

KfK 5292 B  
Januar 1994

# **CD44-Varianten als Metastasierungsmarker in menschlichen Tumoren**

K.-H. Heider  
Institut für Genetik

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



**Kernforschungszentrum Karlsruhe**

**Institut für Genetik**

**KfK 5292 B**

**CD44-Varianten als Metastasierungsmarker  
in menschlichen Tumoren**

**Karl-Heinz Heider**

**Dissertation  
genehmigt von den  
Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Universität Erlangen-Nürnberg**

**Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**

Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

# Zusammenfassung

Variante Formen von CD44 unterscheiden sich von der Standardform von CD44 durch die Insertion zusätzlicher Proteinsequenzen, die von 10 varianten Exons kodiert werden, in den extrazellulären Anteil des Moleküls. Für CD44-Varianten, die das Exon v6 enthalten, konnte in der Ratte gezeigt werden, daß sie kausal am Metastasierungsgeschehen beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen humane CD44-Varianten hergestellt, mit deren Hilfe die Expression von varianten CD44-Molekülen in humanen Normalgeweben sowie verschiedensten Tumortypen untersucht wurde.

Im Normalgewebe ist die Expression von CD44-Varianten vorwiegend auf epitheliale Gewebe beschränkt, während die Standardform von CD44 nahezu ubiquitär exprimiert wird. In Tumoren konnte vor allem in Karzinomen eine Expression von CD44-Varianten in 26% bis 100% der untersuchten Fälle nachgewiesen werden, je nach verwendeten Antikörper und Tumortyp. Immunhistochemische und RNA-Analysen haben gezeigt, daß in ein und demselben Tumortyp verschiedene CD44-Varianten exprimiert werden. In den entsprechenden Normalgeweben konnte entweder keine oder nur eine sehr uniforme Expression nachgewiesen werden, woraus ersichtlich wird, daß in den Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe eine Störung im Spleißmechanismus vorliegt.

Für Nicht-Hodgkin-Lymphome und kolorektale Karzinome korreliert die Expression von CD44-Varianten, die das variante Exon v6 enthalten, mit der Aggressivität bzw. der Progression der Tumoren. In 100% der Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomen und einem Großteil der invasiven Primärtumoren werden CD44-Varianten exprimiert. Die Überlebenschance von 93 Patientinnen mit primären Mammakarzinomen war invers mit der Expression von Exon v6 enthaltenden CD44-Varianten korreliert. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß CD44-Varianten, die das Exon v6 enthalten, auch beim Menschen, in Analogie zum Rattensystem, kausal am Metastasierungsgeschehen beteiligt sind.

# Abstract

## CD44 variants as metastasis marker in human tumors

Variant forms of CD44 differ from the standard form of CD44 by the insertion of additional protein sequences, which are encoded by ten variant exons, into the extracellular portion of the molecule. CD44 isoforms, which contain the variant exon v6, have been shown to play an important role during metastasis formation in a rat model system. In this work, antibodies have been developed which were used to investigate the expression of variant CD44 molecules in normal human tissues and different human tumor types.

In normal tissues, the expression of CD44 variants is mainly restricted to epithelial tissues, whereas the standard form of CD44 is ubiquitously expressed. In tumors, especially in carcinomas, expression of CD44 variants was detected in 26% to 100% of all investigated samples, depending on the tumor type and the antibody used. Immunohistochemical and RNA analyses have revealed that in one certain tumor type different CD44 variants are expressed. In corresponding normal tissues, there was either no or a very uniform expression detectable, indicating that there is a splice disorder in the tumor cells.

In non-Hodgkins' lymphomas and colorectal carcinomas, the expression of exon v6 containing CD44 variants correlates with tumor aggressiveness and progression, respectively. In most of the investigated primary invasive breast carcinomas and in 100% of axillary lymph node metastases, CD44 variants are expressed. The overall survival probability of 93 patients with breast cancer was inversely correlated with the expression of exon v6 containing CD44 variants. These results suggest that CD44 variants, especially those containing exon v6, are causally involved in the metastatic process in humans.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Krebs, eine lebensbedrohliche Erkrankung .....	1
1.2	Tumormetastasierung bildet die Haupttodesursache bei Tumorpatienten .....	2
1.3	Das "Stufenmodell" der Tumormetastasierung.....	2
1.4	Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozeß.....	3
1.5	Der Verlust von E-Cadherin begünstigt die Invasion von Tumorzellen.....	4
1.6	Überexpression des Integrins VLA-2 verleiht Tumorzellen metastatische Eigenschaften .....	6
1.7	Variante Formen von CD44 sind ausreichend und notwendig zur Tumormetastasierung .....	8
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>13</b>
2.1.1	Bezugsquellen.....	13
2.1.2	Bakterienstämme.....	15
2.1.3	Zelllinien.....	15
2.1.4	Oligonukleotide .....	16
2.1.5	Plasmide .....	18
2.1.6	Plasmidkonstruktionen zur Herstellung bakteriell exprimierter Fusionsproteine .....	19
2.1.7	Sonstige Plasmidkonstruktionen.....	20
2.1.8	Antikörper .....	21
2.1.9	Sekundärantikörper.....	22
2.1.10	Gewebeprobe.....	22
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	Immunisierung von Kaninchen .....	24
2.2.2	Präinkubation von Kaninchenserum mit Fusionsproteinen.....	24
2.2.3	Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen.....	24
2.2.4	Proteinbestimmung nach Lowry (1951) .....	25
2.2.5	Spaltung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen mit Thrombin.....	25
2.2.6	Kopplung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen an Sepharose 4B .....	26
2.2.7	Affinitätsreinigung von Kaninchenserum.....	26
2.2.8	Extraktpräparation aus kultivierten Zellen .....	27
2.2.9	Extraktpräparation aus Gewebe.....	27
2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	27
2.2.11	Western-Analyse.....	28
2.2.12	Immunfluoreszenzanalyse von Membranproteinen intakter Zellen .....	29
2.2.13	FACS-Analyse von kultivierten Zellen.....	29
2.2.14	Immunhistochemie .....	29
2.2.15	Auswertung immunhistochemischer Präparate.....	31
2.2.16	Analyse von Nukleinsäuren .....	31
2.2.17	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	31
2.2.18	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab .....	31
2.2.19	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab .....	32
2.2.20	Restriktionsverdauung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	32
2.2.21	Umwandlung überhängender Enden in stumpfe Enden mit T4-DNA-Polymerase .....	32

2.2.22	Umwandlung überhängender Enden in stumpfe Enden mit Klenow-Polymerase.....	33
2.2.23	Dephosphorylierung von DNA.....	33
2.2.24	Phosphorylierung von 5'-OH-Enden.....	33
2.2.25	Ligation von DNA.....	33
2.2.26	Sequenzierung von DNA.....	34
2.2.27	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.28	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.2.29	Eluation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
2.2.30	Southern-Analyse.....	36
2.2.31	Random Priming von DNA-Sonden.....	36
2.2.32	PCR-Markierung von DNA-Sonden.....	37
2.2.33	Isolation von PolyA <sup>+</sup> -RNA.....	37
2.2.34	Isolation von gesamtzellulärer RNA.....	38
2.2.35	cDNA-Synthese (Erststrangreaktion).....	38
2.2.36	PCR-Amplifikation.....	39
2.2.37	GAPDH-PCR.....	39
2.2.38	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen.....	39
2.2.39	Passagieren von eukaryontischen Zellen.....	39
2.2.40	Einfrieren von Bakterien.....	40
2.2.41	Präparation kompetenter Bakterien.....	40
2.2.42	Transformation von Bakterien.....	40
2.2.43	Statistische Analysen.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern, die variante Formen des humanen CD44-Moleküls erkennen.....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Ein polyklonales Kaninchenserum erkennt spezifisch Varianten des humanen CD44-Moleküls.....	41
3.1.2	Affinitätsreinigung des polyklonalen Kaninchenserums zur Herstellung exonspezifischer Antikörperfraktionen.....	44
3.1.3	Die variantenspezifischen polyklonalen Seren eignen sich zum immun-histochemischen Nachweis von CD44-Varianten.....	47
3.1.4	Charakterisierung von variantenspezifischen, monoklonalen Anti-CD44-Antikörpern.....	50
3.1.5	Exonspezifische monoklonale Antikörper zeigen unterschiedliche Reaktionsmuster mit menschlicher Haut.....	52
<b>3.2</b>	<b>Expression von CD44-Varianten in normalen menschlichen Geweben.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3</b>	<b>Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese.....</b>	<b>57</b>
3.3.1	Die Expression von CD44-Varianten nimmt im Verlauf der kolorektalen Tumorprogression zu.....	57
3.3.2	Kolorektale Karzinome unterscheiden sich in ihrer CD44-Expression auf RNA-Ebene deutlich von der Expression in normaler Schleimhaut.....	60
3.3.3	Vergleich der Expression von CD44-Varianten in kolorektalen Zelllinien und Karzinomen.....	63
3.3.4	Zusammenfassung.....	66
<b>3.4</b>	<b>Differentielle Expression von CD44-Varianten in humanen Magenkarzinomen des intestinalen und diffusen Typs und in normaler Magenschleimhaut.....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Magenkarzinome exprimieren CD44-Varianten.....	68

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.4.2	Normale Magenschleimhaut zeigt eine eingeschränkte Expression von CD44-Varianten.....	71
3.4.3	Magenkarzinome unterscheiden sich dramatisch in der Expression varianter CD44-Boten-RNAs gegenüber normaler Magenschleimhaut .....	72
3.4.4	Expression von CD44-Varianten in Magenkarzinomzelllinien.....	75
3.4.5	Zusammenfassung.....	78
<b>3.5</b>	<b>Expression von CD44-Varianten in Brusttumoren .....</b>	<b>79</b>
3.5.1	Expression von CD44-Varianten in normalem Brustgewebe und benignen Läsionen der Mamma .....	79
3.5.2	Expression von CD44-Varianten in <i>in situ</i> -Karzinomen der Mamma .....	81
3.5.3	Expression von CD44-Varianten in invasiven Mammakarzinomen und axillären Lymphknotenmetastasen.....	84
3.5.4	Die Expression von CD44-Varianten in primären Mammakarzinomen korreliert invers mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen.....	86
3.5.5	Zusammenfassung.....	90
<b>3.6</b>	<b>Expression von CD44-Varianten in Nicht-Adenokarzinomen .....</b>	<b>91</b>
3.6.1	Nicht-metastasierende Basalzellkarzinome der Haut exprimieren andere CD44-Varianten als stark-metastasierende maligne Melanome.....	91
3.6.2	Die Expression des varianten CD44-Exons v6 korreliert mit der Aggressivität von Nicht-Hodgkin-Lymphomen .....	92
3.6.3	Zusammenfassung.....	93
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
4.1	Die Expression von CD44-Varianten in Normalgeweben ist auf wenige Gewebetypen beschränkt .....	97
4.2	Tumorzellen exprimieren CD44-Varianten .....	98
4.3	Die Expression von Exon v6 korreliert mit der Tumorprogression.....	102
4.4	Die Expression bestimmter CD44-Varianten korreliert mit dem Metastasierungspotential von Mammakarzinomen.....	105
4.5	Ausblick .....	107
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>119</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs, eine lebensbedrohliche Erkrankung

"Cancer the Crab lies so still that you might think he was asleep if you did not see the ceaseless play and winnowing motion of the feathery branches round his mouth. That movement never ceases. It is like the eating of a smouldering fire into rotten timber in that it is noiseless and without haste"

Rudyard Kipling, 1893

Dieses genau vor hundert Jahren niedergeschriebene Zitat läßt erkennen, daß zum damaligen Zeitpunkt Krebs als eine äußerst bedrohliche und gleichzeitig geheimnisvolle Krankheit betrachtet wurde. Daran hat sich bis heute nicht viel geändert. Noch immer sind die Ursachen und Mechanismen der Tumorentstehung nur sehr unvollkommen verstanden. In der Statistik der Todesursachen stehen Krebserkrankungen an zweiter Stelle, wobei sie nur noch von Herz- und Kreislauferkrankungen übertroffen werden. Allein in der Bundesrepublik Deutschland sterben pro Jahr fast 160000 Menschen an Krebs, in den Vereinigten Staaten von Amerika beträgt die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen schätzungsweise 600000 Fälle.

Die Bezeichnung "Krebs" steht dabei für eine Vielzahl verschiedenster Tumorarten, die ein zum Teil sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen. Eine Reihe von Tumortypen (z.B. Adenome, Fibrome oder einige Hirntumore) zeigen nur ein lokal begrenztes Wachstum und bilden nie Metastasen. Obwohl diese Tumoren aufgrund ihrer Lokalisation (z.B. Gehirn) durchaus tödlich für den betroffenen Patienten sein können, werden sie als gutartig (benigne) bezeichnet. Bei der überwiegenden Mehrheit der Tumoren handelt es sich jedoch um bösartige (maligne) Entartungen, die sich durch starke Invasivität und die Fähigkeit Tochtergeschwüre zu bilden auszeichnen. Zu diesen malignen Tumoren gehören auch die drei häufigsten Tumortypen überhaupt, nämlich Lungenkarzinome, kolorektale Karzinome und Mammakarzinome, die alle drei zur großen Gruppe der epithelialen Tumoren (Karzinome) gehören. Daneben gibt es jedoch noch eine Reihe anderer, hochgradig maligner Tumortypen, wie z. B. das maligne Melanom oder lymphatische Tumoren, die aus anderen Zelltypen hervorgehen.

## **1.2 Tumormetastasierung bildet die Haupttodesursache bei Tumorpatienten**

Wie die Bezeichnung "maligne" schon impliziert, stellen solche Tumoren in der Regel ein hohes Todesrisiko für den Betroffenen dar. Dabei ist nicht der Primärtumor selbst, sondern die Metastase die hauptsächliche Todesursache der meisten Tumorpatienten (Fidler et al., 1978; Sugarbaker, 1981). Während der Primärtumor mit Hilfe moderner chirurgischer Techniken oft relativ problemlos für den Patienten entfernt werden kann, stellt das unkontrollierbare Auftreten von Tumormetastasen nach wie vor das Hauptproblem in der Krebsbehandlung dar. Die Tumormetastasen können in den verschiedensten Organen des Organismus auftreten, welche in keiner offensichtlichen Beziehung zum Organ, in dem der Primärtumor entstanden ist, stehen müssen. Oft findet man auch ein multiples Auftreten von Metastasen in verschiedenen Organen ein und desselben Patienten. Die Metastasen werden oft zeitgleich mit dem Primärtumor diagnostiziert, es können aber auch Monate bis Jahre zwischen der Diagnose und dem Entfernen des Primärtumors, und dem Auftreten der Tumormetastasen liegen. In seltenen Fällen kann die Metastase schon vor dem Primärtumor diagnostiziert werden.

## **1.3 Das "Stufenmodell" der Tumormetastasierung**

Bereits 1898 hatte der Arzt Stephen Paget die Beobachtung gemacht, daß Tumormetastasen eine gewisse Organpräferenz zeigen, die nicht einer statistischen Verteilung entsprechen kann. Bei Obduktionen von Tumorpatienten, hauptsächlich Frauen, die an Brustkrebs gestorben waren, hatte er festgestellt, daß auffälligerweise oft die Leber von Metastasen befallen war, während ähnlich gut durchblutete Organe wie die Milz kaum von Metastasen betroffen waren. Daraus leitete er die für damalige Verhältnisse bahnbrechende Theorie ab, daß jede Tumorzelle eine spezielle Umgebung braucht, in der sie auswachsen kann ("Seed and Soil"-Theorie). Dabei stellt die einzelne Tumorzelle den Samen dar, der sich im Prinzip gleichmäßig über den ganzen Körper verteilen kann. Erst wenn dieser Samen geeigneten Nährboden findet, sprich ein passendes Gewebe (entspricht "Soil"), kann es zur Entstehung von Tochtergeschwüren kommen. Diese Theorie konnte mittlerweile von mehreren Arbeitsgruppen untermauert werden (Shearman et al., 1980; Poste und Fidler, 1980; Bendicht et al., 1990).

