4-v7-Isoform (ASv4-v7) stabil exprimieren wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well in 6-well Platten ausgesät. Nach 24 h Kultivierung in Abwesenheit von Serum wurden die Zellen für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit den 14mer Peptiden A, B und C (50 ng/ml) bzw. mit einem unspezifischen Kontrollpeptid (usp) behandelt. Anschließend erfolgte die Induktion mit HGF (10 ng/ml) für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Proteine der Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (10% Gel). Die Detektion der spezifischen Proteine im Western Blot erfolgte durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und Erk (untere Reihe). Erk diente als Ladekontrolle.

Nur ein Peptid, Peptid B, war in der Lage HGF-induzierte Erk Aktivierung zu verhindern (Abb. 12 B), gezeigt für AS-Zellen, die entweder mit CD44 v4-v7 oder CD44 v6 transfiziert worden waren. Peptid B enthält die Sequenz Glu, Trp, Gln, deren Mutation zu Alanin in der Linker Scan Mutante Is8 die Aktivierung von Met verhinderte.

Zur Ermittlung des kleinstmöglichen Peptids, das noch als Kompetitor für Met Aktivierung wirkt, wurde ein 3mer, das genau aus den drei in Is8 mutierten AS bestand und ein 5mer, das diese 3 AS enthielt, die von zwei benachbarten AS der Originalsequenz flankiert wurden, synthetisiert. Ein mutiertes 5mer, bei dem



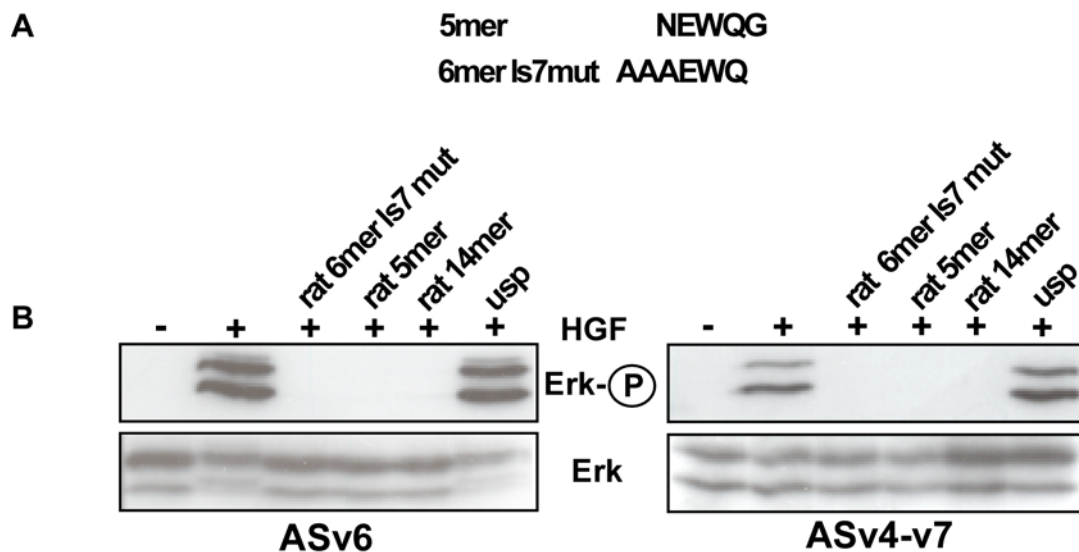


Abb. 14: **Peptide, bei denen die essentiellen AS von AS flankiert werden, die nicht der v6 Sequenz entsprechen, hemmen die Met Aktivierung.** (A) Sequenz des Peptids 6mer Is7 mut. (B) ASv6 und ASv4-v7 Zellen wurden wie in Abb. 12 beschrieben mit den v6 spezifischen Peptiden 6mer Is7mut, rat 5mer, rat 14mer und einem Kontrollpeptid (usp) behandelt und mit HGF induziert. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und gegen Erk (untere Reihe) nachgewiesen.

### 5. Homologe Sequenzen in humanem und Ratten CD44 v6 sind für die Ko-Rezeptor Funktion essentiell

Um zu testen, ob Peptide auch in humanen Zellen die Met Aktivierung hemmen, wurden HT29 Zellen mit dem 5mer (Ratte) behandelt und anschließend die Induktion mit HGF durchgeführt. Die Behandlung mit dem 5mer führte zu keiner Hemmung der Met Aktivierung (Abb. 15 B). Die Sequenz der drei AS, die in der Ratte für die Aktivierung des Met Rezeptors spezifisch ist, divergiert in humanem CD44 v6 bis auf das zentrale Tryptophan (Abb. 15 A).



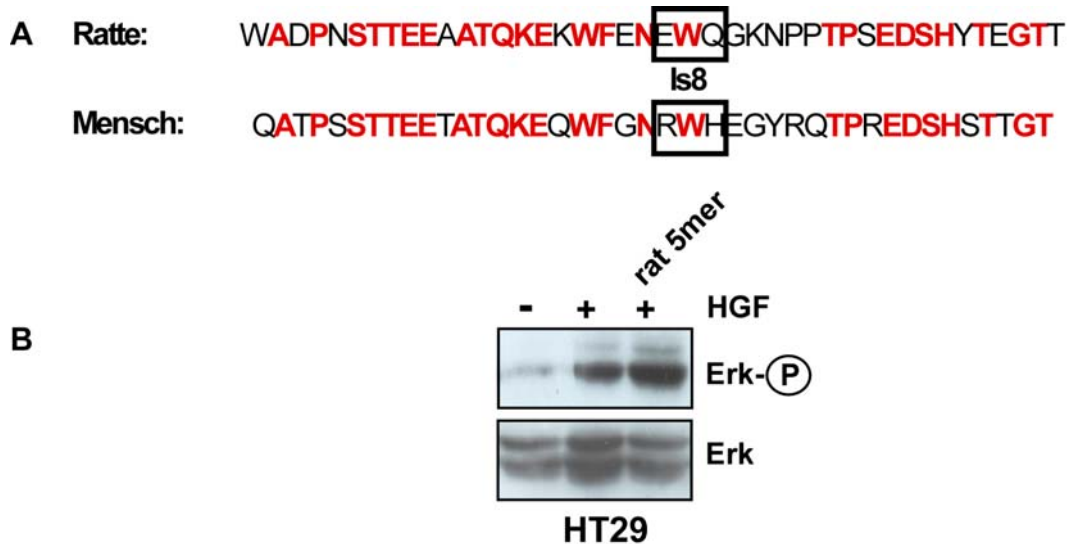


Abb. 15: **Hemmung der Met Aktivierung in humanen Zellen ist durch das Ratten 5mer nicht möglich.** (A) Vergleich der CD44 v6 Sequenz von Ratte und Mensch. (B) Die humane Zelllinie HT29 wurde mit dem 5mer Peptid behandelt und mit HGF induziert wie in Abb. 12 beschrieben. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und gegen Erk (untere Reihe; Ladekontrolle) nachgewiesen.

Aus diesem Grund wurden Peptide entworfen, die der humanen v6 Region entsprechen (Abb. 15 A): drei 14mere der v6 Sequenz, ein 10mer, ein 5mer und ein 6mer, die die AS Arg, Trp, His enthielten. Diese drei Aminosäuren sind die entsprechenden Sequenzen im Menschen zu den durch Linker Scan Mutation identifizierten Aminosäuren Glu, Trp, Gln der Ratte.

Zur Transfektion wurden HT29 Zellen sowie die humane Nierenzelllinie 293 verwendet, die Met und unterschiedliche Isoformen von CD44 exprimieren, darunter Isoformen, die v6 enthalten (Orian-Rousseau et al., 2002). Behandlung der Zellen mit dem 14mer Peptid B führte zu einer Inhibierung der Met Aktivierung (Abb. 16 A), ähnlich der Situation mit den Rattenpeptiden (Abb. 12). Durch Verwendung des 10mers und des 5mers wurde ebenfalls die Met Aktivierung verhindert (Abb. 16 B), ebenso mit einem Peptid mit den AS Arg, Trp, His, sowie drei durch Ala ersetzte benachbarte AS (6mer Is9mut; Abb. 16 B).

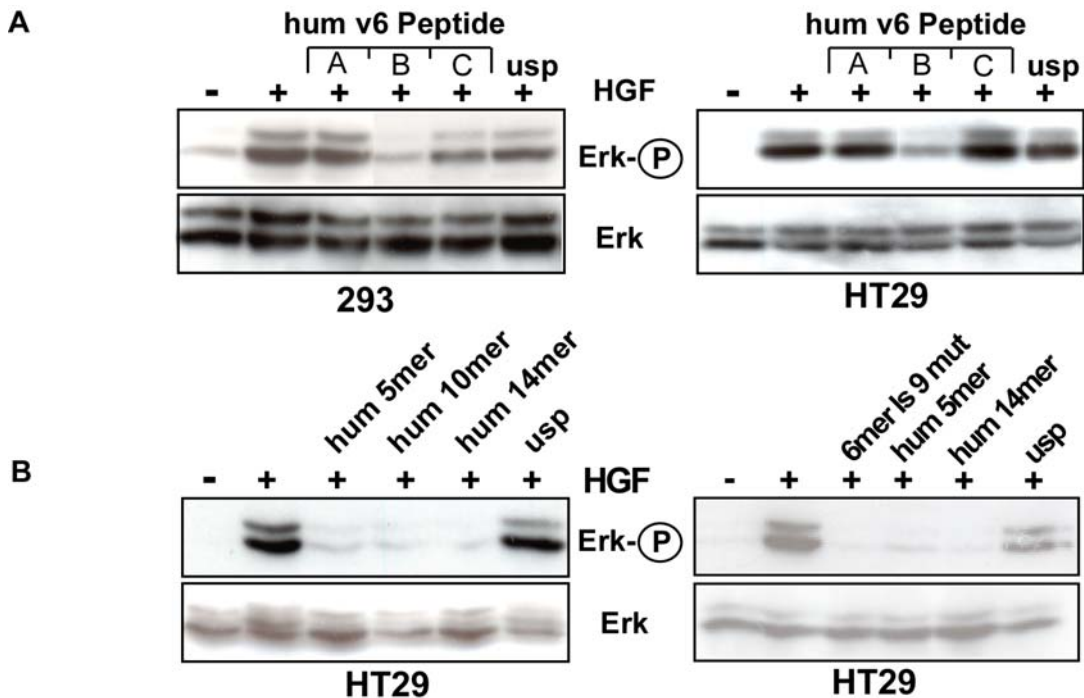


Abb. 16: **Humane Peptide mit der Sequenz Arg, Trp, His verhindern eine Aktivierung von Erk.** Die Inkubation der Zelllinien HT29 und 293 mit den humanen v6 Peptiden A, B, C (A) sowie dem 5mer, 10mer, 14mer (identisch mit Peptid B) (B), 6mer (6mer Is9 mut) und dem Kontrollpeptid (usp) und die anschließende HGF Induktion wurden wie in Abb. 12 beschrieben durchgeführt. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und gegen Erk detektiert (untere Reihe; Ladekontrolle).

Dass die Peptide direkt die Aktivierung des Rezeptors inhibieren, wurde durch Immunopräzipitationen und Tyrosinphosphorylierung von Met nachgewiesen. Die humanen 5mer, 10mer und 14mer Peptide führten zu einer Inhibierung der Phosphorylierung des Met Rezeptors, ähnlich der Wirkung des blockierenden Antikörpers VFF18 (Abb. 17).

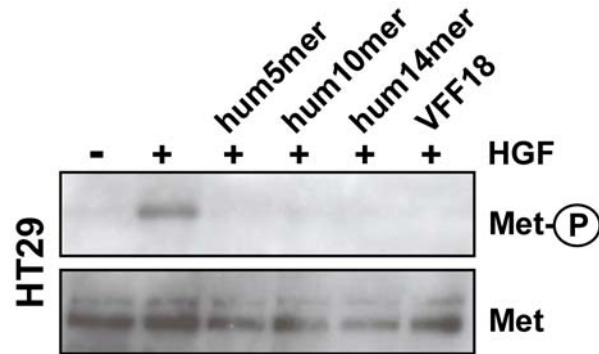


Abb. 17: **Humane v6 Peptide verhindern die Aktivierung des Met Rezeptors.** HT29 Zellen wurden mit dem humanen 5mer, 10mer und 14mer (50 ng/ml) sowie dem v6 spezifischen Antikörper VFF18 (100 µg/ml) behandelt. Die Immunopräzipitation von Met in HT29 erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben unter Verwendung des hMet Antikörpers (C-12). Phosphorylierung von Met wurde mit dem Phospho-Tyrosin Antikörper 4G10 nachgewiesen (obere Reihe). Als Ladekontrolle diente Met. Die Detektion erfolgte mit dem Met-spezifischen Antikörper hMet (C-12) (untere Reihe).

Da für die Ko-Rezeptor Funktion von CD44 die gleichen Bereiche in Mensch und Ratte benötigt werden, könnte man vermuten, dass das konservierte Tryptophan für die Aktivierung von Met eine zentrale Rolle spielt. Jedoch wurde durch Einzelmutteration von Trp zu Ala (Is8.2) sowie durch beide Doppelmutationen (Is8.1+2 und Is8.2+3) der Linker Scan Mutagenese die Aktivierung des Rezeptors nicht verhindert. Dieses Ergebnis sollte durch Verwendung von Peptiden überprüft werden. Dazu wurde ein 5mer Peptid hergestellt, bei dem Trp durch Ala (rat 5mer-2-Ala) ersetzt wurde. Außerdem wurden 5mer Peptide verwendet, bei denen entweder Glu und Trp durch Ala (rat 5mer-1-2-Ala) oder Trp und Gln durch Ala (rat 5mer-2-3-Ala) ersetzt wurden. Die entsprechenden Peptide wurden auch für die humane Sequenz synthetisiert (hum 5mer-2-Ala, hum 5mer-1-2-Ala, hum 5mer-2-3-Ala). Das Peptid rat 5mer-2-Ala in den ASv6 Zellen sowie das Peptid hum 5mer-2-Ala kompetierte in den HT29 Zellen (Abb. 18). Daraus könnte man schließen, dass Trp für die Funktion von CD44 als Ko-Rezeptor nicht essentiell ist. Das humane 5mer-2-Ala blieb im Rattensystem ohne Auswirkung, ebenso das Ratten 5mer-2-Ala im humanen Zellsystem. Dies ist im Einklang mit der speziesspezifischen Wirkung des 5mer Peptids (Abb. 15). Sowohl mit den

Ratten als auch mit den humanen Peptiden 5mer-1-2-Ala und 5mer-2-3-Ala ging in den entsprechenden Zelllinien die Hemmung verloren. Demnach werden die beiden AS Glu und Gln in Ratte und Arg und His im Menschen für die Aktivierung von Met durch CD44 v6 benötigt. Dieser Befund ist im Gegensatz zu der Beobachtung mit den Linker Scan Mutanten (Abb. 10), bei denen der Austausch von Glu oder Gln alleine oder zusammen mit Trp nicht ausreichte um die Ko-Rezeptorfunktion zu verlieren.

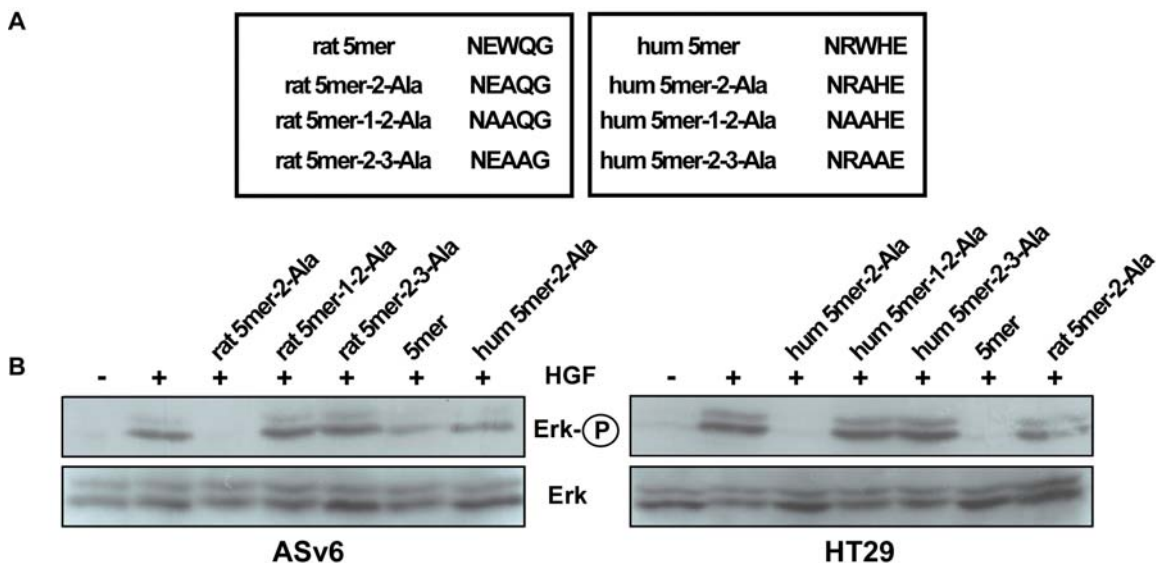


Abb. 18: **Das konservierte Tryptophan ist für die Ko-Rezeptor Funktion nicht relevant.** (A) Sequenzen der verwendeten Peptide. (B) Die humane Zelllinie HT29 und die Rattenzelllinie ASv6 wurden mit den angegebenen Peptiden der entsprechenden Spezies und HGF wie in Abb. 12 behandelt. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe) und gegen Erk detektiert (untere Reihe; Ladekontrolle).

## 6. CD44 v6 ist auch ein Ko-Rezeptor für die Rezeptortyrosinkinase Ron

Met und die Tyrosinkinasen Ron und Sea bilden aufgrund großer struktureller Ähnlichkeiten eine Rezeptorfamilie (Comoglio and Boccaccio, 1996). Die Tyrosinkinase Ron zeigt die größte Homologie zu Met. Sie wird ausschließlich auf menschlichen Zellen synthetisiert. Um zu testen, ob für die Aktivierung von Ron durch seinen Liganden MSP ebenfalls CD44 v6 benötigt wird, wurde die Aktivierung von Ron in Gegenwart CD44 v6 spezifischer Antikörper gemessen.

Dazu wurden zwei Zelllinien verwendet, die Ron exprimieren: HT29 und HCT116, eine Colon-Karzinom Zelllinie, die ebenfalls wie HT29 unterschiedliche CD44 Isoformen exprimiert.

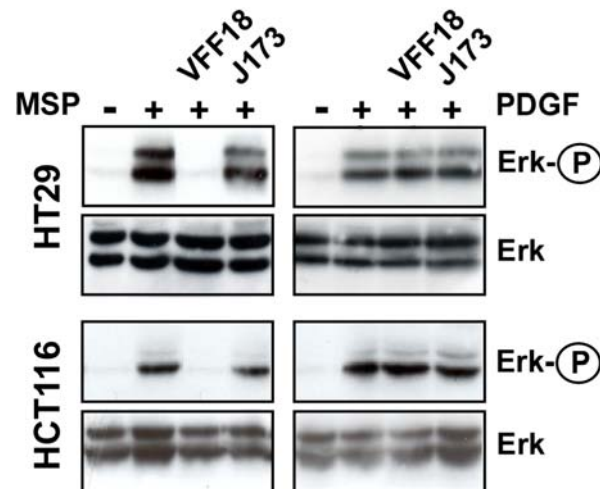


Abb. 19: **Die Aktivierung von Ron wird durch den CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18 verhindert.** HT29 und HCT116 Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well (6-well-Platte) ausgesät und für 24 h ohne Serum kultiviert. Die Zellen wurden mit dem v6 spezifischen Antikörper VFF18 bzw. dem CD44 Antikörper J173 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  behandelt. Anschließend erfolgte die Induktion mit MSP bzw. PDGF zur Kontrolle (10  $\text{ng/ml}$ ) für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Proteine der hergestellten Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die spezifischen Proteine wurden im Western Blot mit dem Phospho-Erk Antikörper (obere Reihe) und dem Erk Antikörper nachgewiesen (untere Reihe; Ladekontrolle).

In HT29 Zellen sowie in HCT116 Zellen führte der CD44 v6 spezifische Antikörper VFF18 zu einer Hemmung der durch den Ron-spezifischen Liganden MSP ausgelösten Aktivierung von Ron. Der Antikörper J173, der ein Epitop erkennt, das entfernt von v6 Sequenzen liegt, hatte keine Auswirkung auf die MSP-induzierte Aktivierung von Ron (Abb. 19).

Eine Behandlung mit dem CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18 zeigte keine Auswirkung auf die Aktivierung des PDGF-Rezeptors durch PDGF (Abb. 19). Somit scheint CD44 v6 nicht generell als universeller Ko-Rezeptor für Rezeptor-tyrosinkinasen zu agieren.

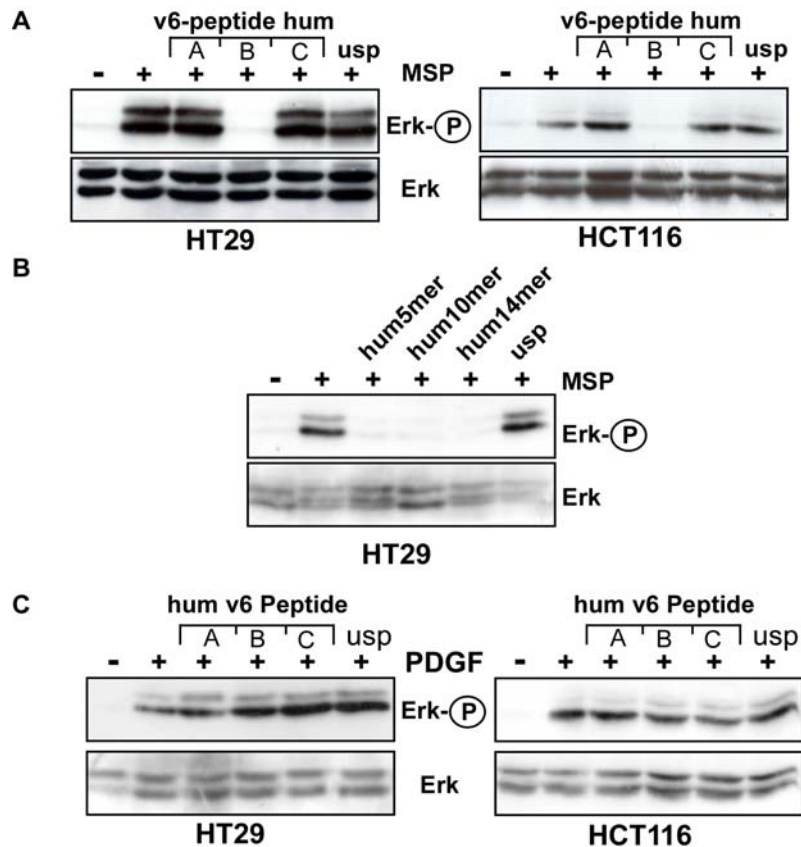


Abb. 20: **Aktivierung von Ron wird durch die humanen CD44 v6 Peptide inhibiert.** HT29 und HCT116 Zellen wurden unter den in Abb. 12 beschriebenen Bedingungen mit den Peptiden und den Wachstumsfaktoren MSP und PDGF behandelt. Die Proteine wurden durch Antikörper gegen Phospho-Erk (obere Reihe), sowie durch Antikörper gegen Erk (untere Reihe) nachgewiesen. (A) Überprüfung auf Ron Aktivierung nach Behandlung mit den humanen Peptiden A, B, und C. (B) Überprüfung auf Aktivierung von Ron nach Behandlung mit dem humanen 5mer, 10mer und 14mer. (C) Aktivierung des PDGF-Rezeptors nach Inkubation mit den humanen 14mer Peptiden Peptid A, B, C. Die Zellen wurden zur Kontrolle jeweils mit einem unspezifischen Peptid (usp) behandelt.

## 7. Humane CD44 v6 Peptide blockieren auch die Aktivierung von Ron

Da auch Ron für die Aktivierung CD44 v6 benötigt, wurde getestet, ob die humanen v6 Peptide auch die Aktivierung von Ron inhibieren können. Dies war tatsächlich der Fall: in den Zelllinien HT29 und HCT116 blockierte das humane 14mer, 10mer sowie das 5mer die MSP-induzierte Aktivierung des Ron Rezeptors (Abb. 20 A und B ). Demnach wird die Aktivierung von Ron durch den

gleichen Bereich in CD44 v6 vermittelt wie die Aktivierung von Met. Aktivierung des PDGF-Rezeptors wurde durch die Peptide nicht beeinflusst (Abb. 20 C).

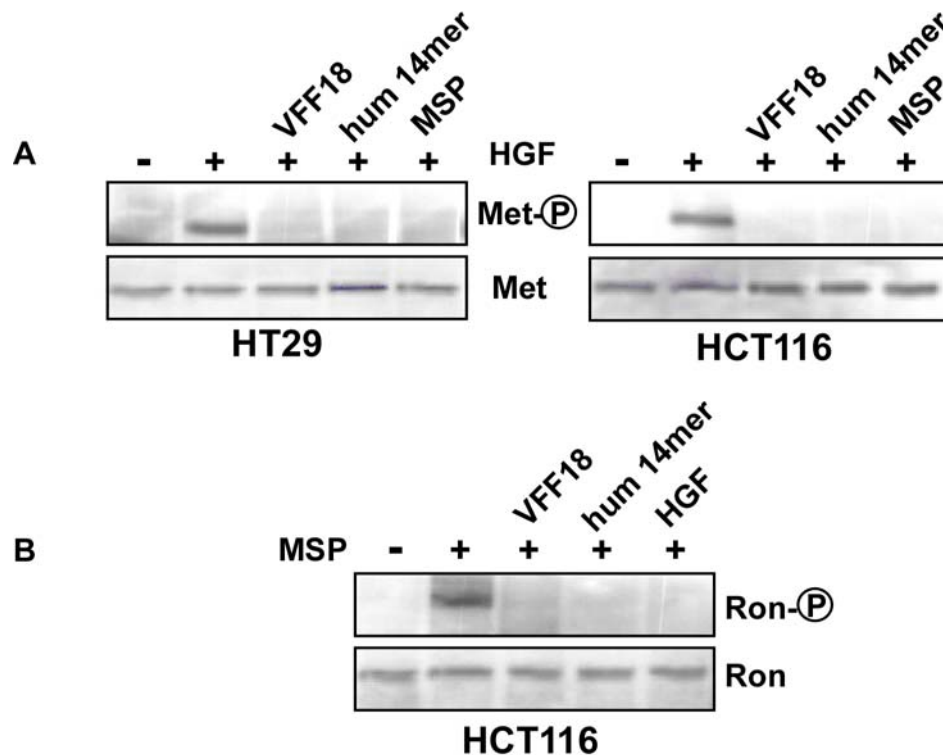


Abb. 21: **Aktivierung von Met und Ron durch CD44 v6 benötigt keine Heterodimerisierung.** Immunopräzipitation von Met (A) bzw. Ron (B) in HT29 und HCT116 Zellen erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Die Zellen wurden mit dem v6 spezifischen Antikörper VFF18 und dem humanen 14mer behandelt und mit HGF bzw. MSP induziert. Met wurde unter Verwendung des hMet Antikörpers (C-12), Ron mit dem Ron Antikörper (C-20) immunopräzipitiert. Phosphorylierung von Met (A obere Reihe) bzw. von Ron (B obere Reihe) wurde mit dem Phospho-Tyrosin Antikörper 4G10 nachgewiesen, die Ladekontrolle erfolgte unter Verwendung des hMet Antikörpers (A unter Reihe) und des Ron Antikörpers (B unter Reihe).