Inzwischen sind die einzelnen Schritte des komplexen Vorgangs "Tumormetastasierung" im wesentlichen erkannt und verstanden worden. Man nimmt an, daß für die Metastasierung

sowohl selektive als auch zufällige Mechanismen notwendig sind. Dies hat zu einem Stufenmodell der Metastasierung geführt, das im folgenden beschrieben werden soll. Im ersten Schritt des Metastasierungsprozesses müssen sich einzelne Tumorzellen oder kleine Zellverbände von der primären Tumormasse loslösen und in das umgebende Stroma eindringen. Dieser Vorgang wird durch das Aufbauen eines mechanischen Druckes innerhalb des Primärtumors, die Freisetzung lytischer Enzyme und einer erhöhten Motilität der Tumorzellen begünstigt (Hart et al., 1989). Nach erfolgter Loslösung vom Primärtumor müssen die Tumorzellen in einer potentiell feindlichen Umgebung überleben und sowohl spezifische als auch unspezifische Attacken des Immunsystems tolerieren (Raz et al., 1981). Die Tumorzellen penetrieren die Blut- oder Lymphgefäße (Intravasation) und proliferieren dann entweder an der Penetrationsstelle im Gefäßsystem oder lösen sich von der Gefäßwand ab. Der - wahrscheinlich - passive Transport im Gefäßsystem bringt die Tumorzellen an das Zielorgan, wo sie sich festsetzen können (Arretierung). Die Festsetzung kann durch Adhäsion an endotheliale Zellen oder an die Basalmembran erfolgen (Kramer und Nicolson, 1979). Die Tumorzellen verlassen dann das Gefäßsystem und dringen in das Zielgewebe ein (Extravasation), wahrscheinlich unter Anwendung ähnlicher Mechanismen wie für die Intravasation. Im Zielgewebe findet die Proliferation der Tumorzellen statt, ein Tochtergeschwulst entsteht.

#### **1.4 Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozeß**

Eine Tumorzelle, die einen bestehenden Gewebeverband verläßt, umgebendes Gewebe durchdringt, sich an bestimmte Zielzellen anheftet, und dann wiederum Gewebe durchwandert, um endlich zu proliferieren und einen sekundären Tumor zu bilden, ist einer sich ständig ändernden Mikroumgebung ausgesetzt (van Roy und Mareel, 1992). Die Umgebung der Tumorzelle kann dabei maßgeblich am Prozeß der Metastasierung beteiligt sein, z.B. durch die Sekretion proteolytischer Enzyme oder sogenannter "Motilitätsfaktoren" (Hart et al., 1989). Neben diesen "externen" Faktoren sind jedoch auch eine Reihe Tumorzell-spezifischer Eigenschaften für den Metastasierungsprozeß notwendig. So weiß man, daß sich Tumorzellen oft ganz deutlich in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen von ihren nicht-transformierten Vorläuferzellen unterscheiden (zur Übersicht siehe Artikel von Honn und Tang, 1992). Da solche Adhäsionsmoleküle sowohl an homotypischen als auch an heterotypischen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind, ist es plausibel, daß eine Änderung in der Expression solcher Moleküle in einer Tumorzelle für ihre metastatischen Eigenschaften verantwortlich ist. Eine mögliche Beteiligung von

Adhäsionsmolekülen gibt es bei fast allen Schritten der Tumormetastasierung, z.B. bei der Loslösung der Tumorzellen von der primären Tumorzellmasse, der Wanderung durch das den Tumor umgebende Stromale Gewebe, der Intravasation, der Bindung der zirkulierenden Tumorzellen an das Zielorgan und der anschließenden Extravasation. Damit stellen die Adhäsionsmoleküle, zumindest nach heutigem Wissensstand, die Gruppe von Molekülen dar, die am häufigsten am Metastasierungsprozeß beteiligt ist. Einige Vertreter dieser Gruppe mit ihren Funktionen im Metastasierungsprozeß sollen im folgenden beschrieben werden.

### **1.5 Der Verlust von E-Cadherin begünstigt die Invasion von Tumorzellen**

Mehr als 90% aller menschlichen Tumoren sind Karzinome. In Karzinomen wachsen transformierte epitheliale Zellen in einer unkontrollierten Weise, einzelne Tumorzellen verlassen den Zellverband des Primärtumors, durchbrechen die Basalmembran und invadieren in das umliegende mesenchymale Gewebe. Die Karzinome können nach morphologischen und funktionellen Kriterien in zwei große Gruppen unterteilt werden. Hochdifferenzierte Tumoren, die stark dem Gewebe ähneln, aus dem sie entstanden sind und in denen epitheliale Strukturen erhalten sind, sind in der Regel wenig invasiv und zeigen ein geringeres Metastasierungspotential als wenig differenzierte Tumoren, die sich durch eine amorphe Gewebestruktur und wenige Zell-Zell-Kontaktstellen auszeichnen (Weinstein et al., 1976; Gabbert et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, daß der Differenzierungsgrad und die Invasivität eines Tumors die Prognose eines Tumorpatienten bestimmen können. So überleben z.B. 80% der Patienten mit einem hoch differenzierten kolorektalen Karzinom einen postoperativen Zeitraum von 5 Jahren, im Gegensatz zu nur 25% von Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren (Morson und Dawson, 1979). Während diese morphologischen und funktionellen Charakteristiken der Karzinome schon seit längerem bekannt sind, werden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erst seit kurzem untersucht. Dabei zeigte sich, daß Adhäsionsmoleküle der Cadherin-Familie eine wichtige Rolle spielen.

Die Cadherine gehören zur Familie der  $Ca^{++}$ -abhängigen Transmembranglykoproteine, die homophile Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Drei wichtige Unterfamilien sind gut charakterisiert: E-Cadherin (epitheliales Cadherin), P-Cadherin (plazentales Cadherin) und N-Cadherin (neurales Cadherin). Vor allem E-Cadherin scheint bei Differenzierungsprozessen in epithelialen Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Frixen und Mitarbeiter (1991) nachweisen, daß verschiedene humane epitheliale

Zelllinien eine unterschiedlich starke Expression von E-Cadherin zeigen. Wie die von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Invasionsexperimente an einer künstlichen Kollagenmembran und am embryonalen Hühnerherzen gezeigt haben, korreliert bei diesen Zelllinien die Expression von E-Cadherin in inverser Weise mit der Invasivität. Zelllinien, die E-Cadherin exprimieren sind deutlich weniger invasiv als E-Cadherin negative Zellen. Nach Transfektion der Maus-cDNA für E-Cadherin in eine E-Cadherin negative humane Brustkarzinomzelllinie zeigte diese eine 5-fach verringerte Invasivität im Kollagengel im Vergleich zu der nicht-transfizierten Zelllinie. Antikörper gegen das exprimierte Maus-E-Cadherin auf diesen Zellen konnten dagegen den invasiven Phänotyp wieder rekonstituieren.

In analogen Experimenten mit epithelialen Tumorzelllinien von Hunden und Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Expression von E-Cadherin nach Transfektion dieser Zelllinien mit einer E-Cadherin-cDNA die Invasivität der Zellen in den oben genannten Testsystemen verringert (Vleminckx et al., 1991). Darüberhinaus konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß durch die Expression einer E-Cadherin-Antisense-RNA in einer epithelialen Maus-Zelllinie die Cadherin-Expression reduziert wurde, was zur Induktion eines fibroblastenähnlichen Phänotyps in den Mauszellen und zu einer erhöhten Invasivität im embryonalen Hühnerherzen geführt hat.

Ein Hinweis darauf, daß der Verlust der E-Cadherin-Expression nicht nur mit der Invasivität von Tumorzellen in *in vitro*-Testsystemen, sondern auch mit der Tumorigenität von epithelialen Tumorzellen *in vivo* korreliert, konnte durch Untersuchungen der Karzinogenese von epidermalen Tumorzelllinien in der Nacktmaus erbracht werden (Navarro et al., 1991). Epidermale Maus-Keratinozytenzelllinien, die verschiedene Stadien der epidermalen Karzinogenese repräsentieren, wurden auf ihre Tumorigenität nach subkutaner Injektion in eine Nacktmaus untersucht. In diesem Testsystem wurde eine inverse Korrelation zwischen der E-Cadherin-Expression und der Tumorigenität der verschiedenen Zelllinien festgestellt. Durch die Transfektion einer E-Cadherin-cDNA in eine ursprünglich E-Cadherin nicht exprimierende, hochmaligne epitheloide Zelllinie konnte deren Tumorigenität in der Nacktmaus partiell reduziert werden, d.h. die entstehenden Tumoren zeigten eine längere Latenzzeit und ein langsames Wachstumsverhalten als die Tumoren der nicht-transfizierten parentalen Zelllinie. Morphologisch gesehen zeigten die durch die E-Cadherin exprimierende Zelllinie verursachten Tumoren einen höheren Differenzierungsgrad als die durch die E-Cadherin negative Zelllinie verursachten.

Parallelen zu den Ergebnissen aus diesen *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen wurden auch in menschlichen Tumoren *in situ* gefunden. In Karzinomen der Brust, des Magens und des

Hals-Nacken-Bereiches wurde eine inverse Korrelation der E-Cadherin-Expression mit dem Grad der Tumordifferenzierung und, im Falle der Plattenepithelkarzinome des Hals-Nacken-Bereiches, mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen in den Tumorpatienten beobachtet (Schipper et al., 1991; Mayer et al., 1993; Oka et al., 1993). Zusammen mit den vorher beschriebenen experimentellen Befunden untermauern diese Ergebnisse die Hypothese, daß es sich bei E-Cadherin um ein Invasions-Suppressorgen handelt. E-Cadherin stellt somit ein Adhäsionsmolekül dar, dessen Verlust in einem frühen Stadium des Metastasierungsprozesses eine Rolle spielt. Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird auch ersichtlich, daß im Falle von E-Cadherin der Wegfall einer Funktion (nämlich des durch E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontaktes) für das veränderte Verhalten der Tumorzellen verantwortlich ist. Es gibt jedoch auch Arten von Adhäsionsmolekülen, die durch eine zusätzliche oder erhöhte Expression auf bestimmten Zelltypen für ein geändertes metastatisches Verhalten dieser Zellen verantwortlich sind. Ein Beispiel dafür sind Integrine.

## **1.6 Überexpression des Integrins VLA-2 verleiht Tumorzellen metastatische Eigenschaften**

Integrine sind heterodimere Transmembranglykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind. Bis heute sind 11  $\beta$ - und 14  $\alpha$ -Untereinheiten beschrieben (Ruoslahti und Giancotti, 1989; Albeda und Buck, 1990; Hynes und Lander, 1992). Die verschiedenen Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen vorliegen, was eine Vielzahl verschiedener Integrine ermöglicht. Integrine sind weit verbreitet und für die dynamische Regulation von Adhäsion und Migration notwendig. Sie sind intrazellulär mit Komponenten des Zytoskeletts verbunden und binden extrazellulär an verschiedene Liganden (Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin, Laminin). Damit stellen die Integrine eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Umgebung dar.

Die Mitglieder der  $\beta_1$ -Unterfamilie der Integrine werden auch als VLA-Proteine bezeichnet. Mitglieder dieser Unterfamilie können die Bindung an Kollagen (VLA-1, VLA-2, VLA-3), Fibronektin (VLA-3, VLA-4, VLA-5) und an Laminin (VLA-1, VLA-2, VLA-6) vermitteln. Eine Evidenz für die Beteiligung von  $\beta_1$ -Integrinen am Metastasierungsprozeß brachten Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern (mAKs) und synthetischen Peptiden. MAks gegen VLA-Proteine können die Zellmigration und Invasion durch Basalmembranen *in vitro* blockieren (Yamada et al., 1990), während kleine synthetische Peptide, die potentielle Integrin-Liganden nachahmen können, mit dem Metastasierungspotential von Tumorzellen im experimentellen Metastasierungsexperiment

interferieren können (Humphries et al., 1986; Gehlsen et al., 1988). Im experimentellen Metastasierungsexperiment werden Tumorzellen intravenös in die Blutbahn von Versuchstieren injiziert. Diese können sich dann an Zielorganen festsetzen und Tumoren ausbilden. Damit werden in diesem Experiment die späteren Schritte der Metastasierung nachgeahmt. Um auch die ersten Schritte im Metastasierungsprozeß simulieren zu können, muß das sogenannte spontane Metastasierungsexperiment durchgeführt werden. Dabei werden Tumorzellen subkutan in das Versuchstier injiziert. Die Tumorzellen müssen, um metastasieren zu können, in das umgebende Gewebe einwandern, Gefäße invadieren und im Gefäßsystem zirkulieren, um dann schließlich am Zielorgan einen Tumor ausbilden zu können. Daher stellt das spontane Metastasierungsexperiment den realitätsnäheren Ansatz zur Untersuchung der metastatischen Kapazität von Tumorzellen dar.

Für einen Vertreter der Integrin-Familie, nämlich das VLA-2-Integrin, konnte in den beiden oben beschriebenen Metastasierungsexperimenten ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression und dem metastatischen Potential der VLA-2 exprimierenden Tumorzellen nachgewiesen werden. Durch die Transfektion der cDNA für die  $\alpha_2$ -Integrinuntereinheit in humane Rhabdomyosarkomzellen konnte eine Expression von VLA-2 auf der Oberfläche der vor der Transfektion VLA-2 negativen Tumorzellen erreicht werden (Chan et al., 1991). Die VLA-2 exprimierenden Zellen zeigten eine bessere Bindung an Kollagen als die parentale Zelllinie. Diese Bindung konnte durch Anti-VLA-2-Antikörper inhibiert werden. In *in vivo*-Experimenten in Nacktmäusen konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß VLA-2-Expression das Metastasierungspotential dieser Zellen sowohl im spontanen als auch im experimentellen Metastasierungsexperiment erhöht. Im experimentellen Metastasierungsexperiment zeigten die Tiere, denen die VLA-2 exprimierenden Zellen injiziert wurden, mehr Tumoren in der Lunge und zusätzlich auch Tumoren in anderen Organen (Knochen, Lymphknoten) als die Tiere, denen die parentale Zelllinie injiziert wurde. Im spontanen Metastasierungsexperiment wurden in 66% der Versuchstiere Tumoren in sekundären Organen gefunden, während die Kontrolltiere, denen die nicht-transfizierte Zelllinie injiziert wurde, in keinem Fall Metastasen entwickelt haben. Da alle Versuchstiere Primärtumoren an der Injektionsstelle von ähnlicher Größe entwickelt haben ist nicht anzunehmen, daß die VLA-2 exprimierenden Tumorzellen nur aufgrund einer erhöhten Proliferation oder Tumorigenität metastasieren. Vielmehr könnte durch die VLA-2-Expression eine Bindung der Tumorzellen an bestimmte Liganden (z.B. Kollagen, Laminin) vermittelt werden.

Im Gegensatz zu dem vorhin beschriebenen Verlust der E-Cadherin-Expression handelt es sich im Falle der VLA-2-Expression um den Erwerb neuer Eigenschaften der Tumorzellen. Ein anderes Beispiel dafür, daß der Erwerb neuer Eigenschaften ursprünglich nicht-

metastasierenden Tumorzellen metastatische Eigenschaften verleiht, lieferten Mitglieder der CD44-Familie. Für verschiedene CD44-Isoformen konnte in einem Tiermodell gezeigt werden, daß sie kausal am Metastasierungsgeschehen beteiligt sind.

### **1.7 Variante Formen von CD44 sind ausreichend und notwendig zur Tumormetastasierung**

Mitglieder der CD44-Familie sind typische Transmembranglykoproteine, die sich durch einen zytoplasmatischen Anteil, einer hydrophoben Region zur Verankerung in der Zellmembran und einen extrazellulären Anteil auszeichnen. Das humane CD44-Gen enthält mindestens 20 verschiedene Exons, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert sind (Goodfellow et al., 1982; Sreaton et al., 1992; Tölg et al., 1993). Zehn dieser Exons, die für Proteinsequenzen im extrazellulären Anteil des CD44-Moleküls codieren, werden auch als "variante" Exons bezeichnet, da sie in verschiedenen Kombinationen in den reifen CD44-Molekülen vorkommen können (Herrlich et al., 1993; siehe auch Abb. 1). Solche Isoformen von CD44 werden im folgenden mit "variante CD44-Formen" oder kurz mit "CD44-Varianten" bezeichnet.

Die erste Form von CD44, die genauer charakterisiert wurde, war die sogenannte "Standardform" oder "hämatopoetische Form" von CD44 (Goldstein et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Idzerda et al., 1989). Sie zeichnet sich durch das Fehlen der 10 varianten Exons im extrazellulären Bereich des Moleküls aus. Diese Standardform von CD44 konnte auf vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden, darunter Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, epitheliale Zellen und Keratinozyten (Jalkanen et al., 1988; Picker et al., 1989). Für die Standardform von CD44 wurden eine Reihe verschiedenster Funktionen beschrieben. Sie ist am Prozeß des "Lymphocyte homings" (Jalkanen et al., 1986; Jalkanen et al., 1988), der Bindung an Hyaluronsäure (Aruffo et al., 1990; Miyake et al., 1990; Underhill, 1992), Kollagen (Carter und Wayner, 1988) und Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), sowie der Lymphohämatopoese (Miyake et al., 1990) beteiligt. Neben diesen physiologischen Vorgängen scheinen CD44-Moleküle auch eine Rolle in malignen Prozessen zu spielen. So konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Expression von CD44 in Nicht-Hodgkin-Lymphomen mit einer erhöhten Aggressivität dieser Tumoren korreliert (Pals et al., 1989a; Horst et al., 1990; Jalkanen et al., 1991).

1991 wurde von I. Stamenkovic und Mitarbeitern eine Isoform von CD44 charakterisiert, die, im Gegensatz zur Standardform von CD44, zusätzlich die varianten Exons v8 bis v10 (siehe Abb. 1) im extrazellulären Anteil des Moleküls inseriert hatte. Da diese Isoform aus einer epithelialen Tumorzelllinie isoliert worden war, wurde sie als "epitheliale" Form von CD44 bezeichnet (Stamenkovic et al., 1991). cDNAs, die sowohl für die Standardform als auch für die epitheliale Form von CD44 codieren, wurden in die CD44-negative, humane B-Zell Lymphomzelllinie Namalwa transfiziert und das metastatische Potential dieser Transfektanten in der Nacktmaus untersucht (Sy et al., 1991). Im experimentellen Metastasierungsexperiment zeigte sich, daß die die Standardform von CD44 exprimierenden Lymphomzellen signifikant häufiger Tumoren in den Tieren verursachten als die mit der epithelialen Form von CD44 transfizierten Zellen oder die parentale Zelllinie. Später konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß lösliches humanes Standard-CD44-Immunglobulin die Tumorigenität der mit der Standard-CD44-cDNA transfizierten Tumorzellen in der Nacktmaus supprimieren kann (Sy et al., 1992). Bei den simultan mit den Tumorzellen applizierten Standard-CD44-Immunglobulinen handelt es sich um chimäre Proteine, bei denen der extrazelluläre Anteil des Standard-CD44-Moleküls an die schwere Kette von Immunglobulinen fusioniert wurde. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Suppressoreffekt könnte sein, daß das CD44-Immunglobulin die Interaktion der Standard-CD44-Moleküle auf den Tumorzellen mit ihren Liganden im Wirtsgewebe blockieren kann. Die CD44-Variante mit den varianten Exons v8 bis v10 scheint im Gegensatz dazu nicht an einer solchen Interaktion beteiligt zu sein.

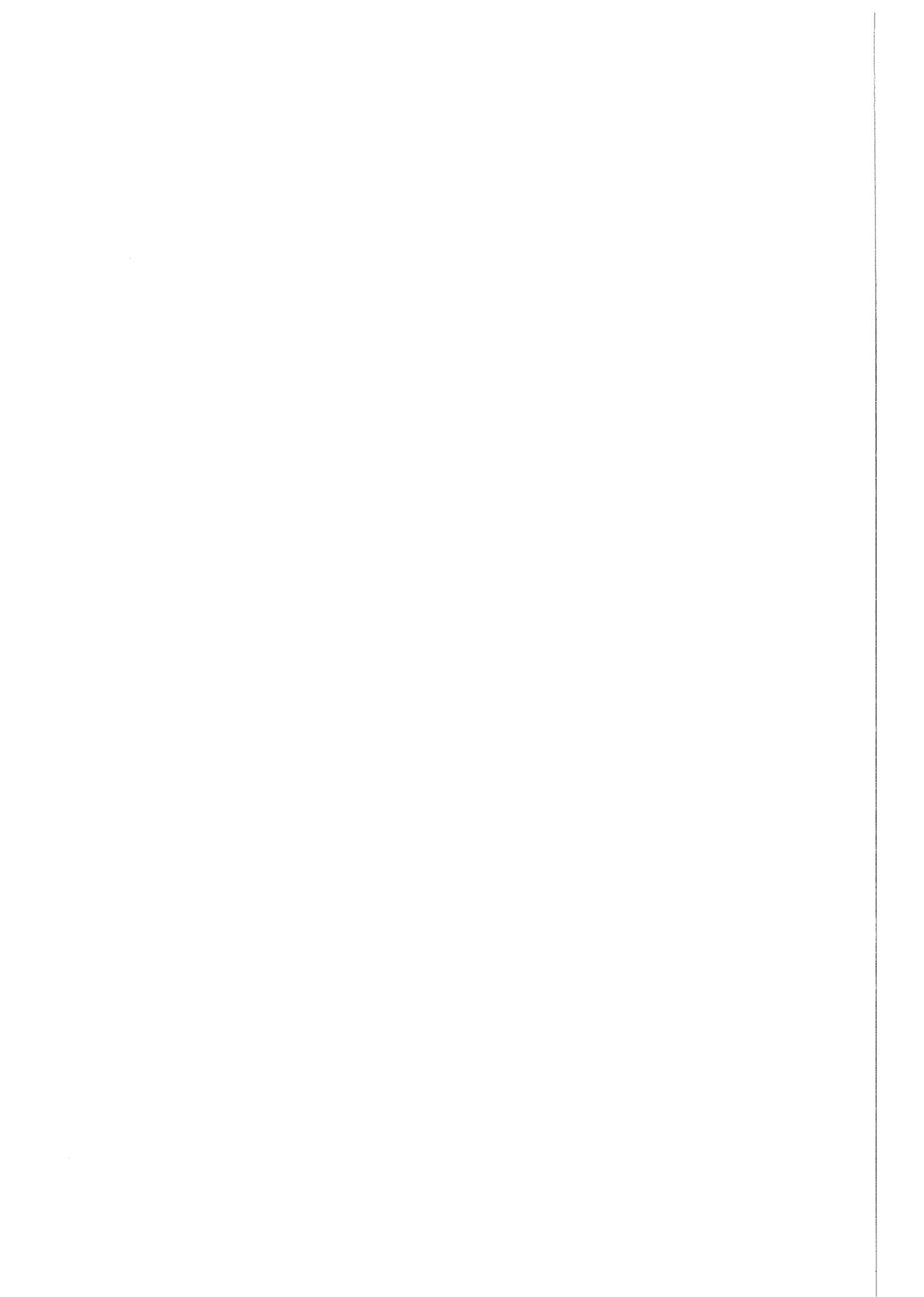
Der direkte Nachweis, daß variante Formen von CD44 im Metastasierungsprozeß eine Rolle spielen, konnte in einem Rattensystem erbracht werden. Aus den Zellen eines metastasierenden Ratten-Adenopankreaskarzinoms (BSp73ASML) wurden bislang nicht beschriebene variante Formen von CD44 isoliert, die im Gegensatz zur Standardform von CD44 zusätzliche Aminosäuren im extrazellulären Anteil des Transmembranproteins inseriert hatten (Günthert et al., 1991). Für zwei dieser Varianten wurde im spontanen Metastasierungsexperiment in der Ratte gezeigt, daß sie ausreichend und notwendig zur Metastasierung sind. Die Überexpression der CD44-Variante Meta-1 (enthält die varianten Exons v4 bis v7; siehe Abb. 1) und Meta-2 (enthält die varianten Exons v6 und v7) verleiht den ursprünglich nicht metastasierenden BSp73AS-Zellen Metastasierungsfähigkeit (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). Eine Überexpression der Standardform von CD44 dagegen führt nicht zur Metastasierung dieser Tumorzellen im spontanen Metastasierungsexperiment. Daß diese von varianten CD44-Isoformen vermittelte Metastasierung nicht auf das BSp73AS-System beschränkt ist, zeigt die Tatsache, daß die Überexpression von Meta-1 in einer nicht-metastasierenden Rattenfibrosarkom-Zelllinie

ebenfalls zur Metastasierung führt (Hofmann et al., unveröffentlicht). Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Überexpression eines einzelnen Genproduktes in Tumorzellen völlig unterschiedlicher Abstammung (Pankreasadenokarzinom, Fibrosarkom) zur Ausbildung des metastatischen Phänotyps im spontanen, d.h. realitätsnahen Metastasierungsexperiment ausreichend ist. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, daß ein mAk (1.1 ASML), der ein Epitop in der vom varianten Exon v6 codierten Proteindomäne erkennt, die Metastasierung der Tumorzellen retardieren oder sogar gänzlich blockieren kann. Appliziert man gleichzeitig mit der subkutanen Injektion der metastasierenden, Meta-1 oder Meta-2 exprimierenden Tumorzellen den mAk 1.1 ASML in die Schwanzvene der Versuchstiere und wiederholt diese Antikörperinjektion zweimal pro Woche, so wird die Bildung von Tumormetastasen verzögert oder gänzlich verhindert (Günthert et al., 1991; Seiter et al., 1993). Mit entsprechenden Kontrollantikörpern wurde die Metastasierung nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist eine Interferenz des mAks mit den proliferierenden Tumorzellen im Lymphknoten, evtl. durch eine Blockierung der CD44-Interaktion mit einem Liganden. Somit ist die Expression dieser varianten CD44-Moleküle sowohl ausreichend als auch notwendig, um Tumorzellen metastatische Eigenschaften zu verleihen.

Da die oben beschriebenen Beobachtungen in Experimenten mit Ratten-Tumorzelllinien in einem Rattensystem gemacht wurden, stellte sich natürlich die Frage, ob CD44-Varianten, die das variante Exon v6 enthalten, auch eine Rolle im menschlichen Metastasierungs geschehen spielen. Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion kamen von RNA-Untersuchungen an humanen Zelllinien. Northern-Blot-Analysen von RNAs verschiedener Zelllinien ergaben, daß neben immortalisierten Keratinozyten auch unterschiedliche Karzinomzelllinien (z.B. Brust- oder Lungenkarzinome) CD44-Boten-RNAs exprimieren, die eine Homologie zu den varianten Exons v4 bis v7 besitzen (Hofmann et al., 1991). Die Frage jedoch, ob auch menschliche Tumoren ähnliche CD44-Varianten exprimieren und insbesondere, ob die Expression dieser Varianten mit dem Metastasierungspotential der Tumoren korreliert, kann nur durch die Analyse von klinischem Tumormaterial geklärt werden.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit war es zu untersuchen, ob in humanem klinischen Tumormaterial variante Formen von CD44 exprimiert werden. Der Nachweis der CD44-Expression sollte auf RNA- und Proteinebene erfolgen. Da keine variantenspezifischen Anti-human-CD44-Antikörper verfügbar waren, sollten diese hergestellt und charakterisiert werden. Falls in den Tumoren eine deutlich andere Expression von CD44-Varianten als in den entsprechenden Normalgeweben festzustellen war, wollte ich herausfinden, ob die Expression solcher CD44-Varianten mit dem Metastasierungspotential der Tumoren korreliert. Dies sollte durch die Auswertung der klinischen Daten der Tumorpatienten, insbesondere des Überlebenszeitraumes, im Vergleich mit der CD44-Expression erfolgen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bezugsquellen

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AEC	Dako, Hamburg
Agarose (Typ II)	Appligene, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BSA	Serva, Heidelberg
Chamber slides	Nunc, Wiesbaden
Coomassie Brilliant Blau R250	BioRad, München
DAB	Sigma, München
DEPC	Fluka, Buchs (Schweiz)
dNTP	Boehringer, Mannheim
ddNTP	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs (Schweiz)
DMEM	Gibco, Eggenstein
DTT	Sigma, München
ECL	Amersham, Braunschweig
Eichproteine	Boehringer, Mannheim
Eichproteine, vorgefärbt	BioRad, München
Elutip-d Säulen	Schleicher & Schüll, Dassel
Emulsifier-safe	Packard, Groningen, NL
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Eggenstein
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Freund's Adjuvanz	Gibco, Eggenstein
Glasspritzen Inaltera-Supra	Henke-Sass, Tuttlingen
Glyzerin (doppelt dest.)	BRL, Neu-Isenburg
Glykogen	Boehringer, Mannheim

Glyzergel	Dako, Hamburg
Glutathion-Agarose-Beads	Sigma, München
Glutathion reduziert	Sigma, München
Hämatoxylin-Lösung	Sigma, München
Hamilton-Spritzen	Bonaduz AG, Schweiz
Harnstoff	Sigma, München
Hefe-RNA	Sigma, München
Hybond N+	Amersham, Braunschweig
Lachssperma-DNA	Sigma, München
Mikrotiterplatten 96-Loch	Dynatech, Denkendorf
N,N'-Methylenbisacrylamid	BioRad, München
Oligo-dT Zellulose	Boehringer, Mannheim
Oligo-dT Primer	Boehringer, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Poly-Prep Chromatographiesäulen	BioRad, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore, Bedford, USA
Quiagen tip 500 Säulen	Diagen, Düsseldorf
RNase A	Sigma, München
RNasin	Promega, Heidelberg
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Eggenstein
Sepharose 4B, CNBr aktiviert	Pharmacia, Freiburg
Streptavidin-Komplex, Peroxidase gekoppelt	Dako, Hamburg
TEMED	Sigma, München
Thrombin	Sigma, München
Triton X-100	BioRad, München
Trypsin	Difco Laboratories, Detroit
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

Restriktionsenzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: New England Biolabs, Schwalbach; Boehringer, Mannheim; BRL, Neu-Isenburg; Pharmacia, Freiburg und Promega, Heidelberg.

Enzyme für die "Modifikation" von DNA wurden von folgenden Firmen erworben:

Polynukleotid-Kinase	Biolabs, Schwalbach
----------------------	---------------------

T4-DNA-Ligase	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
AMV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig
alkalische Kälberdarmphosphatase	Boehringer, Mannheim

Alle Radiochemikalien stammen von Amersham (Braunschweig).

### 2.1.2 Bakterienstämme

#### *E.coli* K12/DH5 $\alpha$

F<sup>-</sup>; endA1; hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44; thi-1; l<sup>-</sup>; recA1; gyrA96; relA1

### 2.1.3 Zelllinien

#### Colo205 (ATCC #CCL 222)

Die Zellen wurden aus der Aszites-Flüssigkeit einer Patientin mit einem kolorektalen Karzinom etabliert. Die Zellen benötigen RPMI 1640 + 10% FCS.

#### Colo320 (ATCC #CCL 220)

Humane Kolonkarzinomzelllinie aus einem mäßig undifferenzierten Adenokarzinom. Die Zellen wurden in RPMI 1640 + 10% FCS kultiviert.

#### HaCat (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Dürst, DKFZ)

Humane Keratinozytenzelllinie, die durch *ras*-Transformation primärer Hautkeratinozyten erhalten wurde. Die Zellen benötigen zum Wachstum DMEM + 10% FCS.

#### HPKII (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Dürst, DKFZ)

Humane Keratinozytenzelllinie, die durch Pappilomvirustransformation aus primären Hautkeratinozyten etabliert wurde. Die Zelllinie wächst in DMEM + 10% FCS.

#### HT29 (ATCC #HTB 38)

Diese Zelllinie wurde aus einem humanen kolorektalen Primärtumor etabliert. Sie benötigt DMEM + 10% FCS.

**MeWo ( Carey et al., 1976)**

Humane Melanomlinie, die in DMEM + 10% FCS kultiviert wurde.

**SW480 (ATCC #CCL 228)**

Zelllinie, die aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom (Grad III-IV) etabliert wurde. Die Zellen wurden in DMEM + 10% FCS kultiviert.

**SW620 (ATCC #CCL227)**

Die Linie wurde aus der Lymphknotenmetastase eines humanen Kolonkarzinoms etabliert. Zur Kultivierung wurde DMEM + 10% FCS verwendet.

**2474 (Vollmers et al., 1993)**

Diese Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines humanen Magenkarzinoms vom intestinalen Typ etabliert. Als Kulturmedium wurde RPMI + 10% FCS verwendet.