Es wurde beschrieben, dass Met und Ron Heterodimere bilden können, die wahlweise durch MSP oder HGF aktiviert werden können (Follenzi et al., 2000). Wäre dies in den hier verwendeten Zellen der Fall, könnte CD44 v6 zur Aktivierung von Met über Ron bzw. von Ron über Met führen. Deshalb wurde getestet, ob die Aktivierung von Met gleichzeitig zur Aktivierung von Ron und umgekehrt führen kann. Die Behandlung von HT29 und HCT116 Zellen mit MSP



fürte nicht zur Aktivierung von Met (Abb. 21 A). Ebenso kam es nach Induktion von HCT116 Zellen mit HGF zu keiner Autophosphorylierung von Ron (Abb. 21 B). Die Aktivierung der Rezeptoren durch ihre spezifischen Liganden wurde jedoch durch den CD44 v6 spezifischen Antikörper, sowie das humane spezifische 14mer Peptid blockiert (Abb. 21 A und B). Daraus ergibt sich, dass in diesen Zellsystemen eine Heterodimerisierung von Met und Ron nicht vorliegt.

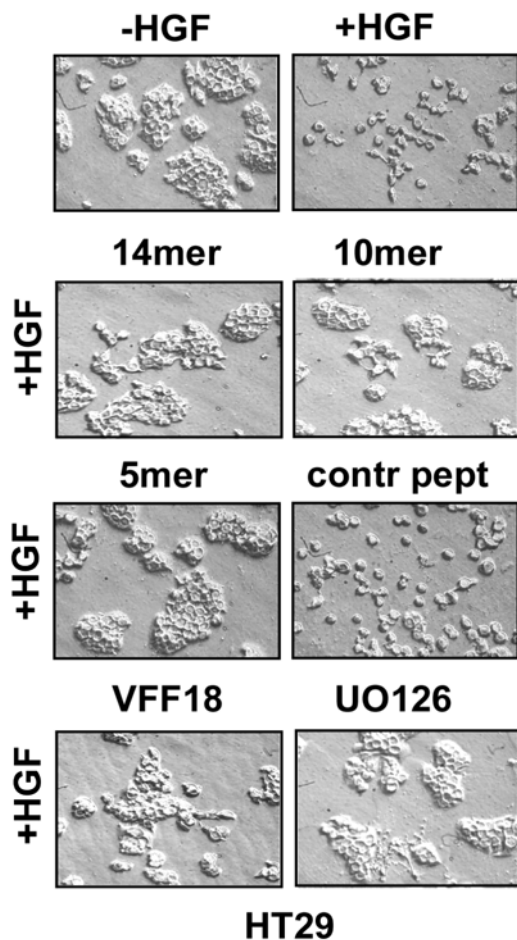


Abb.: 22: **Die humanen CD44 v6 spezifischen Peptide können das durch HGF induzierte Verlassen des Zellverbandes verhindern.** Die Zellen wurden in einer Dichte von  $4.5 \times 10^4$  Zellen/well (24-well-Platte) ausgesät und für 24 h unter Serumentzug kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe der humanen 5mer, 10mer und 14mer Peptide, des Kontrollpeptids (usp) (jeweils 50 ng/ml), des v6 spezifischen Antikörpers VFF18 (100  $\mu$ g/ml) bzw. des MAPK-Inhibitors UO126 (10  $\mu$ mol/l) für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde HGF (50 ng/ml) zugegeben. Die Zellen wurden nach 12 h und 24 h auf das Migrationsverhalten am Phasen-Kontrast Mikroskop untersucht. Vergrößerung 40x.

### 8. CD44 v6 Peptide verhindern Migration und Invasion von Tumorzellen

Die Aktivierung der Rezeptoren Met und Ron verursacht in vielen Zellen Zellmigration (Comoglio et al., 1999). Da die kurzen, linearen Peptide die Aktivierung der Rezeptoren verhindern, ist anzunehmen, dass die Peptide ebenso Migration hemmen. Dies wurde in zwei Testsystemen untersucht: HT29 Zellen wachsen in Zellaggregaten, sog. „Zellclustern“. Zugabe von HGF



fürte zum Verlassen der Zellen aus dem Zellverband. Durch Behandlung mit dem humanen 14mer, 10mer sowie dem 5mer konnte das Verlassen des Zellverbandes verhindert werden, ähnlich der Inhibierung mit dem CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18. Ein unspezifisches Kontrollpeptid hatte keine Auswirkung (Abb. 22).

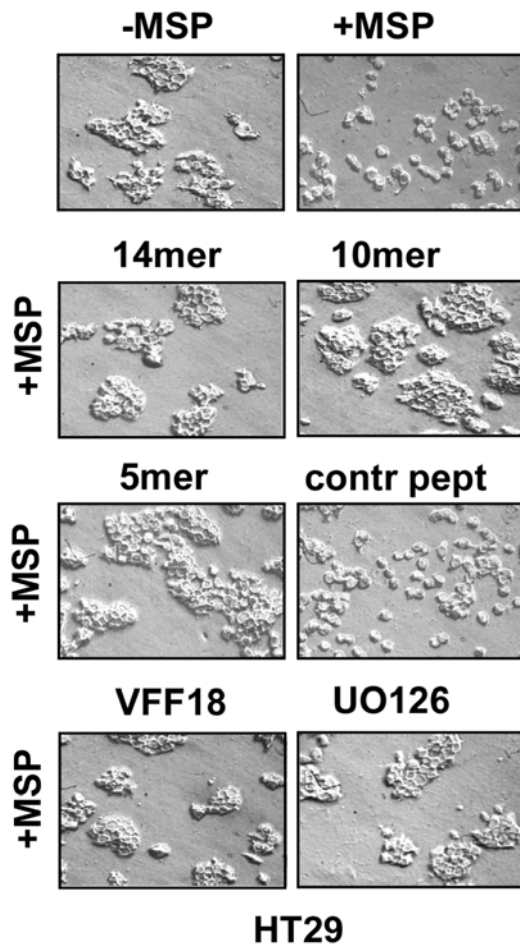


Abb.: 23: **Humane CD44 v6 spezifische Peptide verhindern die MSP-induzierte Streuung.** Die Zellen wurden in einer Dichte von  $4.5 \times 10^4$  Zellen/well (24-well-Platte) kultiviert. Die Behandlung der Zellen mit den 5mer, 10mer und 14mer Peptiden, dem CD44 v6 Antikörper VFF18, sowie dem MAPK-Inhibitor UO126 und Induktion mit MSP erfolgten wie in Abb. 22 beschrieben. Die Zellen wurden nach 12 h und 24 h auf das Migrationsverhalten am Phasen-Kontrast Mikroskop untersucht. Vergrößerung 40x.

Der Wachstumsfaktor MSP führte ebenfalls zur Streuung der Zellen. Gleichzeitige Behandlung mit den humanen v6 spezifischen Peptiden hemmte die Streuung (Abb. 23). Somit können physiologische Antworten auf die Wachstumsfaktoren HGF und MSP durch die CD44 v6 spezifischen Peptide gehemmt werden.

Migration und Invasivität von Zellen kann man mittels des Boyden Chamber Assays untersuchen. In diesem Test wird die Translokation von Zellen durch eine Membran oder die Einwanderung in eine Matrix unter dem Einfluss eines Wachstumsfaktors gemessen. HT29 Zellen reagierten durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren HGF bzw. MSP mit verstärkter Migration durch eine Membran (Abb. 24 A). Wurden die Zellen vor der Behandlung mit dem Wachstumsfaktor mit den spezifischen Peptiden verschiedener Länge inkubiert, so wurde die Migration der Zellen verhindert (Abb. 24 A).

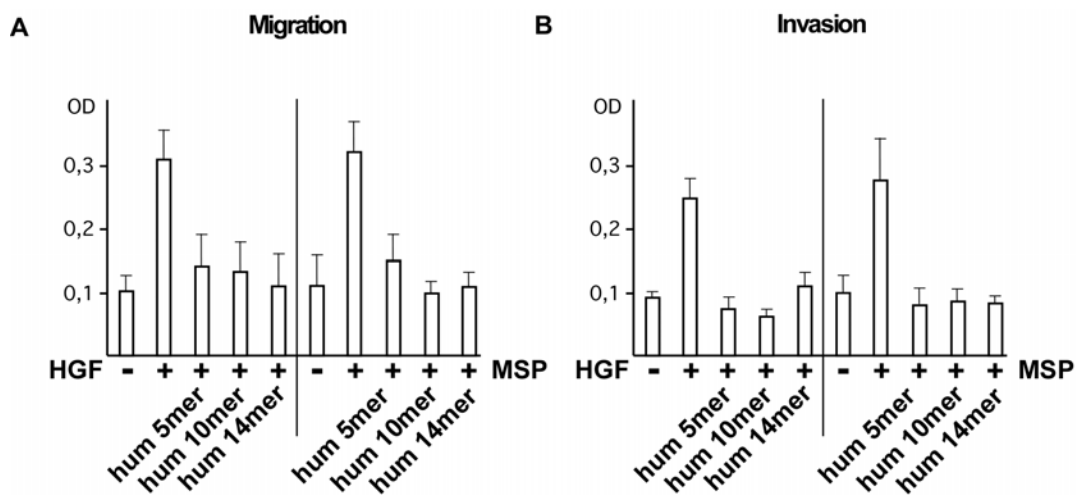


Abb. 24: **CD44 v6 Peptide verhindern HGF- und MSP-induzierte Migration und Invasion.** (A) Migration und (B) Invasion von HT29 (im Fall von (B) mit Matrigel beschichteten Transwell-Einheiten) wurde ohne oder mit Behandlung von HGF oder MSP in An- oder Abwesenheit von CD44 v6 spezifischen Peptiden gemessen.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in das obere Kompartiment der Transwell-Einheit gesät. Die 5mer, 10mer und 14mer Peptide (50 ng/ml) wurden zu den Zellen gegeben und nach 30 min entweder mit HGF oder mit MSP induziert (50 ng/ml). Jeder Balken repräsentiert den Durchschnittswert drei unabhängiger Messungen. Standardabweichung ist angegeben.

Die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren HGF und MSP führte ebenso zu einer verstärkten Invasion der Zellen in Matrigel, das auf die Membran der oberen Kammer aufgebracht wird (Abb. 24 B). Die Invasionsfähigkeit der Zellen wurde ebenfalls durch Inkubation mit den v6 spezifischen Peptiden gehemmt (Abb. 24 B).

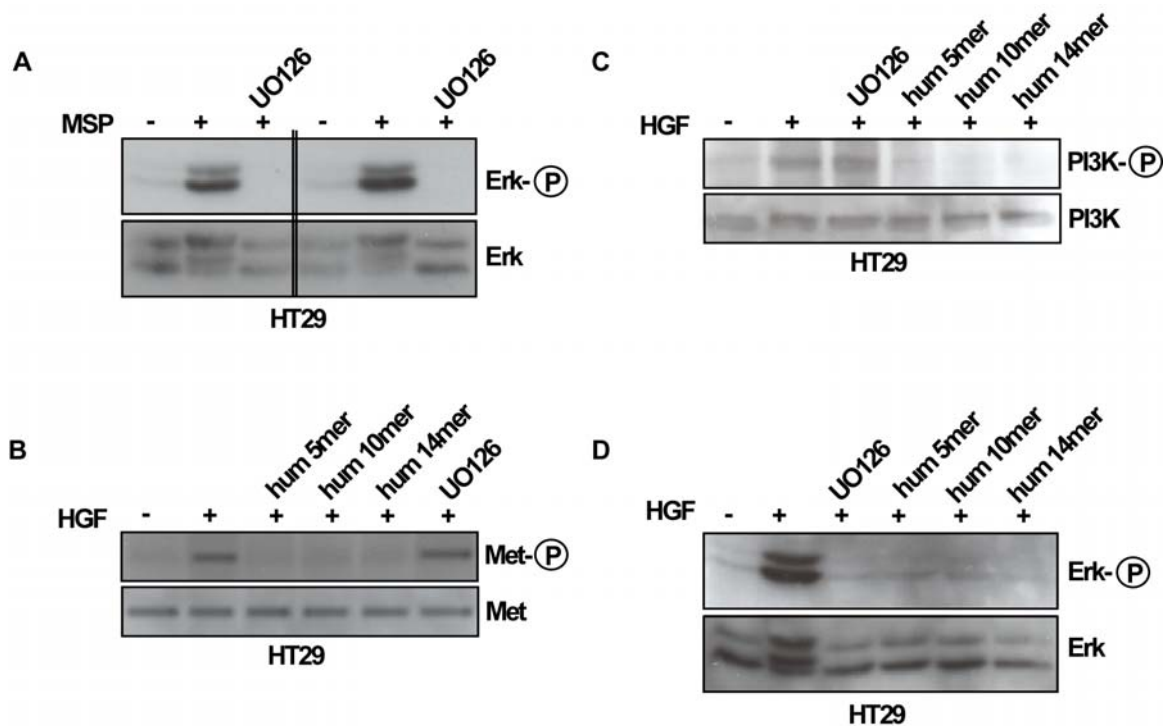


Abb. 25: **Der MAPK-Inhibitor UO126 hat keine Auswirkung auf die Aktivierung von Met oder PI3 Kinase.** (A) HT29 Zellen wurden mit dem MAPK-Inhibitor UO126 (Endkonzentration 10  $\mu\text{mol/l}$ ) vor Induktion mit HGF bzw. MSP behandelt und auf Aktivierung von Erk mit dem Phospho-Erk Antikörper (obere Reihe) überprüft. Die Ladekontrolle erfolgte gegen Erk (untere Reihe). (B) + (C) Immunopräzipitation von Met in HT29 Zellen mit dem hMet Antikörper (C-12) und von PI3 Kinase mit dem PI3 Kinase Antikörper (Z-8) erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben, nachdem die Zellen mit dem humanen 5mer, 10mer, 14mer Peptid oder dem MAPK-Inhibitor UO126 und mit HGF behandelt wurden. Ein Teil des Lysates wurde vor der Met IP abgenommen um die Erk Aktivierung zu überprüfen (gezeigt in D). Die immunopräzipitierten Proteine wurden im Western Blot mit dem Phospho-Tyrosin Antikörper 4G10 (obere Reihe) nachgewiesen. Die Ladekontrolle erfolgte mit dem hMet Antikörper und mit dem PI3 Kinase Antikörper (untere Reihe). (D) Überprüfung des vor der Met IP abgenommenen Lysates auf Aktivierung von Erk durch den Phospho-Erk Antikörper (obere Reihe). Die Ladekontrolle ist gegen Erk gerichtet (untere Reihe).

Zellmigration wird häufig durch den PI3 Kinase-Signalweg vermittelt, der ebenfalls wie der MAPK-Signalweg durch den aktivierten Met Rezeptor induziert werden kann. Es wurde daher getestet, ob in den HT29 Zellen dieser Signalweg aktiviert wird und ob er durch Peptide gehemmt werden kann. Dies war tatsächlich der Fall: PI3 Kinase wird aktiviert, nach Behandlung mit den Peptiden

war PI3 Kinase nicht phosphoryliert (Abb. 25 C). Die CD44 v6 spezifischen Peptide blockieren somit nicht nur den MAPK-, sondern auch den PI3 Kinase Signalweg.

Die Aktivierung des MAPK-Signalweges führt meistens zur Zellproliferation (Jiang et al., 1993). Interessanterweise resultiert die Aktivierung des MAPK-Signalweges in HT29 Zellen nicht in Proliferation (Orian-Rousseau et al., 2002; Tanimura et al., 1998). Um zu testen, ob in den HT29 Zellen der MAPK-Signalweg zur Migration beiträgt, wurde der MAPK-Inhibitor UO126 verwendet, der spezifisch Erk Aktivierung hemmt. Dieser verhinderte das Absiedeln von HT29 Zellen aus dem Zellverband (Abb. 22 und 23) und zeigt damit, dass in diesen Zellen tatsächlich der MAPK-Signalweg zur Zellmigration beiträgt. Der Inhibitor hemmt spezifisch den MAPK-Signalweg: Er blockiert die HGF- oder MSP-induzierte Erk Phosphorylierung (Abb. 25 A und D), aber nicht die Autophosphorylierung von Met oder die Aktivierung von PI3 Kinase (Abb. 25 B und C).

### **9. CD44 v6 spezifische Peptide verhindern nicht HGF Bindung**

Da durch die Peptide die Aktivierung der Rezeptoren so effizient verhindert wird, andererseits als ein Beitrag von CD44 v6 zur Met Aktivierung die Bindung von HGF identifiziert wurde (Abb. 4), wurde getestet, ob die v6 spezifischen Peptide die Bindung von HGF an CD44 verhindern können. Weder die Behandlung mit den drei unterschiedlichen 14meren (Peptid A, B, C Ratte), noch die Behandlung mit dem 5mer (Ratte) führten, zu einer Hemmung der Bindung von HGF in ASv6 Zellen (Abb. 26).

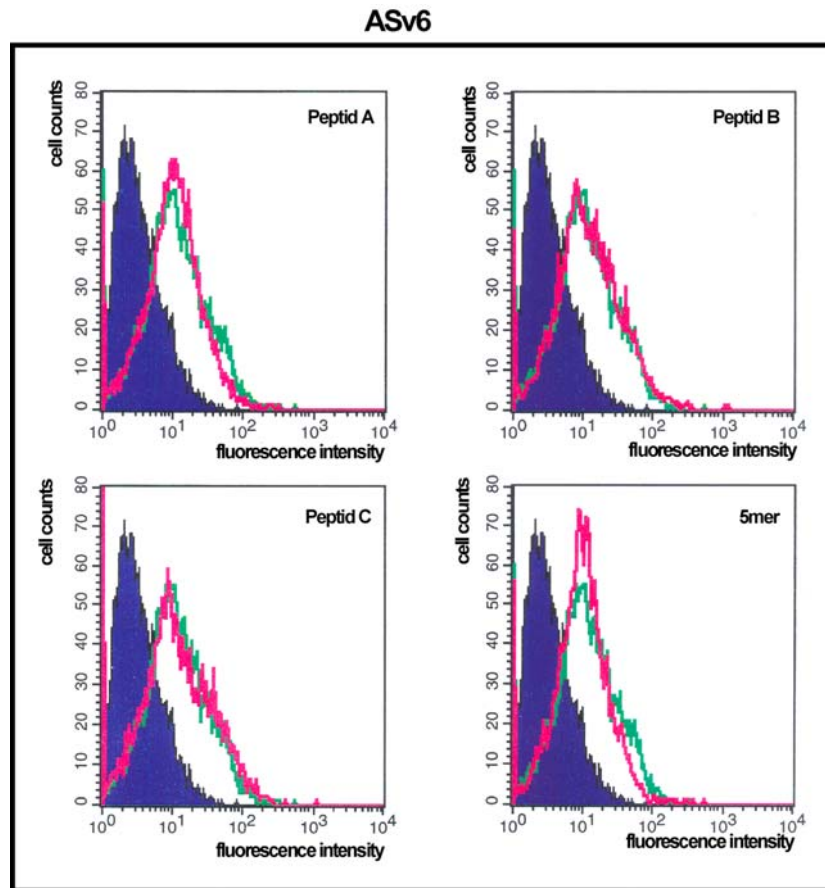


Abb. 26: **Ratten CD44 v6 Peptide verhindern die Bindung von HGF an ASv6 Zellen nicht.** ASv6 Zellen wurden mit den verschiedenen Ratten CD44 v6 spezifischen Peptiden (Peptid A, B, C und 5mer) für 5 min bei 37°C inkubiert (50 ng/ml). Die Behandlung mit bioHGF und FITC-Streptavidin erfolgte bei Raumtemperatur wie in Abb. 4 beschrieben. Die grüne Linie repräsentiert die Zellen, die mit HGF induziert wurden, die rote Linie die Zellen, vor der Induktion mit HGF mit den verschiedenen v6 Peptiden behandelt wurden. In violett sind die Zellen dargestellt, die nur mit FITC-Streptavidin inkubiert wurden.

Ob es durch Behandlung mit CD44 v6 spezifischen Peptiden zu einer Beeinflussung der HGF Bindung kommt, wurde außerdem in den humanen Zelllinien T47D und T47D2A untersucht (siehe Kapitel 1). Durch die Behandlung mit den humanen CD44 v6 14meren konnte auch hier keine veränderte Bindung von HGF beobachtet werden (Abb. 27). Demnach muss zur Bindungsvermittlung von HGF ein anderer Bereich in v6 wichtig sein als der zur Aktivierung von Met durch die drei AS Glu-Trp-Glu charakterisierte. Die Aktivierung des Met

Rezeptors durch die v6 Peptide und die Bindung von HGF durch CD44 sind somit zwei unabhängige Vorgänge.

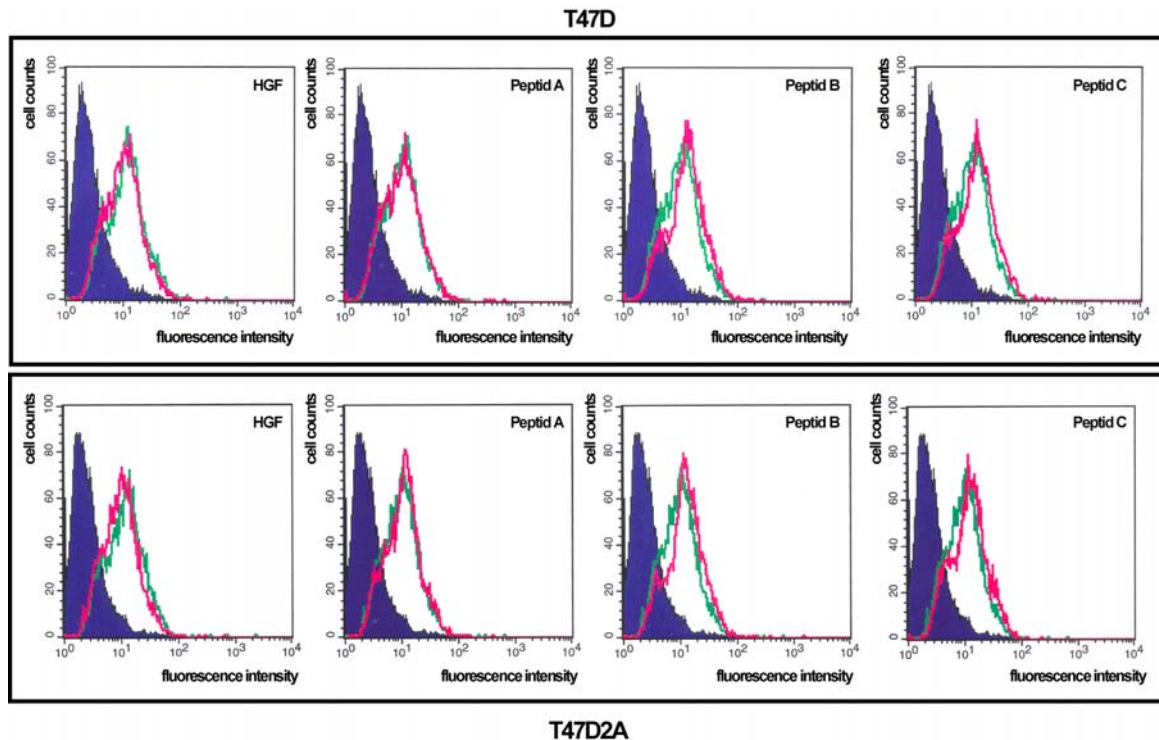


Abb. 27: Die HGF Bindung wird durch humane CD44 v6 spezifische Peptide nicht beeinflusst. Die Zelllinien T47D und T47D2A wurden mit den humanen 14meren Peptid A, B und C für 5 min bei 37°C behandelt (50 ng/ml) und mit bioHGF (10 ng/ml - grüne Linie; 30 ng/ml – rote Linie) bei Raumtemperatur induziert. Die weitere Aufbereitung der Zellen zur FACS Analyse erfolgte wie in Abb. 4. Mit FITC-Streptavidin behandelte Zellen sind in violett dargestellt.

### 10. Die Bindung von HGF wird durch Expression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 sowie dem CD44 v6 spezifischen Antikörper verhindert

Der Vergleich der beiden Zelllinien AS und ASv6 hat deutlich gemacht, dass die Bindung von HGF spezifisch von v6 Sequenzen abhängt (Abb. 4). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob T47D und T47D2A Zellen unter Verwendung des v6 spezifischen Antikörpers VFF18, durch Überexpression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 sowie durch eine Mischung der CD44 v6 spezifischen 14mere (zu gleichen Teilen) in ihrem Bindungsverhalten an HGF beeinflusst werden.

Durch die Überexpression der Ectodomäne von CD44s kam es zu keiner veränderten Bindung von HGF, dagegen konnte durch Überexpression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 die HGF Bindung in beiden Zelllinien vollständig verhindert werden. Während die Mischung der humanen CD44 v6 spezifischen Peptide in keiner signifikanten Änderung der HGF Bindung resultierte, war durch die Behandlung mit dem CD44 v6 spezifischen Antikörper die Bindung von HGF an beide Zelllinien nicht mehr möglich (Abb. 28).