**2957 (Vollmers et al., 1993)**

Humane Magenkarzinomlinie, die aus einer Lymphknotenmetastase eines Karzinoms vom intestinalen Typ etabliert wurde. Sie benötigt zum Wachstum RPMI + 10% FCS.

**3051 (Vollmers et al., 1993)**

Humane Zelllinie, die aus einem primären Magenkarzinom des intestinalen Typs angelegt wurde. Als Kulturmedium wurde RPMI + 10% FCS verwendet.

**2.1.4 Oligonukleotide**

Alle angegebenen Positionen beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf die von Hofmann et al. (1991) veröffentlichte variante CD44-Sequenz. Erkennungssequenzen für die im Namen angegebenen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

**5'-v3 EcoRI: Pos. 25-51**

5'-TATGAATTC CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3'

**3'-v10 EcoRI: Pos. 984-1013**

5'-TATGAATCC TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3'

**5'-v5:** Pos. 243-271

5'-GTAGACAGAAATGGCACCCTGCTTATGA-3'

**3'-v5:** Pos. 327-356

5'-TGTGCTTGTAGAATGTGGGGTCTCTTCTTC-3'

**5'-v6 BamHI:** Pos. 357-383

5'-ATAGGATCC ATCCAGGCAACTCCTAGTAGTACAACG-3'

**3'-v6 EcoRI:** Pos. 456-482

5'-ATAGAATTC TGTCCCTGTTGTGCGAATGGGAGTCTTC-3'

**5'-v8:** Pos. 621-647

5'-ATGGACTCCAGTCATAGTACAACGCTT-3'

**3'-v8:** Pos. 692-718

5'-GTTGTCATTGAAAGAGGTCCTGTCCTG-3'

**5'-v9:** Pos. 722-750

5'-GCAGAGTAATTCTCAGAGCTTCTCTACAT-3'

**3'-v9:** Pos. 779-808

5'-TTGATGTCAGAGTAGAAGTTGTTGGATGG-3'

**5'-EcoRI:** Pos. 61-85 (Stamenkovic et al., 1989)

5'-TATGAATTC CGCCCAGGGATCCTCCAGCTCCTTT-3'

**3'-BglII:** Pos. 1180-1204 (Stamenkovic et al., 1989)

5'-TATAGATCTGTGTTACACCCCAATCTTCATGTCC-3'

**5'-constant:** Pos. 513-540 (Stamenkovic et al., 1989)

5'-CAGACCTGCCCAATGCCTTTGATGGACC-3'

**3'-constant-1:** Pos. 934-958 (Stamenkovic et al., 1989)

5'-CCATTCTGGAATTTGGGGTGTCC-3'

**3'-constant-2:** Pos. 849-874 (Stamenkovic et al., 1989)

5'-TCCACCTTCTTGACTCCCATGTGAGT-3'

**5'-GAPDH:** Pos. 8-29 (Allen et al., 1987)

5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'

**3'-GAPDH:** Pos. 339-362 (Allen et al., 1987)

5'-GCCAGAGATGATGACCCTTTTGGC-3'

### 2.1.5 Plasmide

**pGEX** (Smith und Johnson, 1988)

Expressionsvektor für bakterielle Fusionsproteine. Codiert für den C-terminalen Anteil von Sj26, einem 26kD-Fragment der Glutathion-S-Transferase (GST) des Parasiten *Schistosoma japonicum*. Durch die Verwendung von 3 verschiedenen multiplen Klonierungsstellen (Vektoren pGEX-1, pGEX-2T und pGEX-3X) können Fremdsequenzen in alle 3 möglichen Leserahmen kloniert werden. Die exprimierten Fremdsequenzen können im Falle des Vektors pGEX-2T mit Thrombin und im Falle des Vektors pGEX-3X mit dem Gerinnungsfaktor Xa vom GST-Anteil des Fusionsproteins abgespalten werden.

**pSVT7**

Eukaryontischer Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer-Region,  $\beta$ -Globin-Intron sowie synthetischem Polyadenylierungssignal. Dieser Vektor wurde für die Expression von cDNA-Sequenzen in eukaryontischen Zellen konstruiert (U. Günthert, pers. Mitteilung). Der Vektor besitzt in "sense"-Orientierung zur Transkriptionsrichtung einen T7-Promotor für die *in vitro*-Transkription von klonierten Sequenzen.

**pT7T3-S** (Dr. U. Günthert)

Dieser Vektor eignet sich zur *in vitro*-Transkription und Amplifikation von klonierten Sequenzen. Zu beiden Seiten des Polylinkers befindet sich ein Promoter für die T3- bzw. T7-RNA-Polymerase. Darüberhinaus enthält der 2,2 kb große Vektor das Ampicillin-Resistenzgen und einen *colE1*-Replikationsursprung.

**pATH** (Angel et al., 1988)

Der 3,8 kb große Vektor eignet sich zur bakteriellen Expression von Fusionsproteinen. Er enthält die codierende Region für das  $\beta$ -Lactamase und Trp-E-Gen, an welche über eine multiple Klonierungsstelle fremde Gensequenzen angefügt werden können.

**2.1.6 Plasmidkonstruktionen zur Herstellung bakteriell exprimierter Fusionsproteine****pGEX-CD44v3-v10**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit den varianten CD44-Exons v3 bis v10. Der variante Bereich von CD44 (Position 25 bis 1013; Hofmann et al., 1991) wurde mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-v3 EcoRI und 3'-v10 EcoRI aus HPKII-cDNA amplifiziert und in den Vektor pGEX-2T in die EcoRI-Schnittstelle kloniert.

**pGEX-DI**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit dem varianten CD44-Exon v3 und einen geringen Anteil des Exons v4. Die entsprechende CD44-Sequenz von Position 744 (Stamenkovic et al., 1989) bis 142 (Hofmann et al., 1991) wurde in den Vektor pGEX-2T kloniert.

**pGEX-DIII**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit den varianten CD44-Exons v6 und v7 (Position 378 bis 638; Hofmann et al., 1991). Das EcoRI-HindIII Fragment des Plasmides pT7T3-S-DII-IV wurde mit RsaI verdaut und das resultierende Fragment, das die Sequenz für die Exons v6 und v7 enthielt, wurde in den Vektor pGEX-3X unter Zuhilfenahme der SmaI-Restriktionsstelle kloniert.

**pGEX-v6**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit dem varianten CD44-Exon v6 (Position 357 bis 482, Hofmann et al., 1991). Das Exon v6 wurde aus HPKII-cDNA mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-v6 BamHI und 3'-v6 EcoRI amplifiziert und in den Vektor pGEX-2T unter Verwendung der Schnittstellen BamHI und EcoRI kloniert.

**pGEX-v8**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit dem varianten CD44-Exon v8 (Position 621 bis 718, Hofmann et al., 1991). Das Exon v8 wurde vom Plasmid pSV-HPKII mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-v8 und 3'-v8 amplifiziert und in den Vektor pGEX-3X unter Verwendung der Schnittstelle SmaI kloniert.

**pGEX-DIII-VI**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit den varianten CD44-Exons v7 bis v10 und einem Bereich im 3'-Standardanteil des CD44-Gens (Pos. 583, Hofmann et al., 1991 bis Pos. 953, Stamenkovic et al., 1989). Es handelt sich dabei um ein NcoI/StyI-Fragment der CD44-cDNA, das stumpf in den Vektor pGEX-2T kloniert wurde.

**pGEX-DI-IV**

Codiert für ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit dem varianten CD44-Exons v3 bis v8 und einem Bereich im 5'-Standardanteil des CD44-Gens (Pos. 560, Stamenkovic et al., 1989 bis Pos. 699, Hofmann et al., 1991). Das entsprechende Fragment der CD44-cDNA (HincII/EcoO109) wurde nach Auffüllen der überhängenden Enden in den SmaI-verdauten Vektor pGEX-3X kloniert.

**TrpE-DII/III**

Codiert für ein Tryptophan-E-Fusionsprotein mit Teilen der varianten CD44-Exons v5 und v6 (Position 290 bis 460; Hofmann et al., 1991). Es handelt sich um ein PstI/SacII-Fragment, das in den Vektor pATH kloniert worden war.

**2.1.7 Sonstige Plasmidkonstruktionen****pSV-HPKII**

Der gesamte für CD44-codierende Bereich (Standardanteil mit den varianten Exons v3 bis v10) wurde aus HPKII-cDNA mittels PCR (Oligonukleotide 5'-EcoRI/ 3'-BglII) amplifiziert und in die entsprechenden Klonierungsstellen des Vektors pSV-T7 kloniert.

**pT7T3-S-DII-IV**

Enthält den varianten Bereich von CD44 von Pos. 204 bis 700 (Hofmann et al., 1989) im Vektor pT7T3-S. Wurde zur Klonierung von pGEX-DIII verwendet.

**pT7T3-S-CD44v3-v10**

Enthält den varianten Bereich von CD44, Exons v3-v10. Wurde durch Umklonierung des EcoRI-Fragmentes aus dem Plasmid pGEX-CD44v3-v10 in die EcoRI-Restriktionsstelle von pT7T3-S hergestellt.

**pT7T3-S-CD44s**

Enthält ein 350 bp langes BamHI/ PstI-Fragment aus dem 5'-konstanten Bereich des CD44-Gens (Pos. 385-744, Stamenkovic et al., 1989), das nach dem Auffüllen der überhängenden Enden in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pT7T3-S kloniert wurde.

**pT7T3-S-DII/III**

Enthält ein 250 bp langes PstI/ SacII-Fragment aus dem varianten Bereich von CD44 (Exons v5 und v6), das nach Auffüllen überhängender Enden in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pT7T3-S kloniert wurde.

**pT7T3-S-DIV/V**

Enthält ein 360 bp langes HinfI-Fragment aus dem varianten Bereich von CD44 (Exons v8 bis v10), das nach Auffüllen überhängender Enden in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pT7T3-S kloniert wurde.

**2.1.8 Antikörper****Hermes 3** (Jalkanen et al., 1987)

Dieser mAk erkennt ein Epitop im extrazellulären Standardanteil des CD44-Moleküls. Für die Immunisierung der BALB/c-Mäuse wurde gereinigtes Hermes-1 Antigen von KCA-Zellen, einer B-lymphoblastoiden Zelllinie, verwendet. Er wurde freundlicherweise von Dr. S. Jalkanen zur Verfügung gestellt.

**NKI-PI** (Pals et al., 1989b)

Der Maus-mAk erkennt ein Epitop im Standardbereich des CD44-Moleküls und wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit immunopräzipitierten LFA-1-Familie-Antigen von humanen Monozyten gewonnen. Er wurde von Dr. S. Pals zur Verfügung gestellt.

**FSP77** (Harwerth et al., 1992)

Der mAk erkennt das c-erbB2-Genprodukt und eignet sich besonders für die immunhistochemische Analyse von Gefrierdünnschnitten. Er wurde durch die

Immunisierung von Mäusen mit humanen Brustkarzinomzellen hergestellt und erkennt ein Epitop im extrazellulären Anteil des Moleküls. Dieser mAk wurde freundlicherweise von Dr. Nancy Haynes zur Verfügung gestellt.

#### **Ab-1 (Oncogene Science)**

Kommerziell erhältlicher Antikörper, der ein Epitop des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-R) erkennt. Er wurde durch Immunisierung von Mäusen mit partiell gereinigten EGF-Rezeptoren von humanen A431 Karzinomzellen der Epidermis gewonnen.

### **2.1.9 Sekundärantikörper**

Die nachfolgenden Reagenzien wurden als Sekundärantikörper für die Western-Analyse, Immunhistochemie, Fluoreszenz-Analyse oder FACS-Analyse verwendet.

Schaf-anti-Maus-IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Esel-anti-Kaninchen-IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Kaninchen-anti-Maus-IgG, F(ab') <sub>2</sub> biotinyliert	Dako, Hamburg
Schwein-anti-Kaninchen-IgG, F(ab') <sub>2</sub> biotinyliert	Dako, Hamburg
Schaf-anti-Maus-IgG, TRITC-konjugiert	Dako, Hamburg
Schwein-anti-Kaninchen-IgG, TRITC-konjugiert	Dako, Hamburg
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg

### **2.1.10 Gewebeproben**

Gewebematerial, das für Protein- und RNA-Analysen verwendet wurde, wurde im Rahmen normaler klinischer Vorgänge gewonnen und sofort nach der Entnahme aus dem Patienten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Material bei -80°C aufbewahrt. Die unterschiedlichen Gewebeproben wurden aus folgenden Quellen bezogen:

Brusttumoren/ Normalgewebe	Dr. M. Kaufmann, Universitätsfrauenklinik Heidelberg
Hauttumoren/ Normalgewebe	Dr. J. Simon, Universitätshautklinik, Freiburg

---

kolorektale Tumoren/ Normalgewebe	Dr. S. Pals, Institut für experimentelle Pathologie, AMC Amsterdam
Magentumoren/ Normalgewebe	Dr. J. Dämmrich, Pathologisches Institut der Universität Würzburg
Nicht-Hodgkin-Tumoren	Dr. S. Pals
verschiedene Normalgewebe	Dr. S. Pals

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung variantenspezifischer Anti-CD44-Antikörper wurden einem neuseeländischen weißen Kaninchen 200 µg des affinitätsgereinigten Fusionsproteins GEX-CD44v3-v10 zusammen mit 400 µl Freund's Adjuvanz subkutan in Abständen von je 3 Wochen appliziert. Vor jeder Injektion wurde das Adjuvanz mit dem Fusionsprotein (in 400 µl PBS gelöst) in einer Glasspritze so lange gemischt, bis eine weißliche Emulsion entstanden war. Für die erste Injektion wurde komplettes Freund's Adjuvanz verwendet, für alle nachfolgenden Immunisierungen inkomplettes Adjuvanz. Gleichzeitig mit jeder Immunisierung wurde dem Kaninchen Blut aus der Ohrvene zur Überprüfung des Antikörpertiters abgenommen. Nach 9 Wochen wurden 30 ml Blut abgenommen und das daraus erhaltene Serum für die Affinitätsaufreinigung (siehe 2.2.7) eingesetzt. Die Immunisierung und Blutabnahme wurde für weitere 30 Wochen fortgesetzt, wobei das erhaltene Serum bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgereinigt wurde.

### 2.2.2 Präinkubation von Kaninchenserum mit Fusionsproteinen

Zur Bindung spezifischer Antikörper wurde das Kaninchenserum Anti-CD44v3-v10 mit verschiedenen Fusionsproteinen vorinkubiert. 10 µl des Kaninchensersums wurden 1:500 in PBS verdünnt und mit je 10 µg des jeweiligen Fusionsproteins (GEX-CD44v3-v10; GEX-2T; abgespaltener varianter CD44-Anteil v3-v10) gemischt. Nach Inkubation bei 4°C für 1 h oder auf Eis über Nacht wurde zentrifugiert (10000 x g, 4°C, 15 Min.) und der Überstand nochmals für die selbe Zeitdauer mit dem gleichen Protein inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Antikörperlösung auf 5% Magermilchpulver und 0,3% Tween 20 eingestellt und direkt für die Western-Analyse verwendet.

### 2.2.3 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Eine Übernachtskultur der das jeweilige Fusionsprotein produzierenden Bakterien (in 2x TY-Medium) wurde am nächsten Morgen 1:10 verdünnt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Dann wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert und für weitere 3 bis 7 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden pelletiert (3000 x g, 10 Min., 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens PBS (4°C) resuspendiert. Zum Aufbrechen der Bakterien wurde die Suspension 3x für 20 Sek. auf Eis sonifiziert (Branson Sonifier cell disruptor B15, 70% Leistung). Nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1%) wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile abzentrifugiert (10000 x g, 5 Min., 4°C) und der Überstand mit Glutathion-Agarose-Beads vermischt (1 ml

gequollene Beads für 8 mg Protein). Nach 10-minütigem Rotieren bei RT wurden die Glutathion-Agarose-Beads mit dem gebundenen Fusionsprotein 3x mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Poly-Prep Chromatographiesäule geladen. Die Elution des Fusionsproteins von den Glutathion-Agarose-Beads erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCL pH 8,0; 5 mM reduziertes Glutathion) bei 4°C, wobei 3 bis 5 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt wurden. Die Konzentration des eluierten Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wurde durch eine Proteinmessung (nach Lowry, 1951) bestimmt, die Reinheit des Fusionsproteins wurde auf einem SDS-Acrylamidgel nach Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau überprüft.

#### **2.2.4 Proteinbestimmung nach Lowry (1951)**

Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 500 µl mit Lösung I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH) aufgefüllt und dann mit 1 ml alkalischer Kupfersulfat-Tartrat-Lösung (1 ml 2%ige NaK-Tartrat-Lösung + 1 ml 1%ige CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O-Lösung + 100 ml Lösung I) gemischt. Als Konzentrationsstandard wurden Eichproteinlösungen bekannter Proteinkonzentration parallel dazu verarbeitet. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl Folin (1:1 verdünnt in A.dest.) zugegeben und für weitere 30 Min. bei RT inkubiert. Je 300 µl des Reaktionsansatzes wurden dann in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 600 nm in einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan PLUS) gemessen. Anhand der gemessenen Werte für die Eichproteinlösungen konnte dann der Proteingehalt in den zu bestimmenden Proben errechnet werden.

#### **2.2.5 Spaltung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen mit Thrombin**

Fusionsproteine, die von dem Plasmid pGEX-2T codiert werden, können mittels des Enzyms Thrombin gespalten werden (Smith und Johnson, 1988). Die Spaltung erfolgt dabei zwischen dem GST-Anteil und den klonierten Fremdsequenzen. Zur Abspaltung und Aufreinigung des varianten CD44-Anteils v3-v10 aus dem Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 wurden 100 µg des gereinigten Fusionsproteins (in PBS) mit 2 u Thrombin (aus humanem Plasma) für 30 Min. bei 25°C inkubiert. Zum Spaltansatz wurden 100 µl Glutathion-Agarose-Beads gegeben, 10 Min. bei RT inkubiert und der Ansatz dann auf eine Poly-Prep Chromatographiesäule gegeben. Dabei binden ungespaltene Fusionsproteine bzw. der abgespaltene GST-Anteil des Fusionsproteins an die Glutathion-Agarose-Beads, während im Säulendurchlauf der abgespaltene Fusionsproteinanteil zu finden ist. Dieser Durchlauf wurde gesammelt und die Reinheit und Konzentration des abgespaltenen Proteins auf einem SDS-Acrylamidgel bestimmt.

### 2.2.6 Kopplung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen an Sepharose 4B

Zur Herstellung von Affinitätssäulen, mit denen CD44-spezifische Antikörper aus den Kaninchenseren aufgereinigt werden konnten, wurden verschiedene bakteriell exprimierte Fusionsproteine kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebunden. Die Bindung erfolgt dabei über primäre Aminogruppen des Proteins. Für die Kopplung wurden die Fusionsproteine GEX-2T, GEX-DI und GEX-DIII verwendet. Das in Eluationspuffer (siehe 2.2.3) vorliegende Fusionsprotein wurde über Nacht gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0-8,3; 0,5 M NaCl) dialysiert und dann mit der in 1 mM HCl vorgequollenen und anschließend mit Kopplungspuffer gewaschenen Sepharose 4B vermischt. Dabei wurden für 10 mg Protein 5 ml der gequollenen Sepharose 4B verwendet. Nach Inkubation (2 h RT oder über Nacht bei 4°C) wurde die Sepharose mit dem gebundenen Protein abzentrifugiert (2000 x g, 4 Min., RT), der Überstand verworfen und die Sepharose zum Blockieren freier Gruppen mit 0,2 M Glycin, pH 8,0 für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet abwechselnd je 3x mit Azetatpuffer (Na-Azetat 0,1 M, pH 4,0; NaCl 0,5 M) und Blockierungspuffer (Glyzin 0,2 M, pH 8,0) gewaschen. Die Sepharose mit den gekoppelten Proteinen wurde dann nach Zugabe von 0,1% Na-Azid in Kopplungspuffer bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.7 Affinitätsreinigung von Kaninchenseren

Zur Isolierung von variantenspezifischen CD44-Antikörpern aus den Kaninchenseren nach der Immunisierung wurde eine Affinitätsreinigung mittels an CNBr-aktiverter Sepharose 4B gekoppelter Fusionsproteine durchgeführt. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit den gekoppelten Proteinen (GEX-2T, GEX-DI, GEX-DIII) wurde auf eine Poly-Prep Chromatographiesäule gegeben und mit dem 20-fachen Säulenvolumen PBS gewaschen. Danach wurde das Kaninchenserum (ca. 10 ml) auf die Säule gegeben und der gesammelte Säulendurchfluß wurde weitere 2x auf die Säule appliziert. Dann wurde die Säule mit dem 20-fachen Säulenvolumen Kopplungspuffer (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,0; NaCl 0,5 M) und anschließend mit dem 10-fachen Volumen Präeluationspuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8) gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit Eluationspuffer (100 mM Glycin, pH 2,5), wobei je 5 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt wurden. Das Eluat wurde in 0,1 Volumen Sammelbuffer (1M Phosphatpuffer pH 8,0) aufgenommen. Die Antikörperkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde durch eine Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt, die Reaktivität der Antikörper wurde immunhistochemisch auf Gefrierdünnschnitten normaler menschlicher Haut überprüft. Für die im Ergebnisteil beschriebenen Experimente wurden die affinitätsgereinigten Seren Anti-CD44v3-v10, Anti-DI und Anti-DIII in einer Konzentration von 40 µg/ml verwendet.

### 2.2.8 Extraktpräparation aus kultivierten Zellen

Proteinextrakte aus Zellen wurden durch Lyse von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in 500  $\mu$ l Laemmli-Proteinprobenpuffer (2% SDS, 0,1 M DTT, 620 mM Tris/HCl pH 6,8, 65% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau) hergestellt. Zur Herabsetzung der Viskosität und zur vollständigen Desintegration der Zellbestandteile, insbesondere der DNA, wurde der Extrakt mit einem Ultraschall-Generator ("Branson-Sonifier") für 30 Sek. bei 70% Leistung sonifiziert. Durch Aufkochen des Extrakts (3 Min. bei 95°C) wurden die Proteine vollständig denaturiert und Proteasen inaktiviert. Das so gewonnene Lysat wurde 10 Min. bei 12000 x g zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand (das fertige Proteinlysat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration des so gewonnenen Extrakts wurde nach SDS-Gelelektrophorese und Anfärben des Gels mit Coomassie Brilliant Blau durch einen Vergleich mit einem Proteinlysat bekannter Konzentration bestimmt. Die Proteinproben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.9 Extraktpräparation aus Gewebe

Die Gewebestücke (Größe ca. 0,5 cm<sup>3</sup>) wurden in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert, in 500  $\mu$ l Laemmli-Proteinprobenpuffer überführt und mit einem Ultraschall-Generator 30 Sek. bei 70% Leistung sonifiziert. Die Proben wurden zentrifugiert (10 Min., 12000 x g), der Überstand 3 Min. bei 95°C aufgeköcht und erneut zentrifugiert (10 Min., 12000 x g). Das Sediment wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand (des fertigen Proteinlysats) wie unter 2.2.8 beschrieben bestimmt. Die Extrakte wurden bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970)

Für das Trenngel wurden Acrylamidkonzentrationen von 6-12 %, mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 30:0,8 in 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS verwendet. Zum Start der Polymerisation wurden der Gellösung 8  $\mu$ l TEMED/10 ml Gellösung und 0,5% APS zugegeben. Nachfolgend wurde diese Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde mit ca. 200  $\mu$ l wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isobutanol entfernt und ein 5%iges Sammelgel (4,8 % Acrylamid; 0,2 % Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 6,8; 1% SDS; 0,02% TEMED; 0,1% APS) auf das Trenngel gegossen. Anschließend an die Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer montiert und die Proteinproben wurden nach 3 Min. kochen bei 95°C mit einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glyzin, 0,1% SDS, pH 8,3) für 30 Min. bei 100 V und dann, je nach der Länge des Geles und dem Anteil von Acrylamid im Gel, für weitere 90 bis 180 Min. bei

einer Spannung von 150 bis 200 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder für den Western-Transfer montiert oder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (15 Min. Anfärbung in 0,2% CBB R250, 50% Methanol, 7,5% Essigsäure) und anschließend entfärbt (50% Methanol, 7,5% Essigsäure; bis zur Sichtbarkeit der Banden).

### **2.2.11 Western-Analyse (modifizierte Version der Methode von Towbin et al., 1979)**

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Für Minigele (6x9 cm) und kleinere Proteine (10-100 kD) wurde dafür eine "Semi-Dry"-Blotkammer (BioRad, München) verwendet, für größere Gele und für Proteine mit einem Molekulargewicht von 100 bis 250 kD wurde eine Naß-Blotkammer (Trans-Blot-Kammer der Firma BioRad) verwendet. Für beide Systeme wurde das Gel vorher im entsprechenden Transferpuffer (Semi-Dry: 48 mM Tris Base, 39 mM Glyzin, 0,0375% SDS, 20% Methanol; Naßblot: 20 mM Tris Base, 200 mM Glyzin, 0,5% SDS, 20% Methanol) für 10 Min. äquilibriert und danach mit der PVDF-Membran bedeckt. Gel und Membran wurden zwischen je 2 Lagen befeuchtetes Whatman-Papier gelegt und eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Dieser "sandwich"-Aufbau wurde in die jeweilige Transferkammer verbracht (Membran auf der Seite der Anode) und Spannung angelegt. Für den Naßtransfer wurde über Nacht bei 30-50 V transferiert, für die Semi-Dry Methode wurden 10-15 V für 20-30 Min. angelegt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Lage des Gels auf der PVDF-Membran markiert und die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für ein bis zwei Stunden mit 10%iger, fettfreier Milch (in PBS) bei RT inkubiert. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte in Hybridisierungslösung (5% fettfreie Milch in PBS; 0,3% Tween 20) für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C in einem Folienschlauch. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen schwankten zwischen 10 ng/ml und 1 µg/ml Hybridisierungslösung, je nach verwendeten Antikörper und Art des nachzuweisenden Proteins. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 Min. gewaschen (PBS, 0,3% Tween 20) und mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten-Sekundär-Antikörper (1:4000 verdünnt in Hybridisierungslösung) für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen (4 x 10 Min. in PBS, 0,3% Tween 20) wurden die vom Primärantikörper spezifisch erkannten Proteine mittels ECL-Detektion (Amersham, Braunschweig) visualisiert. Bei dieser Detektionsmethode wird ein zyklisches Diazylhydrazid (Luminol, Lösung 1) durch O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Ionen, welche bei dem Meerrettichperoxidase (gebunden an den Sekundärantikörper)-katalysierten Umsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lösung 2) entstehen, oxidiert. Die oxidierte Zwischenstufe von Luminol ist instabil und beim Übergang in den Grundzustand wird Licht emittiert, welches den Röntgenfilm schwärzt. Bei der Durchführung wurden gleiche Volumen von

Lösung 1 und Lösung 2 gemischt und für 1 Min. auf die Membran appliziert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm für 5 Sek. bis 5 Min. der Membran exponiert, je nach der erhaltenen Signalstärke.

#### **2.2.12 Immunfluoreszenzanalyse von Membranproteinen intakter Zellen**

Adhärenz wachsende Zellen wurden in speziell beschichteten Zellkulturkammern für die Immunfluoreszenzanalyse ("chamber slides" der Firma NUNC) kultiviert, in denen auch alle weiteren Schritte des Experiments durchgeführt wurden. Für die Fluoreszenzanalyse wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und anschließend 15 Min. mit 1%igem Paraformaldehyd in PBS (-Ca<sup>++</sup>, -Mg<sup>++</sup>) fixiert. Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Inkubation mit dem Primärantikörper (5-10 µg/ml in PBS mit 1% BSA) für 30 Min. bei RT durchgeführt. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und der Sekundärantikörper (Schaf-anti-Maus-IgG konjugiert mit TRITC; 1:200 bzw. Schwein-anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit TRITC; 1:30 verdünnt in PBS mit 1% BSA) für 30 Min. bei RT auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen (3x mit PBS) wurden die Zellen kurz bei RT getrocknet, mit Glyzergel eingebettet und anschließend in einem Zeiss Axioskop Mikroskop unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls photographiert. Die Filterkombinationen für TRITC waren BP546/ FT580/ LP590.

#### **2.2.13 FACS-Analyse von kultivierten Zellen**

Mit dieser Methode wurde die Expression varianter CD44-Moleküle auf der Oberfläche von kultivierten Zellen nachgewiesen. Die Zellen wurden kurz abtrypsiniert und 2x mit PBS gewaschen. Je  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit dem Primärantikörper (10 µg/ml in PBS mit 1% FCS) für 45 Min. bei RT in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3 Min., 1000 x g, 4°C) und mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde 3x wiederholt. Anschließend wurde mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG, 1:250 oder Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 1:200 in PBS/ 1% FCS) für 30 Min. bei RT inkubiert und danach wieder 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 500 µl PBS aufgenommen und an einem FACStar<sup>Plus</sup> Gerät (Becton Dickinson, San Jose, USA) analysiert.

#### **2.2.14 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Analyse von klinischem Probenmaterial wurden sowohl Paraffinschnitte als auch Gefrierschnitte verwendet. Das in Paraffin eingebettete Material wurde im Mikrotom (Reichert-Jung) zugeschnitten (6 µm Schichtdicke) und bei 50°C im Wasserbad auf silanisierte Objektträger (10 Sek. 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan gelöst in

wasserfreiem Aceton, 10 Sek. Aceton, 10 Sek. A.dest., 2 Stunden bei 80°C trocknen) aufgezogen. Danach wurden die Gewebeschnitte deparaffiniert (2x 10 Min. Rotihistol; 2x 5 Min. EtOH 100%; 5 Min. EtOH 95%), 5 Min. in PBS gewaschen und in 10%igem Ziegen Serum inkubiert (s. u.). Unfixiertes Gewebematerial wurde sofort nach der Entnahme aus dem Patienten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt. 5-7 µm starke Serienschnitte wurden mit einem Reichert-Jung "cryocut"-Gefriermikrotom bei -25°C angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet (1 h oder über Nacht) und fixiert (4 Min. Ethanol -20°C und 1 Min. Aceton -20°C). Danach wurden die Objektträger 10 Min. in PBS gewaschen und anschließend für 15 Min. mit 10%igem Ziegen Serum (in PBS) zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Danach wurde das Ziegen Serum abgekippt und der Gewebeschnitt für 1 h mit dem Primärantikörper (in PBS mit 1% BSA) inkubiert (verwendete Antikörperkonzentrationen: mAbs 5-10 µg/ml; polyklonale Seren 1-5 µg/ml). Die Objektträger wurden dann 3x 2 Min. in PBS gewaschen und anschließend zur Inaktivierung endogener Peroxidasen für 15 Min. bei RT mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wiederum 3x 2 Min. mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 30 Min. bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Hierfür wurden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eines gegen humane Serumproteine voradsorbierten, Biotin-konjugierten Kaninchen-anti-Maus bzw. Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper wurde 1:400 verdünnt in PBS mit 1% BSA eingesetzt. Während der Inkubationszeit wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex vorbereitet: 10 µl Biotin, 10 µl Streptavidin-Peroxidase sowie 20 µl normales Ziegen Serum wurden in 2 ml PBS resuspendiert und für 30 Min. bei RT inkubiert. Die Präparate wurden gewaschen (mit PBS, 3x 2 Min.) und für 30 Min. mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex inkubiert (RT). Während dieser Zeit wurde das Substrat für die Peroxidase angesetzt. Hierfür wurden 12,5 µg AEC in 1,25 ml Dimethylformamid gelöst und in 25 ml Na-Acetat Puffer (50 mM, pH 5,0) verdünnt. Vor Gebrauch wurde die Lösung im Dunkeln durch einen Faltenfilter filtriert. Alternativ wurde DAB (5 mg in 10 ml PBS) für die Färbereaktion benutzt. Die Schnitte wurden 5-10 Min. in die Substratlösung eingetaucht (nach Zugabe von 16,5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 50 ml Substratlösung) und dann die Reaktion durch eine einminütige Inkubation in A.dest. abgestoppt. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde durch eine fünfminütige Inkubation mit Hämatoxylin-Lösung und anschließender Inkubation für 10 Min. in Leitungswasser durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte getrocknet, mit Glyzergel eingebettet und mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop (im Hellfeld) analysiert.