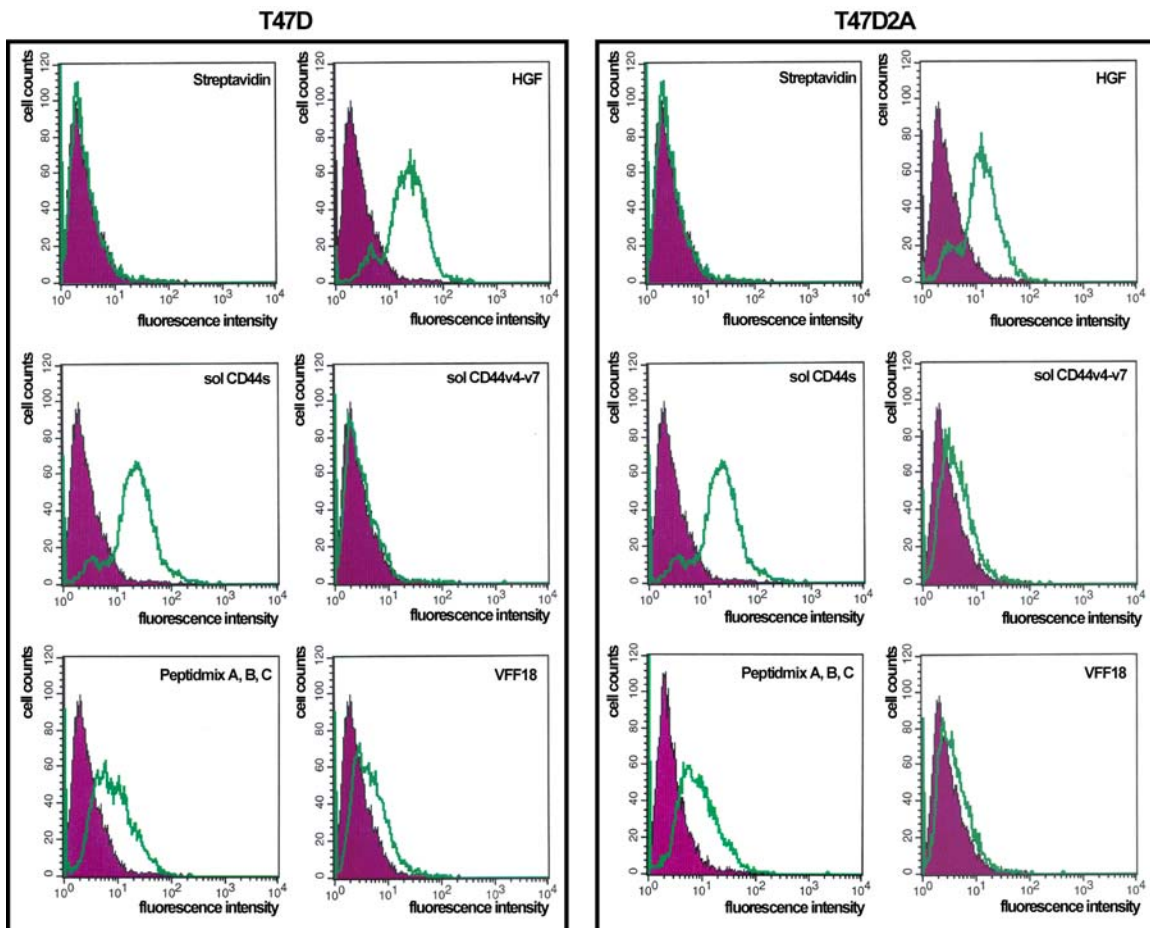


Abb. 28: **Bindung von HGF wird durch den CD44 v6 spezifischen Antikörper, sowie durch Expression der Ectodomäne von CD44 v4-v7 verhindert.** Die Zelllinien T47D und T47D2A wurden mit einer Mischung der humanen Peptide A, B, und C (je 50 ng/ml), dem CD44 v6 spezifischen Antikörper VFF18 (100 µg/ml) behandelt oder mit der Ectodomäne von CD44s (sol CD44s) bzw. der Ectodomäne von CD44 v4-v7 (sol CD44 v4-v7) transfiziert. Induktion bei Raumtemperatur und Vorbereitung der Proben zur FACS Analyse erfolgte wie in Abb. 4 beschrieben. Die grüne Linie repräsentiert die Zellen nach der Behandlung mit bioHGF, in violett sind die Zellen nach Inkubation mit FITC-Streptavidin dargestellt.

Eine Abhängigkeit der HGF Bindung von der Anwesenheit von v6 Sequenzen konnte somit durch Verwendung des v6 spezifischen Antikörpers, sowie durch Konkurrenz mit der Ectodomäne von CD44 v4-v7 bestätigt werden.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit drei Aminosäuren identifiziert, die für die Funktion von CD44 als Ko-Rezeptor für die Aktivierung von Rezeptor-tyrosinkinasen der Met Familie verantwortlich sind. Eine Funktion von CD44 v6 als Ko-Faktor besteht auch in der Bindung von HGF als Voraussetzung für Met Aktivierung. Diese Funktion der HGF Bindung ist aber unabhängig von den zuvor identifizierten AS, obwohl sie ebenfalls strikt von v6 Sequenzen abhängt. Demnach muss deutlich zwischen HGF Bindung und der Abhängigkeit der Aktivierung des Rezeptors durch die drei in der Mutagenese identifizierten AS unterschieden werden.



## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Aktivierung von Met und Ron durch CD44 v6 Variantenproteine zwei Aktivitäten von CD44 v6 identifiziert. Eine Aktivität wurde durch Linker Scan Mutagenese definiert. Drei AS der 42 AS umfassenden v6 Sequenz sind essentiell für die Funktion von CD44 als Ko-Rezeptor für Met. CD44 v6 Peptide, die diese drei AS enthalten und eine minimale Größe von fünf AS aufweisen, hemmen die Aktivierung von Met und Ron. Interessanterweise sind diese Peptide speziesspezifisch, für Ratte und Mensch also unterschiedlich. Als zweite Aktivität wurde die Bindung von HGF, des Liganden von Met, an CD44 v6 identifiziert. Bindung von HGF wird jedoch von den oben genannten Peptiden nicht gehemmt. Der Befund, dass einerseits die Peptide speziesspezifisch wirken, aber nicht die Bindung von HGF hemmen, ist in Einklang mit der Tatsache, dass das gleiche rekombinante HGF im humanen und Rattensystem verwendet wurde.

Wahrscheinlich beeinflussen die Peptide die Interaktion von CD44 und Met bzw. Ron und verhindern dadurch die Aktivierung der Tyrosinkinasen. Erstaunlicherweise kann aber die Ectodomäne von CD44 v4-v7 der Ratte die Aktivierung von humanem Met inhibieren (Orian-Rousseau et al., 2002) und ein CD44 v4-v7 Protein der Ratte erlaubt die Aktivierung von humanem Met (V. Orian-Rousseau, nicht publiziert), zeigt also im Gegensatz zu den Peptiden keine Speziesspezifität. Eine Erklärung für diesen scheinbar widersprüchlichen Befund könnte folgende sein: Die drei essentiellen AS, die auch in den Peptiden vorkommen, sind selbst nicht an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt, werden jedoch für eine korrekte Faltung von CD44 benötigt, die erst die Interaktion mit Met erlaubt. Diese Faltung wäre dann in Mensch und Ratte von unterschiedlichen AS abhängig und könnte nur durch homologe und nicht durch heterologe Peptide beeinflusst werden. Die Interaktion mit dem Rezeptor würde durch einen anderen Bereich von CD44 vermittelt werden, der außerhalb von v6 liegt, da in der Linker Scan Analyse keine solche Sequenz in v6 gefunden wurde.

Ein weiterer scheinbar widersprüchlicher Befund ist folgender: Die Linker Scan Mutagenese definierte drei AS, die gemeinsam verändert werden müssen damit die Ko-Rezeptorfunktion von CD44 v6 verloren geht. Die Mutation jeder einzelnen oder jeweils von zwei AS führt nicht zum Funktionsverlust (Abb. 10). Dem steht die Beobachtung gegenüber, dass in den Peptiden nur das zentrale Tryptophan ausgetauscht werden konnte, ohne dass es zu einem Funktionsverlust kam (Hemmung der Aktivierung, Abb. 18), während die beiden flankierenden AS jede für sich oder gemeinsam zum Funktionsverlust führten (konnten die Aktivierung des Rezeptors nicht mehr hemmen Abb.18). Erklären könnte man diesen Befund dadurch, dass in der kompletten Ectodomäne (Linker Scan Mutanten) jeweils eine der kritischen AS die zur Ko-Rezeptorfunktion benötigte Faltung erlaubt, jedoch ist die durch nur ein oder zwei AS in den kleinen Peptiden vermittelte Peptidinteraktion zu schwach um mit der korrekten Faltung des Proteins zu kompetieren. Offensichtlich ist die Bindung eines 3mers der authentischen Peptide selbst auch nicht ausreichend (Abb. 13).

Erstaunlich ist, dass Peptide von so geringer Größe die Aktivierung der Rezeptoren verhindern können. Bisher gibt es nur wenige Beispiele für eine ähnlich effiziente Wirkung von kurzen Peptiden. Am bekanntesten sind die RGD Peptide, die mit der Integrinfunktion interferieren. Integrine binden an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen, die diese Sequenz enthalten. Durch Verwendung von Peptiden dieser Sequenz wird die Zelladhäsion gehemmt. Dies wurde unter anderem durch Inhibierung der Invasion von Tumorzellen *in vitro*, sowie Tumorausbreitung *in vivo* gezeigt (Ruoslahti, 1996). Ein anderes Beispiel für die Inhibierung spezifischer Interaktionen durch kleine Peptide sind die Typ I Cadherine. Peptide mit der hoch konservierten Sequenz von drei Aminosäuren (His-Ala-Val) in der homophilen Bindungsregion, konnten Cadherin-abhängige Prozesse wie Zellaggregation und Neuritenwachstum verhindern (Mege et al., 1992).

Außer mit CD44 kann die Met Aktivierung durch andere Ko-Faktoren beeinflusst werden. Solche Ko-Faktoren sind Integrin  $\alpha 6\beta 4$  und Plexine (Bertotti and Comoglio, 2003). Die Wirkmechanismen unterscheiden sich jedoch deutlich von dem durch CD44 v6 vermittelten: Integrin  $\alpha 6\beta 4$  und Met bilden einen Komplex auf der Zellmembran. Die Autophosphorylierung von Met durch HGF resultiert in der Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teiles von  $\alpha 6\beta 4$ , wodurch neue, integrinspezifische Signaltransduktionsmoleküle rekrutiert werden können (Trusolino et al., 2001). Dementsprechend ist der extrazelluläre Teil des Integrins nicht benötigt. Auch Plexin B1 führt zur Bildung eines Komplexes auf der Zelloberfläche mit Met. Die Bindung von Sema 4D, des spezifischen Liganden, an Plexin B1 stimuliert nicht nur Plexin B1, sondern auch die Kinaseaktivität von Met, was in der Phosphorylierung beider Rezeptoren resultiert. Umgekehrt führt auch die HGF-induzierte Met Aktivierung zur Phosphorylierung von Plexin B1 (Giordano et al., 2002). Auch in einigen CD44-defizienten Zellen (Hepatozyten, die Hepatomzelllinie HepG2) und in Keratinozyten von CD44 knock-out Mäusen kann Met durch HGF aktiviert werden. Hier findet vermutlich die Übernahme der Ko-Rezeptorfunktion von CD44 v6 durch Moleküle statt die, die für die Funktion von CD44 substituieren (V. Orian-Rousseau, L. Chen, P. Herrlich und H. Ponta, nicht publiziert; siehe auch Diskussion in (Orian-Rousseau et al., 2002)). Die Annahme eines solchen substituierenden Ko-Faktors wird unter anderem durch die Beobachtung unterstützt, dass in AS Zellen, die große Mengen an Met, jedoch kein CD44 v6 exprimieren, nach Behandlung mit HGF keine Met Aktivierung stattfindet, wohl aber nach Transfektion dieser Zellen mit CD44 v6.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von Met und Ron lag die Vermutung nahe, dass beide durch einen ähnlichen Mechanismus reguliert werden. Die Sequenz von CD44 v6 zur Aktivierung der beiden Rezeptoren scheint identisch zu sein, da die Aktivierung der beiden Rezeptoren durch v6 Peptide gleicher Sequenz verhindert wird. Wenn diese Sequenz für eine direkte Interaktion der Rezeptortyrosinkinasen verantwortlich ist, dann wäre zu erwarten, dass die benötigten Sequenzen der Tyrosinkinasen ebenfalls identisch oder sehr ähnlich

sind. Durch einen Sequenzvergleich von beiden Rezeptoren wurden verschiedene konservierte Bereiche von mehreren Aminosäuren aufgedeckt, die als Gegenstück für die CD44 v6 Sequenz in Frage kämen.

Da aber die Funktion von CD44 als Ko-Rezeptor für Met durch speziesspezifische Sequenzen vermittelt wird, müsste für einen Sequenzvergleich von Met der Interaktionsbereich zwischen humanem und Ratten Met variieren. Die Sequenzen müssten zu dem basischen Motiv Arg-Trp-His der humanen v6 Sequenz bzw. zu dem eher sauren Motiv Glu-Trp-Gln der Ratte passen. Bisher konnten allerdings keine Met und Ron Sequenzen identifiziert werden auf die oben genannte Voraussetzungen zutreffen würden. Die interaktionsrelevanten Sequenzen der Rezeptoren müssen allerdings keineswegs linear sein. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass durch die Faltung des Proteins Abschnitte entstehen, in denen nicht lineare Sequenzen in enger Nachbarschaft zueinander angeordnet sind und so eine Interaktion mit den drei AS in CD44 v6 ermöglichen, weshalb solche Voraussagen ohne Kenntnis der 3D Struktur nicht möglich sind. Diese Überlegungen sind natürlich im Falle der Speziesspezifität in der Faltung von CD44 v6 hinfällig (siehe Diskussion oben).