### **2.2.15 Auswertung immunhistochemischer Präparate**

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte semiquantitativ durch das Beurteilen der Stärke der erhaltenen Färbung. Dazu wurde in jedem Versuchsansatz als Positivkontrolle Gewebe bekannter Reaktivität (z.B. normale menschliche Haut) parallel mitverarbeitet. Zur Abschätzung des unspezifischen Hintergrunds (z.B. durch die verwendeten Sekundärreagenzien) wurden im selben Versuchsansatz Antikörper mitverwendet, die keine spezifische Reaktion mit den Geweben gezeigt haben bzw. auf den Primärantikörper ganz verzichtet. Die eigentliche Farbreaktion wurde anhand dieser Kriterien (Vergleich mit der Positivkontrolle und unspezifischer Hintergrundfärbung) in folgende Kategorien eingeteilt. negativ (0-1), schwach positiv (2), mäßig positiv (3) und stark positiv (4). Zur Beurteilung der Quantität der Reaktion wurde abgeschätzt, wieviele Zellen eines Gewebetyps positiv angefärbt waren (z.B. Anteil der positiven Tumorzellen eines Präparates im Vergleich zur Gesamtheit der Tumorzellen dieses Präparates). Die Reaktion wurde als fokal bezeichnet, wenn weniger als 10% der Zellen positiv waren und als diffus, wenn mehr als 10% der Zellen positiv waren. In Einzelfällen wurde der Prozentsatz der positiven Zellen durch Auszählen genau ermittelt.

### **2.2.16 Analyse von Nukleinsäuren**

Auf grundlegende Methoden der Reinigung und Ausfällung von Nukleinsäuren wird nicht eingegangen, da die Methoden standardisiert sind und in den molekularbiologischen Laborhandbüchern nachgeschlagen werden können.

### **2.2.17 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml eines einzelsträngigen Oligonukleotids. Einen Hinweis für die Reinheit der DNA bzw. RNA gibt das Verhältnis  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Dieses sollte bei DNA 1,8:1 und bei RNA 2:1 betragen.

### **2.2.18 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (modifizierte Version der Methode von Birnboim und Doly, 1979)**

1,5 ml einer dichtgewachsenen Bakterienkultur wurden in EPPENDORF-Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden dann für 3 Min. bei 12000 upm in einer EPPENDORF-Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Tris-EDTA-Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert und die Bakterien anschließend durch Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1% SDS) lysiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde 5 Min. auf Eis inkubiert und

anschließend 150 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde 5 Min. bei 12000 upm abzentrifugiert und die Plasmid-DNA im Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt (3 Min. bei RT). Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (10 Min. bei RT und 12000 upm) pelletiert, in 70%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µl A.dest. mit 4 µg RNase A gelöst und 1/10 davon der Analyse durch Restriktionsenzym-Verdauung unterzogen.

#### **2.2.19 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Qiagen-Methode)**

Die Präparation größerer DNA-Mengen wurde mit Ionenaustauschersäulen der Firma Diagen durchgeführt. Die Methode wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bakterien einer 200 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 Min. bei 4°C und 5000 x g). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A) resuspendiert und mit weiteren 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden 10 ml Puffer P3 (2,55 M Kaliumacetat) vorsichtig zugegeben und das Gemisch bei 4°C und 20000 x g für 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde auf eine mit Puffer QB (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 7,0) äquilibrierte Qiagensäule gegeben. Nach Bindung der DNA an die Säulenmatrix wurde die DNA zweimal mit 10 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 7,0) gewaschen und mit 5 ml Puffer QF (1,2 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 8,0) eluiert. Anschließend an eine Isopropanolfällung wurde die Plasmid-DNA mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in sterilem TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde im Spektralphotometer bestimmt.

#### **2.2.20 Restriktionsverdauung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Eine Einheit (1U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg DNA des Phagen λ in einer Stunde verdaut. In der Regel wurde ein 2-3 facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Die vom Hersteller für die einzelnen Restriktionsenzyme empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen wurden eingehalten.

#### **2.2.21 Umwandlung überhängender Enden in stumpfe Enden mit T4-DNA-Polymerase**

Um überhängende 3'-Enden zu entfernen wurde die 3'-5' Exonukleaseaktivität von T4-DNA-Polymerase eingesetzt. 500 bis 1000 ng DNA wurden in 1x konzentriertem T4-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT) und in Anwesenheit von 100 µmol

dNTPs mit 2U T4-DNA-Polymerase für 20 Min. bei 11°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine 10 Min. Inkubation bei 70°C inaktiviert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde mit EtOH gefällt, einmal mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in sterilem TE aufgenommen.

#### **2.2.22 Umwandlung überhängender Enden in stumpfe Enden mit Klenow-Polymerase**

Durch die DNA-Polymeraseaktivität und die 3'-5' Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I können sowohl 3' als auch 5' überhängende DNA-Enden in stumpfe Enden umgewandelt werden. 10 - 88 µl eines DNA-Restriktionsansatzes wurden mit 10x Klenow-Puffer (70 mM Tris/HCl pH 7,5; 70 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM NaCl; 10 mM DTT), dNTP's (je 25 µM final) und Klenow-Polymerase (1-5 U) auf 100 µl aufgefüllt und 15 Min. bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde 10 Min. bei 75°C abgestoppt, phenolisiert und gefällt.

#### **2.2.23 Dephosphorylierung von DNA**

Für die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen von durch Restriktionsenzyme linearisierter DNA wurde eine Behandlung mit alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIP) durchgeführt. Dabei wurden ca. 3 pmol DNA in 1x CIP-Puffer (100 mM Glyzin pH 10,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>) mit 10 U CIP für 60 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend phenolisiert. Nach der Präzipitation wurde die dephosphorylierte DNA für die Ligation eingesetzt.

#### **2.2.24 Phosphorylierung von 5'-OH-Enden**

PCR-Amplifikationsprodukte wurden vor der stumpfen Ligation in einen Vektor mit Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert. Dazu wurden 5 µl des präzipitierten PCR-Ansatzes in 1x PNK-Puffer (70 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT) in Anwesenheit von rATP (1 mM) mit 10-30 Enzymeinheiten PNK bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C für 10 Min. beendet. Zur Reinigung wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt und das entsprechende Fragment isoliert.

#### **2.2.25 Ligation von DNA**

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Produkte) wurden Vektor und Fragment mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten bzw. überhängende Enden aufgefüllt und der Vektor dephosphoryliert. Bei der enzymatischen Verknüpfung von Fragment und Vektor (Ligation) wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 100 ng Vektor mit 300-500 ng Fragment in 1x Ligasepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT) in Anwesenheit von 1 U T4-DNA-Ligase bei 15°C über Nacht

inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

### 2.2.26 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Methode von Sanger (1977) durchgeführt. Dabei wurde ein Kit der Firma United States Biochemicals (USB; Sequenase-Kit) verwendet. Die Durchführung erfolgte leicht modifiziert nach den Angaben des Herstellers: 10 µg DNA wurden eingetrocknet, in 200 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) gelöst und 15 Min. bei RT denaturiert. Die DNA wurde nach Neutralisation mit 20 µl 2 M NH<sub>4</sub>Ac pH 4,5 mit 440 µl Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt, mit maximaler Drehzahl bei 4°C in der EPPENDORF-Zentrifuge abzentrifugiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die denaturierte DNA wurde in 7 µl Wasser gelöst, mit 2,0 µl 5x Sequenzier-Puffer versetzt und 1 µl Primer (1 pmol) zugefügt. Nach 3 Min. Erhitzen auf 65°C kühlte der "Annealing-Mix" im Becherglas binnen 30 Min. langsam auf Raumtemperatur ab. Währenddessen wurden vier EPPENDORF-Reaktionsgefäße (für A,T,G und C) mit jeweils 2,5 µl des entsprechenden "Terminationsmixes" (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP; s.u.) auf Eis vorbereitet. Zur "Labeling Reaktion" wurden zu den 10 µl "Annealing-Mix" 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl 1:5 verdünnter "Labeling Mix" (1,5 mM dGTP, 1,5 mM dTTP, 1,5 mM dCTP), 1 µl α<sup>35</sup>S-dATP und 3 U modifizierte T7-DNA-Polymerase ("Sequenase" der Firma USB) gegeben und 5 Min. bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die 4 Terminationsgefäße bei 37°C vorgewärmt. Je 3,5 µl aus der "Labeling Reaktion" wurden im zeitlichen Abstand von 1 Min. mit dem "Terminationsmix" gemischt und weitere 5 Min. bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktionen mit je 4 µl 1x Formamid-Ladepuffer ("SSB") abgestoppt wurden. Vor dem Auftragen auf ein denaturierendes 6%iges PAA-Harnstoff-Sequenziergel wurden die Produkte 3 Min. auf 95°C erhitzt und in Eiswasser abgeschreckt.

Die Terminationsmischungen enthielten:

"ddATP"	80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 80 mM dCTP, 8 mM ddATP und 50 mM NaCl
"ddTTP"	80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 80 mM dCTP, 8 mM ddTTP und 50 mM NaCl
"ddGTP"	80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 80 mM dCTP, 8 mM ddGTP und 50 mM NaCl
"ddCTP"	80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 80 mM dCTP, 8 mM ddCTP und 50 mM NaCl

### 2.2.27 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 0,8 bis 1,5 % verwendet. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer (20 mM Tris/HCl; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,3) durch Kochen gelöst, verdampftes Wasser ersetzt und das Gel anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, f.c.) versetzt. Die Agaroselösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt und dann in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

### 2.2.28 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen unter denaturierenden Bedingungen (z.B. nach der DNA-Sequenzierung) erfolgte mit Hilfe der Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die entsprechenden Gele wurden mit einer Dicke von 0,2 mm gegossen. Dazu wurden 30 ml Gelmix (6 M Harnstoff, 7,75% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid in 1x TBE: 90 mM Tris/HCl; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,3) mit 300 µl APS und 30 µl TEMED versetzt, gemischt und die Gelmischung zwischen die Glasplatten gegossen. Eine Vorbehandlung der Ohrenglasplatte mit Repell-Silan (4% Dichlordimethylsilan in Tetrachlorkohlenstoff) ermöglichte es, die Glasplatten nach der Elektrophorese zu trennen und das Gel auf ein Whatman-Papier zu transferieren. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Kammern mit Puffer (1xTBE) gefüllt. Für eine optimal denaturierende Wirkung des Harnstoffs ist eine Temperatur von ca. 60°C notwendig, daher wurde ein einstündiger Vorlauf des Gels (bei 30 mA) durchgeführt, bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA. Nach Beendigung des Laufes wurde die mit Repell-Silan behandelte Glasplatte abgehoben und das Gel auf ein Stück Whatman-Papier der entsprechenden Größe transferiert. Anschließend wurde das Gel eine Stunde bei 60°C getrocknet und nach dem Abkühlen einem Röntgenfilm exponiert. Die Exposition erfolgte bei Raumtemperatur für 24 bis 48 h.

### 2.2.29 Eluation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das entsprechende DNA-Fragment wurde nach dem Auftrennen im Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 0,5 ml EPPENDORF-Gefäß, das halb mit Plastikwolle gefüllt war, transferiert. Im Boden des EPPENDORF-Gefäßes befand sich ein Loch. Das 0,5 ml EPPENDORF-Gefäß wurde in ein 1,5 ml EPPENDORF-Reaktionsgefäß eingesetzt und für 10 Min. bei 7000 upm in einer EPPENDORF Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluß, der sich im 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt hatte und das DNA-Fragment enthielt, wurde entweder direkt für Klonierungen verwendet

oder gefällt und dann in A.dest. resuspendiert. Die Reinheit und Konzentration des Fragmentes konnten dann im Agarosegel überprüft werden.

### 2.2.30 Southern-Analyse

Der Nachweis spezifischer PCR-Amplifikationsprodukte wurde mit Hilfe der Southern-Analyse durchgeführt. Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels eines alkalischen Kapillarblots (nach Southern, 1975) auf eine Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Nach dem Transfer (2-3 h) wurde die Membran kurz in 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend bei 65°C für 1-2 h prähybridisiert. Dazu wurde die Nylonmembran in einen abgeschnittenen Polypropylen-Meßzylinder (250 ml; Bachofer, Reutlingen) plaziert und 10 ml Hybridisierlösung (6x SSC; 0,5% SDS; 5x Denhardt's Lösung; denaturierte Lachssperma-DNA 200 µg/ml; denarurierte Hefe-RNA 200 µg/ml) zugegeben. Die Hybridisierung fand in einem Warmluft-Hybridisierschrank (Bachofer, Reutlingen) statt. Für die eigentliche Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde kurz aufgekocht (100°C, 3 Min.), auf Eis abgekühlt und zur Prähybridisierlösung gegeben (spezifische Aktivität: 2-5 x 10<sup>6</sup> cpm/ml Hybridisierlösung). Nach Hybridisierung über Nacht bei 65°C wurde die Nylonmembran 1x im Hybridisierzylinder mit Waschlösung I (2x SSC, 1% SDS) und danach 3x 60 Min. mit Waschlösung II (2x SSC, 0,1% SDS) bei 65°C in einer Plastikschaale im Wasserbad gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran luftgetrocknet und je nach Signalstärke zwischen 10 Min. und 48 h einem Autoradiographiefilm exponiert. Die Exposition erfolgte bei -80°C zwischen zwei Reflektorfolien (Du Pont). Nach der Exposition wurde die Radioaktivität durch 10-minütiges Kochen in 0,5%iger SDS-Lösung entfernt. Als Kontrolle auf etwaige Restaktivität wurde die Membran über Nacht einem Autoradiographiefilm exponiert und konnte dann für eine nochmalige Hybridisierung verwendet werden.

### 2.2.31 Random Priming von DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 1000 bp Länge wurde ein "Prime-it II-Random Primer Labeling"-Kit von Promega verwendet. 30 ng des DNA-Fragmentes (nach Eluation aus dem Agarosegel) wurden mit 10 µl Primern vermischt, 3 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend bei RT kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl 5x Primer-Puffer, 3 µl α<sup>32</sup>P-dCTP und 1 µl Exo (-) Klenow-Polymerase wurde 5 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Stopplösung beendet. Das Abtrennen der freien Nukleotide erfolgte mittels Elutip-d Säulen. Die Säulen wurden laut Herstelleranweisung äquilibriert und danach wurde der gesamte Markierungsansatz in 3 ml Niedrigsalzpuffer (0,2 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) in einer 5 ml Spritze auf die Säule geladen. Dieser Ansatz wurde dann langsam durch die Säule

gedrückt. Anschließend wurde das radioaktiv markierte Fragment mit 400 µl Hochsalzpuffer (1 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) unter Zuhilfenahme einer 1 ml Spritze aus der Säule eluiert. 2 µl des Eluates wurden in 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-safe) verbracht und die spezifische Aktivität der Probe mit einem Flüssig-Szintillationszähler (1211 Minibeta, LKB) bestimmt. Das Eluat wurde direkt für die Hybridisierung verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.2.32 PCR-Markierung von DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung CD44-exonspezifischer DNA-Sonden wurde eine "heiße" PCR durchgeführt. Als Mutterstrang für die PCR-Reaktion wurden 5 ng des Plasmids pSV-HPKII (siehe Materialien) verwendet. Primer, Reaktionspuffer und Taq-Polymerase wurden analog einer normalen PCR eingesetzt. Der spezielle Nukleotid-Mix (10x) enthielt dATP, dGTP, dTTP (je 2,5 mM) und dCTP (25 µM). Als radioaktives Nukleotid wurden 3 ml  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (30 µCi) pro Reaktionsansatz verwendet. Für die Amplifikation wurden 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C, 1 Min.; 60-62°C, 1 Min.; 72°C, 2 Min. Freie Nukleotide wurden mittels Elutip-d Säulen abgetrennt und danach die spezifische Aktivität der Sonde bestimmt (siehe 2.2.31).

### 2.2.33 Isolation von PolyA<sup>+</sup>-RNA

Diese Methode wurde zur Gewinnung polyadenylierter RNAs aus kultivierten Zellen angewendet. Die adhärent wachsenden Zellen (ca.  $5 \times 10^7$ ) wurden in der Zellkulturschale 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml STE-Puffer (0,1 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS (w/v)) inkubiert. Das entstehende Zellysate wurde mittels eines Gummischabers in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 300 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und im Ultraturax (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert (30 Sek. bei 50% Leistung). Danach wurde die Lösung 20 - 40 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit NaCl auf eine Endkonzentration von 0,5 mM eingestellt. Im Anschluß daran wurden 20 mg gequollene Oligo-dT-Zellulose zugegeben und 2 h oder über Nacht bei RT unter Drehen inkubiert. Die Zellulose mit der gebundenen RNA wurde danach auf eine Poly-Prep Chromatographiesäule gegeben und mit dem 3-fachen Säulenvolumen Waschpuffer (0,1 M NaCl; 10 mM Tris /HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS) gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit 2x 3 ml Elutionspuffer (1 mM Tris /HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS). Die RNA im Eluat wurde durch die Zugabe von 1,2 ml 3M NaAc pH 5,5 und 9 ml EtOH über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (10000 x g, 30 Min., 4°C) wurde die präzipitierte RNA in 200 µl A.dest. resuspendiert, phenolisiert und nochmals präzipitiert. Nach abermaliger Zentrifugation

wurde die RNA in 100 µl A.dest. aufgenommen und die optische Dichte bestimmt. Die RNA wurde sofort für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.34 Isolation von gesamtzellulärer RNA**

Gesamtzelluläre RNA wurde aus klinischem Tumormaterial und aus Normalgeweben zur späteren Synthese von cDNA isoliert. Es wurde dabei ein modifiziertes Verfahren nach Glisin et al. (1974) und Ullrich et al. (1977) angewendet. Tiefgefrorene Gewebestücke (Größe ca. 0,5 cm<sup>3</sup>) wurden bei RT mit 2 ml Guanidium-Lösung (4 M Guanidium-Isothiocyanat; 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 1% β-Mercaptoethanol) überschichtet und sofort mit einem Ultraturrax mechanisch zerkleinert (3x 30 Sek. bei 50% Leistung). Alternativ dazu wurden im Gefriermikrotom 50 Schnitte a 20 µm Dicke angefertigt und das anfallende Material in Guanidium-Lösung aufgenommen und mechanisch zerkleinert. Nach dem Homogenisieren wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (10000 x g; 10 Min.; 12°C) und zum Überstand 0,1 Volumen 20%iges Sarkosyl gegeben. Die Proben wurden dann für 2 Min. bei 65°C erhitzt und anschließend vorsichtig auf ein 5,7 M CsCl-Kissen aufgeschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge (Modell L8-55) im Swing-Out Rotor SW 50.1 für 12-20 h bei 18°C und 35000 upm. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, das Zentrifugenröhrchen kopfüber für 5 Min. auf Kleenex-Tücher gestellt und danach der Boden des Zentrifugenröhrchens mit einem Skalpell abgeschnitten. Die sedimentierte RNA wurde in 200 µl A.dest. resuspendiert, phenolisiert und gefällt. Nach der Fällung wurde das Präzipitat in A.dest. resuspendiert und die Konzentration der RNA im Spektralphotometer bestimmt. Die RNA wurde entweder sofort zur cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.35 cDNA-Synthese (Erststrangreaktion)**

1-2 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA bzw. 5 µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit dem Oligo-dT Primer (0,5 µg Primer/1 µg DNA) oder CD44-spezifischen Primern (0,5 µg Primer/1 µg DNA) in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 5 Min. bei 70°C inkubiert und dann kurz bei RT abzentrifugiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 5 µl 5x AMV-Reaktionspuffer, 2,5 µl 100 mM DTT, 2,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 0,7 µl RNasin (40 U/µl), 2 µl AMV-Reverse Transkriptase (8 U/µl) und 2,3 µl A.dest. zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurden 175 µl TE-Puffer zugegeben und die cDNA bei -20°C aufbewahrt oder sofort für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Qualität und Abundanz der mit den Oligo-dT Primern synthetisierten cDNA wurde mittels GAPDH-PCR überprüft (s. 2.2.37).

### 2.2.36 PCR-Amplifikation

Die PCR-Reaktion wurde mit einem Gene Amp PCR-System 9600 der Firma Perkin Elmer Cetus durchgeführt. 5 µl einer Erststrangreaktion (s. cDNA-Synthese) bzw. 0,1-5 ng Plasmid-DNA wurden mit je 125 ng 3'- und 5'-Amplifikationsprimern in 1x PCR-Puffer in Gegenwart von 250 µM dNTPs gemischt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 50 µl erhöht und die Amplifikation durch Zugabe von 5 U Taq-Polymerase gestartet. Für die Amplifikation wurden folgende Bedingungen gewählt: Denaturierung 1 Min., 94°C; Annealing 1-2 Min., 60-62°C; Extension: 90-180 Sek., 72°C. Je nach Anwendung wurden 20-50 Amplifikationszyklen gefahren. Nach dem Ende der Amplifikation wurden 10 µl der Reaktion auf einem Agarosegel analysiert.

### 2.2.37 GAPDH-PCR

Zur semiquantitativen und qualitativen Überprüfung der cDNA-Synthese mit Oligo-dT Primern wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Die PCR wurde analog 2.2.36 durchgeführt, wobei als spezifische Primer die Oligonukleotide 5'-GAPDH und 3'-GAPDH (s. Materialien) benutzt wurden. Folgende Bedingungen wurden für den PCR-Zyklus gewählt: 94°C/ 1 Min., 62°C/ 1 Min., 72°C/ 1,5 Min., wobei in parallelen Ansätzen 18, 20 und 25 Zyklen durchgeführt wurden. Je 10 µl einer jeden Reaktion wurden im Agarosegel miteinander verglichen. Aufgrund der Intensität der erhaltenen Banden in den jeweiligen Ansätzen konnte die Effizienz der cDNA-Synthese geschätzt werden.

### 2.2.38 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Eukaryontische, adhärent wachsende Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert (3 Min., 800 x g) und in FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden dann sofort in Kryoröhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Nach 1 Stunde bei 0°C wurden die Zellen bei -80°C eingefroren. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen unter flüssigem Stickstoff bei -160°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad schnell erwärmt, der Inhalt in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (3 Min., 800 x g). Die Zellen wurden dann in neuem Zellkulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät.

### 2.2.39 Passagieren von eukaryontischen Zellen

Adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung (0,25% in PBS) bei 37°C für 5-10 Min. inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 Min. bei 800 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf Kulturschalen verteilt.

#### 2.2.40 Einfrieren von Bakterien

Eine Übernachtskultur der Bakterien wurde auf 30% Glycerin (steril) eingestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.41 Präparation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Bakterien aus einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden in 200 ml SOB (20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM KCl) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben beimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  kräftig geschüttelt. Bei einer OD<sub>580</sub> von 0,3 wurden die Bakterien in 50 ml Röhrchen überführt und in Eiswasser gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien 10 Min. bei 3500 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Bakterien in eiskaltem STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 3 mM Hexa-Amino-Kobalt-Chlorid, 10 mM K-MES pH 6,5, 15% Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der resuspendierten Bakterien auf Eis. Anschließend wurden sie wiederum 10 Min. bei 3500 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die nun für die DNA-Aufnahme kompetenten Bakterien vorsichtig, auf Eis, in 4 ml STB resuspendiert, in 200  $\mu\text{l}$  Aliquots abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.42 Transformation von Bakterien

10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes oder 10 ng ungeschnittene Plasmid-DNA wurden mit 100  $\mu\text{l}$  kompetenten Bakterien eine Stunde auf Eis ( $0^{\circ}\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 3 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  wärmebehandelt (Hitzeschock) und wiederum in Eis abgekühlt. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 x g bei RT sedimentiert und in 2x TY-Medium resuspendiert. Für die phänotypische Expression des Resistenzgens auf dem Plasmid wurden die Bakterien 45 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend auf LB-Platten (+ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  konnten eventuell angewachsenen Klone analysiert werden.

#### 2.2.43 Statistische Analysen

Statistische Analysen (Berechnung der Überlebenskurven nach Kaplan und Meier (1958) und Signifikanzberechnungen mit Hilfe des Log-Rank-Tests (Peto et al., 1977)) wurden mit dem Statistikprogramm "Testimate" (Version 5.0) von IDV Datenanalyse und Versuchsplanung (Gauting bei München) durchgeführt. Als Hardware wurde ein IBM-kompatibler 486er-Prozessor verwendet.

## 3 Ergebnisse

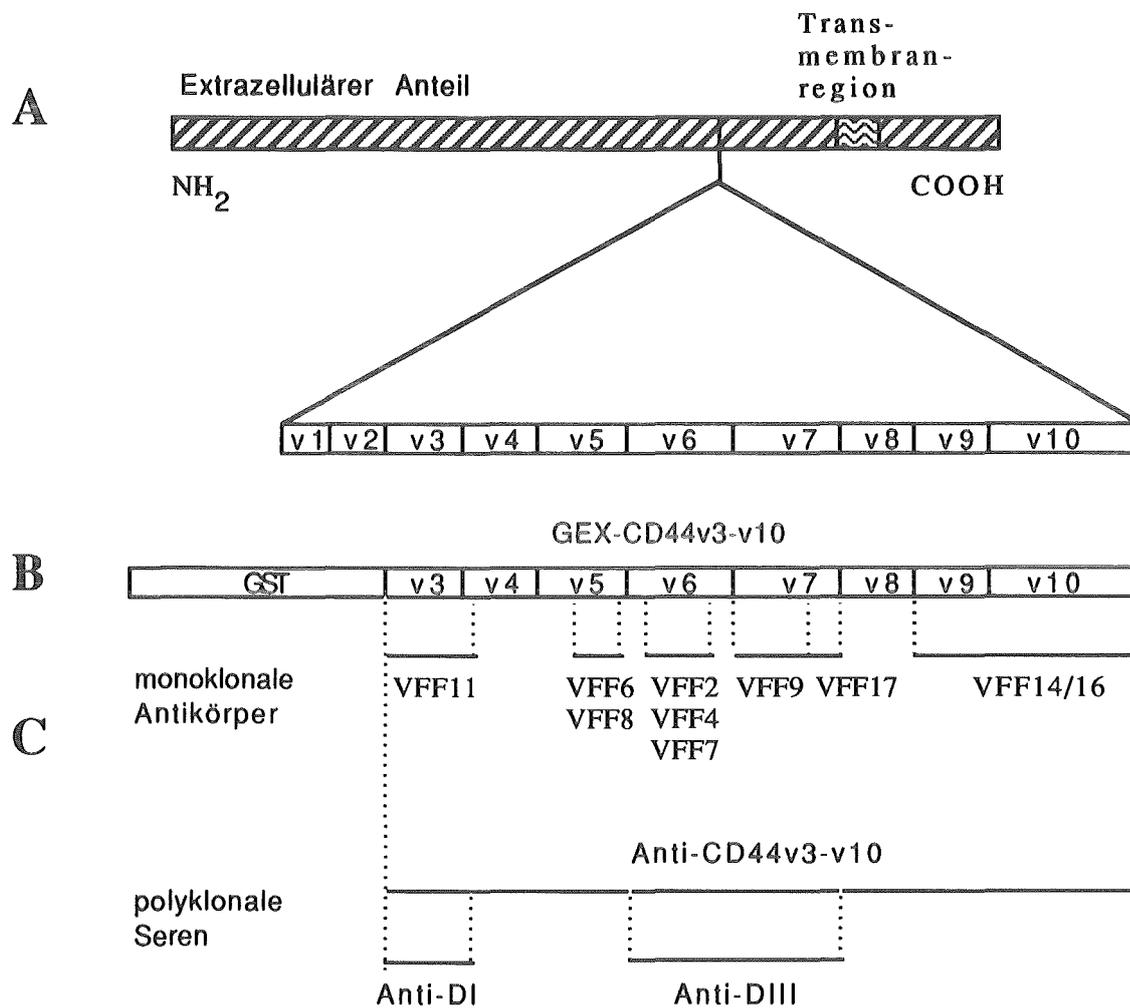
### 3.1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern, die variante Formen des humanen CD44-Moleküls erkennen

Ein wichtiges Instrument zum Nachweis vorgegebener Proteine in klinischen Gewebeproben stellen monoklonale Antikörper (mAk) bzw. polyklonale Seren dar. Gegen variante Formen des humanen CD44-Moleküls gerichtete Antikörper waren bislang nicht verfügbar. Der mAk 1.1ASML, der CD44-Varianten der Ratte (Meta-1 und Meta-2 in der metastasierenden Tumorzelllinie BSp73ASML eines Ratten-Adenopankreaskarzinoms; Günthert et al., 1991; W. Rudy, 1993) identifiziert, zeigt keine Kreuzreaktion mit CD44-Varianten in menschlichen Geweben (Dr. W. Rudy, persönliche Mitteilung). Daher habe ich Antikörper, die die verschiedenen varianten Bereiche des humanen CD44-Moleküls erkennen, hergestellt.

#### 3.1.1 Ein polyklonales Kaninchenserum erkennt spezifisch Varianten des humanen CD44-Moleküls

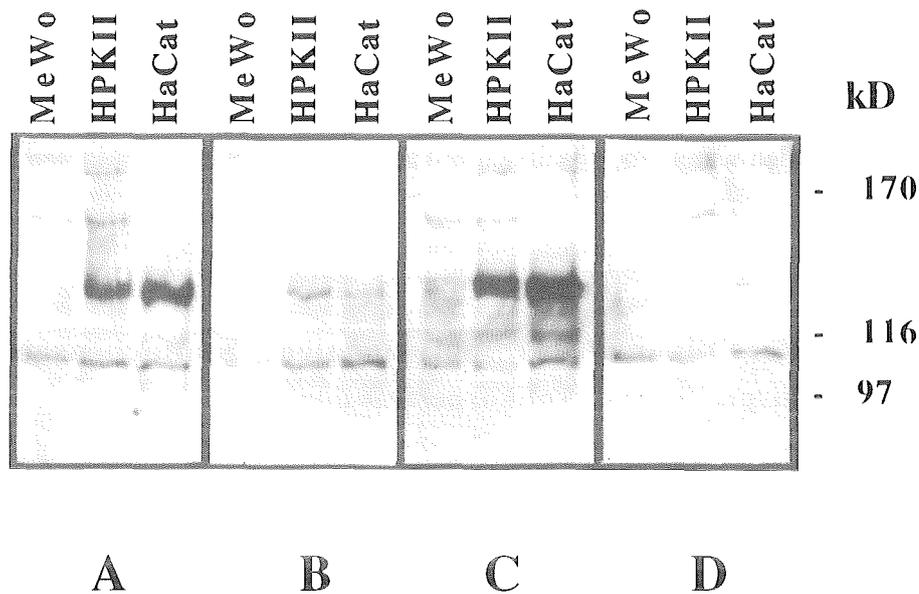
Neuseeländische weiße Kaninchen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit einem bakteriell exprimierten Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein, das den von den Exons v3 bis v10 codierten varianten Bereich von CD44 enthält, immunisiert (GEX-CD44v3-v10, siehe Abb. 1B). Sechs Wochen nach Beginn der Immunisierung hat das Kaninchenserum mit dem zur Immunisierung verwendeten Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 sowie mit dem Glutathion-S-Transferase-Anteil GEX-2T des Fusionsproteins allein nach gelelektrophoretischer Auftrennung dieser Proteine und Transfer auf eine PVDF-Membran (Western-Analyse) reagiert (nicht gezeigt).

Um zu prüfen, ob das Serum spezifisch mit eukaryont exprimierten varianten CD44-Molekülen reagiert, wurde eine Western-Analyse mit Extrakten von verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinien wurden auf der Basis früherer RNA-Analysen ausgewählt (Hofmann et al., 1991). Die immortalisierten Keratinozytenzelllinien HaCat und HPKII exprimieren hauptsächlich eine RNA-Spezies die komplementär zu den varianten Exons v3 bis v10 ist. Als Beispiel für eine CD44-variantenneegative Zelllinie wurde die Melanomzelllinie MeWo ausgewählt, die nur die Standardform von CD44 exprimiert (Hofmann et al., 1991). In einer Western-Analyse mit dem Kaninchenserum ist deutlich zu sehen, daß in HaCat- und HPKII-Zellextrakten Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 130 Kilodalton erkannt werden. Mit dem MeWo-Zellextrakt ist keine



**Abb. 1**

- A: Schematische Darstellung einer CD44-Variante mit den varianten Exons v1 bis v10. Die Insertionsstelle des varianten Anteils in den extrazellulären Anteil der Standardform von CD44 (schraffierte Balken) ist angedeutet.
- B: Schematische Darstellung des zur Immunisierung von Kaninchen und Mäusen verwendeten Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins GEX-CD44v3-v10 mit den varianten CD44-Exons v3 bis v10; GST: Glutathion-S-Transferase-Anteil des Fusionsproteins.
- C: Darstellung der Exonspezifität der CD44-variantenspezifischen monoklonalen Antikörper und polyklonalen Seren. Die Epitoplokalisation der jeweiligen Antikörper und Seren ist durch die entsprechenden Linien gekennzeichnet.