Abgesehen von der Funktion als Ko-Faktor für die Met und Ron Aktivierung, spielen CD44 Moleküle auch bei der Aktivierung anderer Rezeptortyrosinkinasen, z.B. der ErbB-Familie, eine Rolle. So wurde eine Interaktion zwischen CD44s und dem Onkogenprodukt p185HER2, das zur ErbB-Familie gehört, auf Ovar tumorzellen beobachtet (Bourguignon et al., 1997). Auch wurde eine konstitutive Assoziation von CD44 mit erbB2 und erbB3 auf Schwann Zellen nachgewiesen. Eine Verringerung der CD44 Expression *in vitro* führte zum Verlust der Schwann Zell-Neuriten Adhäsion und zur Apoptose von Schwann Zellen (Sherman et al., 2000). In unserem Labor wurde eine mögliche Funktion von CD44 v6 bei der Aktivierung der ErbB-Rezeptoren durch CD44 v6 spezifische Antikörper untersucht. Sie blockierten die Signaltransduktion durch HB-EGF, EGF und Amphiregulin, jedoch nicht die durch Heregulin und TGF- $\alpha$

eingeleitete (L. Chen, V. Orian-Rousseau, P. Herrlich und H. Ponta, nicht publiziert). Ob der Beitrag als Ko-Rezeptor für ErbB-Rezeptoren gleich dem für Met Aktivierung ist wird gegenwärtig untersucht. In jedem Fall bestärkt dieser Befund die bedeutungsvolle Rolle von CD44 Proteinen als Ko-Rezeptoren.

Autophosphorylierung des Met Rezeptors induziert u.a. den MAPK-Signalweg, der in den meisten Fällen Proliferation von Zellen auslöst. Jedoch konnte in dieser Arbeit durch Verwendung des MAPK-Inhibitors (UO126), der spezifisch die MAP-Kinase MEK inhibiert, gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg in HT29 Zellen zur Migration beiträgt, da die Migration und Invasion von HT29 Zellen durch den Inhibitor effizient verhindert wurden. Diese Beobachtungen stimmen mit Studien überein, in denen die Aktivierung des Ras Signalweges durch HGF-induzierte Met Aktivierung Zellwanderung auslöst (Hartmann et al., 1994) und die Aktivierung des MAPK-Signalweges zum Verlassen von HT29 Zellen aus dem Zellverband und nicht zur Proliferation führt (Tanimura et al., 1998). Dass die HGF-induzierte Zellmigration in HT29 Zellen die Aktivierung von MAPK benötigt, wurde auch unter Verwendung eines anderen MEK-Inhibitors (PD098059) nachgewiesen (Herrera, 1998). Auch in anderen Zellen, wie z.B. der humanen Mammakarzinom Zelllinien MCF-7 und MDA-468, resultierte die Aktivierung des MAPK Signalweges in Zellmigration (Reddy et al., 2003).

Die Bindung von HGF an CD44 v6 impliziert, dass HGF dem Met Rezeptor „präsentiert“ werden muss. Vielleicht liegt für die Aktivierung von Met ein ähnlicher Mechanismus wie im Fall der FGF Rezeptoren vor (Schlessinger, 2004). Hier erfordert die Aktivierung des Rezeptors durch FGF die Bindung von FGF an Heparansulfat modifizierte Proteoglycane (oder Heparansulfat-Seitenketten, die an eine Matrix gebunden sind), die nur zusammen eine Aktivierung des Rezeptors ermöglichen. CD44 Spleißvarianten, die v3 Sequenzen enthalten und durch Heparansulfat (HS) modifiziert sind, können ebenfalls als Ko-Rezeptoren für FGF Rezeptoren wirken (Bennett et al., 1995; Sherman et al., 1998). Auch HGF kann HS binden. Eine Abhängigkeit der

Bindung von HGF an CD44 v6 von HS konnte aber ausgeschlossen werden, da die Ko-Rezeptorfunktion von CD44 v6 unabhängig von HS ist (Orian-Rousseau et al., 2002).

CD44 könnte als Ko-Rezeptor HGF binden und dann eine Konformationsänderung initiieren, wodurch die Bindung von HGF an Met ermöglicht wird, was letztendlich in der Aktivierung der intrinsischen Kinase-Aktivität von Met resultiert.

Die hier durchgeführten Bindungsstudien mit HGF lieferten erste Hinweise über die Aufgabe des Ko-Rezeptors. Die Entdeckung, dass HGF in Abwesenheit von Met gebunden wird und strikt von der Anwesenheit von CD44 v6 Sequenzen abhängt, scheint zunächst im Widerspruch zu den meisten Studien zu sein, in denen eine direkte Bindung von HGF ausschließlich an den Met Rezeptor nachgewiesen wurde. Röntgenstrukturanalysen der Met Semaphorin Domäne und der HGF  $\beta$ -Untereinheit wurden *in vitro* durchgeführt (Stamos et al., 2004) und liefern keine Anhaltspunkte darüber, wie HGF an den Rezeptor kommt. Auch werden in den *in vitro* Systemen große Mengen an HGF für Interaktionsstudien verwendet ungleich den hier durchgeführten Experimenten.

Ein Bindungsassay in AS-Zellen, die die Mutante Is8 exprimieren, könnte direkt zeigen und bestätigen, dass die drei mutierten AS nicht für die HGF Bindung benötigt werden, wie es aufgrund der ausbleibenden Inhibierung postuliert wird. Auch sollte in CD44-defizienten Zellen (CD44 k.o. Zellen, HepG2, Hepatozyten) eine Bindung von HGF stattfinden. Man könnte in diesen Zellen testen, ob es nach Hemmung der Met Expression durch RNA Interferenz noch immer zur Bindung von HGF kommt, was dann nur als Bindung des Kompensationsmoleküls/der Kompensationsmoleküle von CD44 erklärt werden könnte.

Wie kommt es im ternären Komplex zur Met Aktivierung? Eine sehr interessante Hypothese ist die Beseitigung eines negativen Kontrollfaktors. Tatsächlich ist eine solche negative Kontrollregion in der membranbenachbarten Domäne des Met Rezeptors vorhanden. In der onkogenen Form von Met, Tpr-Met, ist diese

Region deletiert. Hier erfolgt die Aktivierung des Rezeptors auf liganden-unabhängige Weise. Einbringen dieser membranbenachbarten Domäne in das Tpr-Met Protein inhibierte die Zelltransformation (Vigna et al., 1999). In dieser negativen Kontrollregion könnte die Bindung einer Phosphatase stattfinden, die den Rezeptor dephosphoryliert und damit inaktiv hält. Ein möglicher Kandidat für eine solche Phosphatase wäre DEP-1 (Density-enhanced protein-tyrosine phosphatase-1). DEP-1 dephosphoryliert ausschließlich Tyr<sup>1349</sup> und Tyr<sup>1365</sup> der membranbenachbarten Domäne von Met und kontrolliert so die Spezifität der Signale, die durch Met induziert werden (Palka et al., 2003). Auch wurde ihr bereits eine negative Regulierung des PDGF Rezeptors zugeschrieben (Jandt et al., 2003). Weitere Phosphatasen, die als negative Kontrollfaktoren wirken könnten, sind PTP-S und PTPase LAR (Kulas et al., 1996; Villa-Moruzzi et al., 1998). Die Aktivierung von Met durch Beseitigung einer solchen Phosphatase scheint sehr wahrscheinlich, da dieser Mechanismus auch bei einer Reihe von anderen Rezeptoren vorkommt (Moghal and Sternberg, 1999).

Unter den Hemmstoffen, die Onkogenese und Metastasierung blockieren sollen, wurden auch Inhibitoren der Met Aktivierung entwickelt. Unterschiedliche Spleißvarianten von HGF wie z.B. NK2 und NK4 können antagonistisch wirken (Ma et al., 2003). Auch wirken verschiedene Formen der Ectodomäne von Met (decoy Met: aus  $\alpha$ -Untereinheit und extrazellulärer  $\beta$ -Untereinheit, rSema: Sema-Domäne und PSI-Domäne) inhibierend auf die Met Aktivierung (Kong-Beltran et al., 2004; Michieli et al., 2004). Ebenso interferieren Peptide des zytoplasmatischen Bereiches von Met (außerhalb der Kinase-Domäne) mit der Met Kinase Aktivität *in vitro*, sowie mit der Migration und Invasion von Tumorzellen (Bardelli et al., 1999). Mitglieder der Geldanamycin Familie führten zu einer verminderten Expression des Met Proteins und konnten so die Signaltransduktion durch den Met Rezeptor und die HGF-induzierte Migration und Invasion verhindern (Webb et al., 2000). Die CD44 v6 Peptide stellen eine weitere effiziente Möglichkeit zur Hemmung der Rezeptoraktivierung und der daraus resultierenden physiologischen Konsequenzen dar, da Phänomene wie

Ausbreitung, Dissoziation, Wanderung und Invasion von Tumorzellen deutlich inhibiert wurden. Auch ist eine Inhibierung des Rezeptors in Tumorzellen, die nur Met und kein CD44 exprimieren, vorstellbar, da andere potentielle Ko-Faktoren von Met die gleichen Sequenzen zur Rezeptoraktivierung verwenden könnten und somit durch die CD44 spezifischen Peptide eine Inhibierung von Met ermöglicht werden könnte. Aus diesem Grund bieten sich die CD44 v6 spezifischen Peptide für eine künftige Entwicklung von stabileren und systematisch anwendbaren Komponenten, sog. Peptidmimetica, zur Verhinderung von Invasion und Metastasierung von Tumorzellen an.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass CD44 v6 eine vielschichtige Rolle bei der Aktivierung von Met spielt. Zum einen erfolgt die Bindung des Liganden HGF an den extrazellulären Teil von CD44 um diesen dann dem Met Rezeptor zu präsentieren. Zum anderen werden für die Aktivierung des Rezeptors drei AS benötigt, die für die Aktivierung von Met essentiell sind. Da v6 spezifische Peptide, die die Sequenz dieser drei AS einschließen, vollständig die Aktivierung des Met Rezeptors hemmen, aber nicht mit der Bindung von HGF an CD44 v6 interferieren, muss es sich hier um einen zweiten funktionellen Beitrag von CD44 v6 handeln, möglicherweise der Bindung von CD44 v6 an den Met Rezeptor selbst.



---

## Literatur

- Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E. M., and Lattera, J. (2002). In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *Faseb J* 16, 108-110.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., and Zöller, M. (1992). Participation in normal immune responses of a splice variant of CD44 that encodes a metastasis-inducing domain. *Science* 257, 682-685.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313.
- Banerji, S., Day, A. J., Kahmann, J. D., and Jackson, D. G. (1998). Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 14, 371-381.
- Bardella, C., Costa, B., Maggiora, P., Patane, S., Olivero, M., Ranzani, G. N., De Bortoli, M., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (2004). Truncated RON tyrosine kinase drives tumor cell progression and abrogates cell-cell adhesion through E-cadherin transcriptional repression. *Cancer Res* 64, 5154-5161.
- Bardelli, A., Longati, P., Williams, T. A., Benvenuti, S., and Comoglio, P. M. (1999). A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. *J Biol Chem* 274, 29274-29281.
- Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A., and Stamenkovic, I. (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 180, 53-66.
- Bazil, V., and Strominger, J. L. (1994). Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol* 152, 1314-1322.
- Bennett, K. L., Jackson, D. G., Simon, J. C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., and Aruffo, A. (1995). CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 128, 687-698.
- Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2003). Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci* 28, 527-533.
- Bezerra, J. A., Carrick, T. L., Degen, J. L., Witte, D., and Degen, S. J. (1998). Biological effects of targeted inactivation of hepatocyte growth factor-like protein in mice. *J Clin Invest* 101, 1175-1183.
- Birchmeier, C., and Gherardi, E. (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 8, 404-410.

- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-288.
- Bourguignon, L. Y., Kalomiris, E. L., and Lokeshwar, V. B. (1991). Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 266, 11761-11765.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Chu, A., Iida, N., Zhang, L., and Hung, M. C. (1997). Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J Biol Chem* 272, 27913-27918.
- Brand-Saberi, B., Muller, T. S., Wilting, J., Christ, B., and Birchmeier, C. (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev Biol* 179, 303-308.
- Brocke, S., Piercy, C., Steinman, L., Weissman, I. L., and Veromaa, T. (1999). Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6896-6901.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., and Carter, W. G. (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparin-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 113, 207-221.
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr., Kubalak, S., Klewer, S. E., and McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 106, 349-360.
- Camp, R. L., Scheynius, A., Johansson, C., and Pure, E. (1993). CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J Exp Med* 178, 497-507.
- Campanero, M. R., Pulido, R., Alonso, J. L., Pivel, J. P., Pimentel-Muinos, F. X., Fresno, M., and Sanchez-Madrid, F. (1991). Down-regulation by tumor necrosis factor-alpha of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *Eur J Immunol* 21, 3045-3048.
- Carter, W. G., and Wayner, E. A. (1988). Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263, 4193-4201.
- Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M., and Christofori, G. (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 3, 650-657.

- Chan, A. M., Rubin, J. S., Bottaro, D. P., Hirschfield, D. W., Chedid, M., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* 254, 1382-1385.
- Chen, D., McKallip, R. J., Zeytun, A., Do, Y., Lombard, C., Robertson, J. L., Mak, T. W., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2001). CD44-deficient mice exhibit enhanced hepatitis after concanavalin A injection: evidence for involvement of CD44 in activation-induced cell death. *J Immunol* 166, 5889-5897.
- Clark, E. A., and Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.
- Colombatti, A., Hughes, E. N., Taylor, B. A., and August, J. T. (1982). Gene for a major cell surface glycoprotein of mouse macrophages and other phagocytic cells is on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1926-1929.
- Comoglio, P. M., and Boccaccio, C. (1996). The HGF receptor family: unconventional signal transducers for invasive cell growth. *Genes Cells* 1, 347-354.
- Comoglio, P. M., Tamagnone, L., and Boccaccio, C. (1999). Plasminogen-related growth factor and semaphorin receptors: a gene superfamily controlling invasive growth. *Exp Cell Res* 253, 88-99.
- Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., and Vande Woude, G. F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.
- Correll, P. H., Iwama, A., Tondat, S., Mayrhofer, G., Suda, T., and Bernstein, A. (1997). Deregulated inflammatory response in mice lacking the STK/RON receptor tyrosine kinase. *Genes Funct* 1, 69-83.
- Culty, M., Nguyen, H. A., and Underhill, C. B. (1992). The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 116, 1055-1062.
- Culty, M., O'Mara, T. E., Underhill, C. B., Yeager, H., Jr., and Swartz, R. P. (1994). Hyaluronan receptor (CD44) expression and function in human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 56, 605-611.
- Dalchau, R., Kirkley, J., and Fabre, J. W. (1980). Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10, 745-749.
- Day, A. J., and Sheehan, J. K. (2001). Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struct Biol* 11, 617-622.
- Deak, F., Kiss, I., Sparks, K. J., Argraves, W. S., Hampikian, G., and Goetinck, P. F. (1986). Complete amino acid sequence of chicken cartilage link protein deduced from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3766-3770.

- DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., and Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* *183*, 1119-1130.
- Di Renzo, M. F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S., and et al. (1995a). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* *1*, 147-154.
- Di Renzo, M. F., Poulson, R., Olivero, M., Comoglio, P. M., and Lemoine, N. R. (1995b). Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* *55*, 1129-1138.
- Dimitroff, C. J., Lee, J. Y., Fuhlbrigge, R. C., and Sackstein, R. (2000). A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13841-13846.
- Dimitroff, C. J., Lee, J. Y., Rafii, S., Fuhlbrigge, R. C., and Sackstein, R. (2001). CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol* *153*, 1277-1286.
- Doerge, K., Fernandez, P., Hassell, J. R., Sasaki, M., and Yamada, Y. (1986). Partial cDNA sequence encoding a globular domain at the C terminus of the rat cartilage proteoglycan. *J Biol Chem* *261*, 8108-8111.
- Ebens, A., Brose, K., Leonardo, E. D., Hanson, M. G., Jr., Bladt, F., Birchmeier, C., Barres, B. A., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* *17*, 1157-1172.
- Feinberg, A. P. (1999). Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* *59*, 1743s-1746s.
- Ferracini, R., Di Renzo, M. F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M., and Comoglio, P. M. (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* *10*, 739-749.
- Fixman, E. D., Fournier, T. M., Kamikura, D. M., Naujokas, M. A., and Park, M. (1996). Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem* *271*, 13116-13122.
- Follenzi, A., Bakovic, S., Gual, P., Stella, M. C., Longati, P., and Comoglio, P. M. (2000). Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* *19*, 3041-3049.
- Foster, L. C., Arkonac, B. M., Sibinga, N. E., Shi, C., Perrella, M. A., and Haber, E. (1998). Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* *273*, 20341-20346.

- Fraser, J. R., Appelgren, L. E., and Laurent, T. C. (1983). Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. A whole body autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 233, 285-293.
- Furge, K. A., Kiewlich, D., Le, P., Vo, M. N., Faure, M., Howlett, A. R., Lipson, K. E., Woude, G. F., and Webb, C. P. (2001). Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10722-10727.
- Furge, K. A., Zhang, Y. W., and Vande Woude, G. F. (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.
- Fuse, Y., Nishimura, H., Maeda, K., and Yoshikai, Y. (1997). CD95 (Fas) may control the expansion of activated T cells after elimination of bacteria in murine listeriosis. *Infect Immun* 65, 1883-1891.
- Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St John, T., Butcher, E. C., and Carter, W. G. (1989). Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4654-4658.
- Gao, A. C., Lou, W., Dong, J. T., and Isaacs, J. T. (1997). CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 57, 846-849.
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K., and Vuori, K. (1999). Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene* 18, 7775-7786.
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489-492.
- Gaudino, G., Avantaggiato, V., Follenzi, A., Acampora, D., Simeone, A., and Comoglio, P. M. (1995). The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues. *Oncogene* 11, 2627-2637.
- Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K. A., Godowski, P. J., and Comoglio, P. M. (1994). RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *Embo J* 13, 3524-3532.
- Ghaffari, S., Dougherty, G. J., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1997). Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol* 97, 22-28.
- Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M., and Jones, E. Y. (2004). The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 14, 669-678.
- Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P. J. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and

- receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12039-12044.
- Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., and Comoglio, P. M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-724.
- Goldstein, L. A., and Butcher, E. C. (1990). Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM(CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Immunogenetics* 32, 389-397.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., and Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-1072.
- Goodfellow, P. N., Banting, G., Wiles, M. V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R., and Fabre, J. W. (1982). The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol* 12, 659-663.
- Graziani, A., Gramaglia, D., dalla Zonca, P., and Comoglio, P. M. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* 268, 9165-9168.
- Greenberg, R. A., Chin, L., Femino, A., Lee, K. H., Gottlieb, G. J., Singer, R. H., Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1999). Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell* 97, 515-525.
- Greenfield, B., Wang, W. C., Marquardt, H., Piepkorn, M., Wolff, E. A., Aruffo, A., and Bennett, K. L. (1999). Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44. *J Biol Chem* 274, 2511-2517.
- Grewal, S. I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24.
- Hanley, W. D., Burdick, M. M., Konstantopoulos, K., and Sackstein, R. (2005). CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res* 65, 5812-5817.
- Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., and Birchmeier, W. (1994). The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J Biol Chem* 269, 21936-21939.
- He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishihara, K., and Kincade, P. W. (1992). Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J Cell Biol* 119, 1711-1719.

- Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. T. (1993). A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120, 227-233.
- Herrera, R. (1998). Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells. Involvement of the MAPK pathway. *J Cell Sci* 111 ( Pt 8), 1039-1049.
- Herrlich, P., Zoller, M., Pals, S. T., and Ponta, H. (1993). CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 14, 395-399.
- Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., and Tsukita, S. (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135, 37-51.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and Gunthert, U. (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51, 5292-5297.
- Holley, R. W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258, 487-490.
- Hua, Q., Knudson, C. B., and Knudson, W. (1993). Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 106, 365-375.
- Hughes, E. N., Colombatti, A., and August, J. T. (1983). Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp-1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells. *J Biol Chem* 258, 1014-1021.
- Ilangumaran, S., Briol, A., and Hoessli, D. C. (1998). CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 91, 3901-3908.
- Isacke, C. M. (1994). The role of the cytoplasmic domain in regulating CD44 function. *J Cell Sci* 107 ( Pt 9), 2353-2359.
- Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M., and Wynford-Thomas, D. (1997). Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 14, 2417-2423.
- Iwama, A., Okano, K., Sudo, T., Matsuda, Y., and Suda, T. (1994). Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase gene, STK, derived from enriched hematopoietic stem cells. *Blood* 83, 3160-3169.
- Jalkanen, S., Bargatze, R. F., de los Toyos, J., and Butcher, E. C. (1987). Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of

- an 85-95 kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J Cell Biol* 105, 983-990.
- Jalkanen, S., and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-825.
- Jalkanen, S. T., Bargatze, R. F., Herron, L. R., and Butcher, E. C. (1986). A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* 16, 1195-1202.
- Jandt, E., Denner, K., Kovalenko, M., Ostman, A., and Bohmer, F. D. (2003). The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene* 22, 4175-4185.
- Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C. P., Anver, M., Koochekpour, S., and Vande Woude, G. F. (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14417-14422.
- Jiang, W. G., Lloyds, D., Puntis, M. C., Nakamura, T., and Hallett, M. B. (1993). Regulation of spreading and growth of colon cancer cells by hepatocyte growth factor. *Clin Exp Metastasis* 11, 235-242.
- Kainz, C., Kohlberger, P., Tempfer, C., Sliutz, G., Gitsch, G., Reinthaller, A., and Breitenecker, G. (1995). Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer* 31A, 1706-1709.
- Katoh, S., McCarthy, J. B., and Kincade, P. W. (1994). Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J Immunol* 153, 3440-3449.
- Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., Shimosato, T., and Kincade, P. W. (1995). Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J Exp Med* 182, 419-429.
- Kaufmann, M., Heider, K.-H., Sinn, H.-P., von Minckwitz, G., Ponta, H., and Herrlich, P. (1995). CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *The Lancet* 345, 615-619.
- Kawakami, N., Nishizawa, F., Sakane, N., Iwao, M., Tsujikawa, K., Ikawa, M., Okabe, M., and Yamamoto, H. (1999). Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J Immunol* 163, 3211-3216.
- Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J. L., Vassalli, P., and Stamenkovic, I. (1997). Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev* 11, 996-1007.
- Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J. L., Vassalli, P., and Stamenkovic, I. (1999). Cutaneous delayed-type hypersensitivity response is inhibited in transgenic mice with keratinocyte-specific CD44 expression defect. *J Invest Dermatol* 113, 137-138.



- Khaldoyanidi, S., Denzel, A., and Zoller, M. (1996). Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol* *60*, 579-592.
- Khaldoyanidi, S., Karakhanova, S., Sleeman, J., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 variant-specific antibodies trigger hemopoiesis by selective release of cytokines from bone marrow macrophages. *Blood* *99*, 3955-3961.
- Kong-Beltran, M., Stamos, J., and Wickramasinghe, D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* *6*, 75-84.
- Kulas, D. T., Goldstein, B. J., and Mooney, R. A. (1996). The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* *271*, 748-754.
- Kuniyasu, H., Yasui, W., Kitadai, Y., Yokozaki, H., Ito, H., and Tahara, E. (1992). Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* *189*, 227-232.
- Lasky, L. A., Singer, M. S., Yednock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., and Rosen, S. D. (1989). Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* *56*, 1045-1055.
- Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T., and Isacke, C. M. (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* *4*, 399-407.
- Leonard, E. J., and Skeel, A. H. (1978). Isolation of macrophage stimulating protein (MSP) from human serum. *Exp Cell Res* *114*, 117-126.
- Leonard, E. J., and Skeel, A. H. (1979). Enhancement of spreading, phagocytosis and chemotaxis by macrophage stimulating protein (MSP). *Adv Exp Med Biol* *121B*, 181-194.
- Lesley, J., He, Q., Miyake, K., Hamann, A., Hyman, R., and Kincade, P. W. (1992). Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med* *175*, 257-266.
- Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P. W. (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* *54*, 271-335.
- Liang, T. J., Reid, A. E., Xavier, R., Cardiff, R. D., and Wang, T. C. (1996). Transgenic expression of tpr-met oncogene leads to development of mammary hyperplasia and tumors. *J Clin Invest* *97*, 2872-2877.
- Lietha, D., Chirgadze, D. Y., Mulloy, B., Blundell, T. L., and Gherardi, E. (2001). Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor. *Embo J* *20*, 5543-5555.
- Liu, D., and Sy, M. S. (1996). A cysteine residue located in the transmembrane domain of CD44 is important in binding of CD44 to hyaluronic acid. *J Exp Med* *183*, 1987-1994.

- Lokeshwar, V. B., Fregien, N., and Bourguignon, L. Y. (1994). Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol* 126, 1099-1109.
- Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J* 11, 2503-2510.
- Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., and Salgia, R. (2003). c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev* 22, 309-325.
- Mackay, C. R., Terpe, H.-J., Stauder, R., Marston, W. L., Stark, H., and Günthert, U. (1994). Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124, 71-82.
- Maggiora, P., Lorenzato, A., Fracchioli, S., Costa, B., Castagnaro, M., Arisio, R., Katsaros, D., Massobrio, M., Comoglio, P. M., and Flavia Di Renzo, M. (2003). The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res* 288, 382-389.
- Maggiora, P., Marchio, S., Stella, M. C., Gai, M., Belfiore, A., De Bortoli, M., Di Renzo, M. F., Costantino, A., Sismondi, P., and Comoglio, P. M. (1998). Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene* 16, 2927-2933.
- Mars, W. M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. (1993). Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143, 949-958.
- Medico, E., Mongioli, A. M., Huff, J., Jelinek, M. A., Follenzi, A., Gaudino, G., Parsons, J. T., and Comoglio, P. M. (1996). The tyrosine kinase receptors Ron and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro. *Mol Biol Cell* 7, 495-504.
- Mege, R. M., Goudou, D., Diaz, C., Nicolet, M., Garcia, L., Geraud, G., and Rieger, F. (1992). N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies. *J Cell Sci* 103 (Pt 4), 897-906.
- Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61-73.
- Mikecz, K., Dennis, K., Shi, M., and Kim, J. H. (1999). Modulation of hyaluronan receptor (CD44) function in vivo in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42, 659-668.
- Miller, M., and Leonard, E. J. (1998). Mode of receptor binding and activation by plasminogen-related growth factors. *FEBS Lett* 429, 1-3.

- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T., and Kincade, P. W. (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171, 477-488.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Naka, D., and Kitamura, N. (1994). Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem* 269, 8966-8970.
- Mizuno, K., Inoue, H., Hagiya, M., Shimizu, S., Nose, T., Shimohigashi, Y., and Nakamura, T. (1994). Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 269, 1131-1136.
- Moghal, N., and Sternberg, P. W. (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* 11, 190-196.
- Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., Estess, P., and Siegelman, M. (1998). Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 101, 97-108.
- Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haippek, C. A., Gutmann, D. H., Ponta, H., and Herrlich, P. (2001). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 15, 968-980.
- Mulder, J.-W. R., Kruyt, P. M., Sewnath, M., Oosting, J., Seldenrijk, C. A., Weidema, W. F., Offerhaus, G. J. A., and Pals, S. T. (1994). Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *The Lancet* 344, 1470-1472.
- Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. (1992). Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem* 267, 20114-20119.
- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Embo J* 11, 4825-4833.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., and Faitelson, Y. (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39, 527-579.
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Di Renzo, M. F., Prat, M., Bigotti, A., Cavaliere, R., and Comoglio, P. M. (1993). Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 68, 746-750.

- Neame, P. J., Christner, J. E., and Baker, J. R. (1986). The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J Biol Chem* *261*, 3519-3535.
- Nestl, A., Von Stein, O. D., Zatloukal, K., Thies, W. G., Herrlich, P., Hofmann, M., and Sleeman, J. P. (2001). Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* *61*, 1569-1577.
- Nottenburg, C., Rees, G., and St John, T. (1989). Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 8521-8525.
- O'Neill, H. C. (1989). Antibody which defines a subset of bone marrow cells that can migrate to thymus. *Immunology* *68*, 59-65.
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* *16*, 3074-3086.
- Palka, H. L., Park, M., and Tonks, N. K. (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* *278*, 5728-5735.
- Pals, S. T., Drillenburger, P., Radaszkiewicz, T., and Manten-Horst, E. (1997). Adhesion molecules in the dissemination of non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol* *97*, 73-80.
- Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, S. J., Blair, D. G., and Vande Woude, G. F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* *45*, 895-904.
- Peace, B. E., Hughes, M. J., Degen, S. J., and Waltz, S. E. (2001). Point mutations and overexpression of Ron induce transformation, tumor formation, and metastasis. *Oncogene* *20*, 6142-6151.
- Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., and Aruffo, A. (1993). Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol* *122*, 257-264.
- Peck, D., and Isacke, C. M. (1998). Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *J Cell Sci* *111*, 1595-1601.
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* *416*, 187-190.
- Picker, L. J., Nakache, M., and Butcher, E. C. (1989). Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* *109*, 927-937.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 33-45.

- Ponzetto, C., Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M. L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem* 271, 14119-14123.
- Prat, M., Narsimhan, R. P., Crepaldi, T., Nicotra, M. R., Natali, P. G., and Comoglio, P. M. (1991). The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 49, 323-328.
- Protin, U., Schweighoffer, T., Jochum, W., and Hilberg, F. (1999). CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J Immunol* 163, 4917-4923.
- Pure, E., and Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 7, 213-221.
- Rafi-Janajreh, A. Q., Chen, D., Schmits, R., Mak, T. W., Grayson, R. L., Sponenberg, D. P., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P. S. (1999). Evidence for the involvement of CD44 in endothelial cell injury and induction of vascular leak syndrome by IL-2. *J Immunol* 163, 1619-1627.
- Reddy, K. B., Nabha, S. M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22, 395-403.
- Rodrigues, G. A., and Park, M. (1993). Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 13, 6711-6722.
- Rong, S., Jeffers, M., Resau, J. H., Tsarfaty, I., Oskarsson, M., and Vande Woude, G. F. (1993). Met expression and sarcoma tumorigenicity. *Cancer Res* 53, 5355-5360.
- Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4731-4735.
- Roszbach, H. C., Krizanac-Bengez, L., Santos, E. B., Gooley, T. A., and Sandmaier, B. M. (1996). An antibody to CD44 enhances hematopoiesis in long-term marrow cultures. *Exp Hematol* 24, 221-227.
- Rubin, J. S., Bottaro, D. P., and Aaronson, S. A. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* 1155, 357-371.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715.
- Sachs, M., Weidner, K. M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A., and Birchmeier, W. (1996). Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 133, 1095-1107.

- Sakkab, D., Lewitzky, M., Posern, G., Schaeper, U., Sachs, M., Birchmeier, W., and Feller, S. M. (2000). Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adapter protein CRKL. *J Biol Chem* 275, 10772-10778.
- Santoro, M. M., Collesi, C., Grisendi, S., Gaudino, G., and Comoglio, P. M. (1996). Constitutive activation of the RON gene promotes invasive growth but not transformation. *Mol Cell Biol* 16, 7072-7083.
- Schlessinger, J. (2004). Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* 306, 1506-1507.
- Schmidt, C., Blatt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., *et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16, 68-73.
- Schmits, R., Filmus, J., Gerwin, N., Senaldi, G., Kiefer, F., Kundig, T., Wakeham, A., Shahinian, A., Catzavelos, C., Rak, J., *et al.* (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90, 2217-2233.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I., and Jackson, D. G. (1993). The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* 268, 12235-12238.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., and Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12160-12164.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., and Zoller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 177, 443-455.
- Shay, J. W., and Gazdar, A. F. (1997). Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 50, 106-109.
- Sheikh, H., Legg, J., Lewis, C., Peck, D., and Isacke, C. (1998). Discrete domains within the hyaluronan receptor CD44 regulate membrane localization and cell migration. *Cell Adhes Commun* 6, 149-156.
- Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998). 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.

- Sherman, L. S., Rizvi, T. A., Karyala, S., and Ratner, N. (2000). CD44 enhances neuregulin signaling by Schwann cells. *J Cell Biol* 150, 1071-1084.
- Shima, N., Tsuda, E., Goto, M., Yano, K., Hayasaka, H., Ueda, M., and Higashio, K. (1994). Hepatocyte growth factor and its variant with a deletion of five amino acids are distinguishable in their biological activity and tertiary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 808-815.
- Shimizu, Y., and Shaw, S. (1991). Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb J* 5, 2292-2299.
- Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor Xlla and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 229, 257-261.
- Shtivelman, E., and Bishop, J. M. (1991). Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 11, 5446-5453.
- Siegelman, M. H., van de Rijn, M., and Weissman, I. L. (1989). Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* 243, 1165-1172.
- Simon, J. C., Heider, K. H., Dietrich, A., Wuttig, C., Schopf, E., Adolf, G. R., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer* 32A, 1394-1400.
- Skeel, A., Yoshimura, T., Showalter, S. D., Tanaka, S., Appella, E., and Leonard, E. J. (1991). Macrophage stimulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *J Exp Med* 173, 1227-1234.
- Sleeman, J., Kondo, K., Moll, J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1997). Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J Biol Chem* 272, 31837-31844.
- Sleeman, J. P., Arming, S., Moll, J. F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L. S., Kreil, G., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 56, 3134-3141.
- Soman, N. R., Correa, P., Ruiz, B. A., and Wogan, G. N. (1991). The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4892-4896.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M., and Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 1057-1062.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* 10, 343-348.

- Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchhofer, D., and Wiesmann, C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *Embo J* 23, 2325-2335.
- Stefan, M., Koch, A., Mancini, A., Mohr, A., Weidner, K. M., Niemann, H., and Tamura, T. (2001). Src homology 2-containing inositol 5-phosphatase 1 binds to the multifunctional docking site of c-Met and potentiates hepatocyte growth factor-induced branching tubulogenesis. *J Biol Chem* 276, 3017-3023.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239-242.
- Suda, T., Iwama, A., Hashiyama, M., Sakano, S., and Ohno, M. (1997). Receptor tyrosine kinases involved in hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 11 Suppl 3, 451-453.
- Sy, M. S., Guo, Y. J., and Stamenkovic, I. (1991). Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* 174, 859-866.
- Sy, M. S., Guo, Y. J., and Stamenkovic, I. (1992). Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med* 176, 623-627.
- Taher, T. E., Smit, L., Griffioen, A. W., Schilder-Tol, E. J., Borst, J., and Pals, S. T. (1996). Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem* 271, 2863-2867.
- Takayama, H., LaRochelle, W. J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S. A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 701-706.
- Tanabe, K. K., Stamenkovic, I., Cutler, M., and Takahashi, K. (1995). Restoration of CD44H expression in colon carcinomas reduces tumorigenicity. *Ann Surg* 222, 493-501; discussion 501-493.
- Tanimura, S., Chatani, Y., Hoshino, R., Sato, M., Watanabe, S., Kataoka, T., Nakamura, T., and Kohno, M. (1998). Activation of the 41/43 kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway is required for hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Oncogene* 17, 57-65.
- Teder, P., Vandivier, R. W., Jiang, D., Liang, J., Cohn, L., Pure, E., Henson, P. M., and Noble, P. W. (2002). Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 296, 155-158.
- Terpe, H. J., Stark, H., Prehm, P., and Gunthert, U. (1994). CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 101, 79-89.
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 21, 1225-1229.



- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-654.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., and Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.
- Utsch, M., Lokker, N. A., Godowski, P. J., and de Vos, A. M. (1998). Crystal structure of the NK1 fragment of human hepatocyte growth factor at 2.0 Å resolution. *Structure* 6, 1383-1393.
- van der Voort, R., Taher, T. E., Derksen, P. W., Spaargaren, M., van der Neut, R., and Pals, S. T. (2000). The hepatocyte growth factor/Met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation. *Adv Cancer Res* 79, 39-90.
- Vigna, E., Gramaglia, D., Longati, P., Bardelli, A., and Comoglio, P. M. (1999). Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene* 18, 4275-4281.
- Villa-Moruzzi, E., Puntoni, F., Bardelli, A., Vigna, E., De Rosa, S., and Comoglio, P. M. (1998). Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J* 336, 235-239.
- von Stein, O. D., Thies, W. G., and Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 25, 2598-2602.
- Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A., and Olson, E. N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862.
- Wang, M. H., Dlugosz, A. A., Sun, Y., Suda, T., Skeel, A., and Leonard, E. J. (1996). Macrophage-stimulating protein induces proliferation and migration of murine keratinocytes. *Exp Cell Res* 226, 39-46.
- Wang, M. H., Fung, H. L., and Chen, Y. Q. (2000). Regulation of the RON receptor tyrosine kinase expression in macrophages: blocking the RON gene transcription by endotoxin-induced nitric oxide. *J Immunol* 164, 3815-3821.
- Wang, M. H., Julian, F. M., Breathnach, R., Godowski, P. J., Takehara, T., Yoshikawa, W., Hagiya, M., and Leonard, E. J. (1997). Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP beta chain. *J Biol Chem* 272, 16999-17004.
- Wang, M. H., Yoshimura, T., Skeel, A., and Leonard, E. J. (1994). Proteolytic conversion of single chain precursor macrophage-stimulating protein to a

- biologically active heterodimer by contact enzymes of the coagulation cascade. *J Biol Chem* 269, 3436-3440.
- Webb, C. P., Hose, C. D., Koochekpour, S., Jeffers, M., Oskarsson, M., Sausville, E., Monks, A., and Vande Woude, G. F. (2000). The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Res* 60, 342-349.
- Weber, G. F., Bronson, R. T., Ilagan, J., Cantor, H., Schmits, R., and Mak, T. W. (2002). Absence of the CD44 Gene Prevents Sarcoma Metastasis. *Cancer Res* 62, 2281-2286.
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173-176.
- Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 53, 4754-4756.
- Wittig, B. M., Johansson, B., Zoller, M., Schwarzler, C., and Gunthert, U. (2000). Abrogation of experimental colitis correlates with increased apoptosis in mice deficient for CD44 variant exon 7 (CD44v7). *J Exp Med* 191, 2053-2064.
- Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C., and Turley, E. A. (1994). Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *Embo J* 13, 286-296.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13, 35-48.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- Yu, W. H., Woessner, J. F., Jr., McNeish, J. D., and Stamenkovic, I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 16, 307-323.
- Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. (1989). Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res* 49, 3314-3320.
- Zhou, D. F., Ding, J. F., Picker, L. J., Bargatze, R. F., Butcher, E. C., and Goeddel, D. V. (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* 143, 3390-3395.

Zoller, M. (1996). Joint features of metastasis formation and lymphocyte maturation and activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 ( Pt 1), 215-247.

## Abkürzungen

AK	Antikörper
AS	Aminosäure (n)
bp	Basenpaare
C	Carboxy-Terminus
CD44	cluster of differentiation 44
CD44s	Standardform von CD44
CD44v	variante Formen von CD44
CD44 v6	CD44 Isoform, die vom varianten Exon v6 kodierte Sequenzen enthält
CD44 v4-v7	CD44 Isoform, die Sequenzen enthält, die von den varianten Exons v4-v7 kodiert werden
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
ECM	extracellular matrix
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
G418	Geneticin
HA	Hyaluronsäure
HEV	high endothelial venules
HGF/SF	Hepatocyte growth factor, Scatter factor
HRP	Horse radish peroxidase
IG	Immunglobulin-ähnliche Domäne
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Is-Mutanten	Linker Scan Mutanten
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/Erk kinase
Met	HGF/SF-Rezeptor
MSP	Macrophage stimulating protein
N	Amino-
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PSI	Domäne, die u.a. in Proteinen der Met Familie vorkommt, Abk. für <i>Plexin-Semaphorin-Integrin</i>
RHAMM	receptor for hyaluronate-mediated motility
Ron	recepteur d' origine nantaise, MSP-Rezeptor
TNF	Tumornecrosis factor
wt	Wildtyp