**Abb. 2 Ein polyklonales Kaninchenserum erkennt spezifisch zellulär exprimierte variante Formen von CD44**

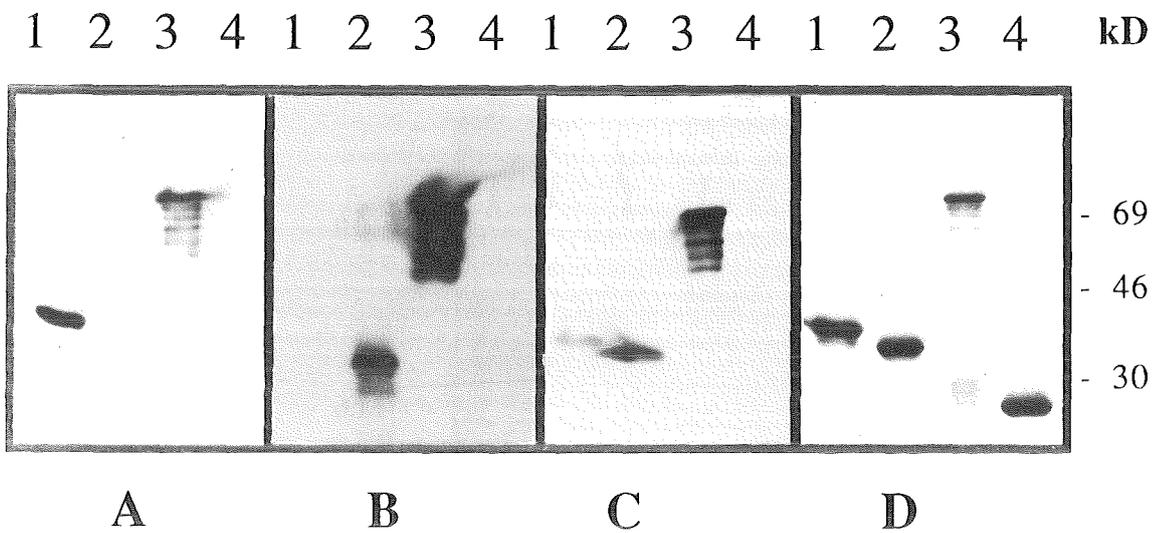
Je 100 µg von Zellextrakten aus MeWo-, HPKII- und HaCat-Zellen wurden in einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Primärantikörper für die Western-Analyse wurde eine 1:500 Verdünnung des nicht affinitätsgereinigten Kaninchenserums Anti-CD44v3-v10 entweder nicht vorinkubiert (A) oder nach Vorinkubation mit 2 µg Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 (B), GEX-2T (C) bzw. mit dem mittels Thrombin abgespaltenen varianten Anteil v3-v10 (D) pro ml Hybridisierlösung verwendet.

Reaktion mit einem Protein dieses Molekulargewichts zu erkennen (Abb. 2A). Neben dieser sehr deutlichen Reaktion im Bereich von 130 kD sind mehrere Signale mit Proteinen anderen Molekulargewichts zu erkennen, die jedoch wesentlich weniger intensiv sind. Zum Teil sind diese Signale in den Extrakten aller drei Zelllinien zu erkennen (z. B. die Bande bei 110 kD), zum Teil reagieren nur Proteine aus den Keratinozytenzelllinien mit den Antikörpern (Bande bei 120 und 180 kD). Nach Präinkubation des Kaninchenserums mit dem zur Immunisierung verwendeten Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 und anschließender Western-Analyse ist eine deutlich reduzierte Reaktion des Serums mit den 130 kD Proteinen aus den Keratinozytenzelllinien zu sehen, ein Signal bei 120 kD ist nicht mehr zu erkennen (Abb. 2B). Die Reaktion des präinkubierten Serums mit anderen Proteinen wurde dagegen nicht beeinträchtigt. Eine Präinkubation des Kaninchenserums mit dem bakteriell exprimierten Glutathion-S-Transferase-Anteil des Fusionsproteins hingegen beeinträchtigt die Reaktivität der Antikörper in der Western-Analyse nicht (Abb. 2C). Präinkubation des Kaninchenserums mit dem durch Thrombin abgespaltenen CD44v3-v10-Anteil des

Fusionproteins führt wiederum zum nahezu vollständigen Verlust der Reaktivität mit den 130 kD Proteinen in den Extrakten aus Keratinozytenzelllinien, eine Reaktion mit einem Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 120 kD in HaCat-Zellen ist nicht mehr zu beobachten (Abb. 2D). Damit konnte gezeigt werden, daß in dem Kaninchenserum Antikörper vorhanden waren, die spezifisch mit zellulär exprimierten varianten Formen von CD44 reagieren.

### **3.1.2 Affinitätsreinigung des polyklonalen Kaninchenserums zur Herstellung exonspezifischer Antikörperfraktionen**

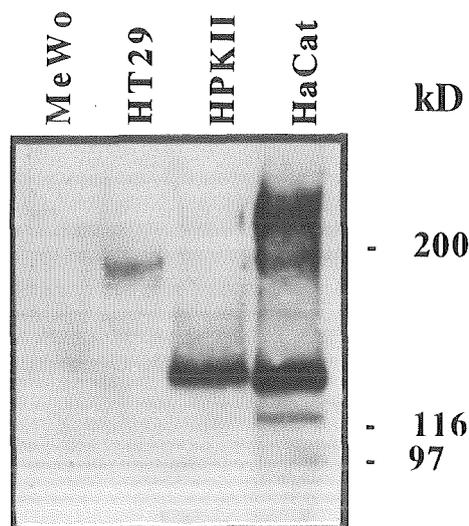
Um nun mögliche Kreuzreaktivitäten, hervorgerufen durch bereits vor der Immunisierung im Serum vorhandene Antikörper, zu beseitigen (z.B. 110 kD-Bande in Abb.2A-D) und um gleichzeitig exonspezifische Fraktionen des Kaninchenserums zu erhalten, wurde eine Affinitätsreinigung des Serums durchgeführt. Zur Entfernung der Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper wurde das Serum von mehreren Immunisierungen vereinigt und über eine GEX-2T-Säule geschickt (siehe Material und Methoden). Ein Teil des so erhaltenen Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper-freien Anteils des Serums wurde konsekutiv über eine GEX-DI- und GEX-DIII-Säule geschickt (siehe Material und Methoden). Die von den Säulen eluierten Antikörperfraktionen (Anti-DI, Anti-DIII) und das Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper-freie Gesamtserum (Anti-CD44v3-v10) wurden in einer Western-Analyse mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen auf ihre Spezifität getestet. Die Antikörperfraktion Anti-DI erkennt das Fusionsprotein GEX-DI (Exons v3/v4) und GEX-CD44v3-v10 (Exons v3-v10), nicht jedoch das Fusionsprotein GEX-DIII (Exons v6/v7) und GEX-2T (Glutathion-S-Transferase-Anteil ohne varianten CD44-Bereich) (Abb. 3A). Die Antikörperfraktion Anti-DIII reagiert nur mit dem Fusionsprotein GEX-DIII und GEX-CD44v3-v10 (Abb. 3B), das Gesamtserum Anti-CD44v3-v10 reagiert mit den drei varianten CD44-Fusionsproteinen, nicht aber mit dem Glutathion-S-Transferase-Anteil GEX-2T (Abb. 3C). Die Exonspezifität dieser Seren ist schematisch in Abb. 1C dargestellt.



**Abb. 3 Charakterisierung der Exonspezifität von affinitätsgereinigten, polyklonalen Seren gegen variante CD44-Proteine**

Je 100 ng der bakteriell exprimierte Fusionsproteine GEX-DI (Spur 1), GEX-DIII (Spur 2), GEX-CD44v3-v10 (Spur 3) und GEX-2T (Spur 4) wurden in einem SDS-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Primärantikörper für die nachfolgende Western-Analyse wurde die affinitätsgereinigte Serumfraktion Anti-DI (Konzentration 40 ng/ml; A), Anti-DIII (Konzentration 20 ng/ml; B) und Anti-CD44v3-v10 (Konzentration 10 ng/ml; C) verwendet. In D ist das mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Gel zu sehen (aufgetragene Proteinmenge: 1 µg pro Spur).

Die Reaktivität des aufgereinigten Serums Anti-CD44v3-v10 wurde wiederum in einer Western-Analyse mit Extrakten aus verschiedenen Zelllinien überprüft (Abb. 4). Das Serum erkennt im HaCat-Zellextrakt Proteine mit einem scheinbaren molekularen Gewicht von 120, 130, 190 und 230 kD. Die Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 120 bzw. 130 kD wurden bereits in der Western-Analyse mit dem ungereinigten Kaninchenserum detektiert (s. Abb. 2), wobei jedoch das 120 kD Protein nur sehr schwach zu erkennen war. Proteine größer als 180 kD konnten aufgrund des Trennbereichs des verwendeten Geles nicht nachgewiesen werden. Im HPKII-Extrakt wird ein Protein von ca. 130 kD angefärbt. Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 exprimiert eine dominante RNA-Spezies, die Homologie zu den varianten Exons v8 bis v10 des CD44-Gens aufweist (Hofmann et al., 1991). Das polyklonale Serum Anti-CD44v3-v10 erkennt im Zellextrakt dieser Zellen ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 180 kD. Mit Extrakten aus der für CD44-Varianten negativen Melanomzelllinie MeWo ist keinerlei Reaktion zu erkennen, unspezifische Reaktionen wie in Abb. 2 sind nicht zu bemerken.



**Abb. 4 Menschliche Zelllinien exprimieren variante CD44-Proteine**

Je 100  $\mu$ g von Zellextrakten der induzierten Zelllinien wurden in einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Primärantikörper für die Western-Analyse wurde eine 1:500 Verdünnung des Kaninchenserums Anti-CD44v3-v10 (Konzentration 80 ng/ml) nach der Affinitätsreinigung verwendet.

Um auszuschließen, daß es sich bei den in der Western-Analyse festgestellten Signalen mit dem Kaninchenserum nicht um intrazellulär lokalisierte Formen von varianten CD44-Molekülen handelt, z.B. um Vorläufermoleküle des reifen Proteins, wurden im Labor von Dr. Steven Pals (Academic Medical Center, Amsterdam) FACS-Analysen mit intakten Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Antikörperfraktionen Anti-DI und Anti-DIII als auch das gesamte Serum Anti-CD44v3-v10 Oberflächenproteine auf HaCat- und HPKII-Zellen erkennen (siehe Tabelle 1). Auf HT29-Zellen wurde nur mit dem Gesamtserum Anti-CD44v3-v10 ein Signal erhalten, während Zellen der für variantes CD44 negativen Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit keinem der variantenspezifischen Antikörper reagiert haben (Tabelle 1). Als Positivkontrolle für die Reaktion diente der Anti-Standard-CD44-Antikörper NKI-PI, der mit allen vier Zelllinien eine deutliche Färbung gezeigt hat (Tabelle 1). Damit konnte nachgewiesen werden, daß die hergestellten Seren spezifisch mit an der Zelloberfläche exprimierten CD44-Varianten reagieren und keine Kreuzreaktion mit der Standardform von CD44 zeigen.

**Tabelle 1**

**FACS-Analyse verschiedener humaner Zelllinien mit variantenspezifischen Anti-CD44-Kaninchenseren**

Antikörperspezifität	Zelllinien			
	HaCat	HPKII	HT29	SW480
Anti-CD44v3-v10	+	+	+	-
Anti-DI (Exons v3/v4)	+	+	-	-
Anti-DIII (Exons v6/v7)	+	+	-	-
NKI-P1 (Anti-Standard-CD44)	+	+	+	+

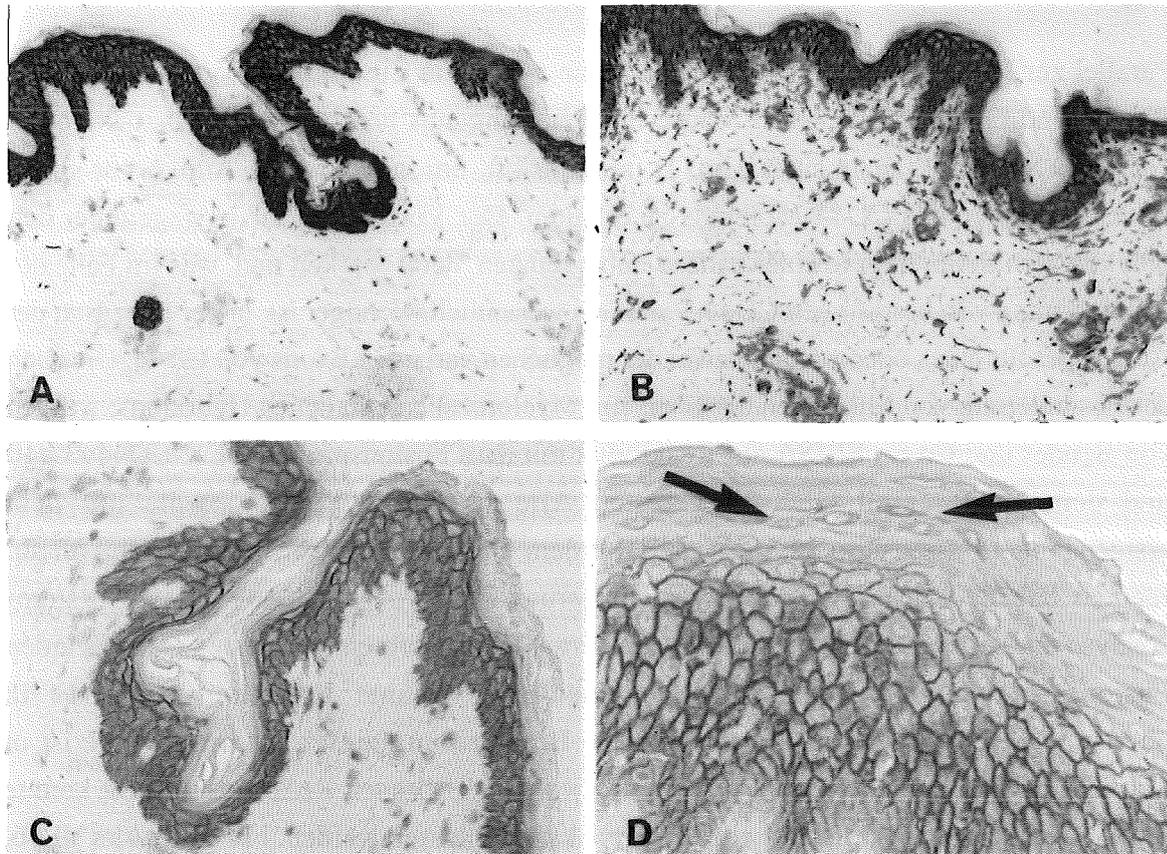
+: positive Fluoreszenz; -: keine Fluoreszenz

**3.1.3 Die variantenspezifischen polyklonalen Seren eignen sich zum immunhistochemischen Nachweis von CD44-Varianten**

Die ursprüngliche Intention der Herstellung variantenspezifischer Anti-CD44-Antikörper war es, ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von klinischem menschlichen Tumormaterial zur Verfügung zu haben. Die am häufigsten angewandte Methode stellt dabei die immunhistochemische Analyse von Tumordünnschnitten dar. Um zu prüfen, ob die oben beschriebenen affinitätsgereinigten Kaninchenseren für diese Methodik geeignet sind, wurden Dünnschnitte normaler menschlicher Haut hergestellt und auf Reaktivität mit den genannten Antikörpern untersucht. Normale menschliche Haut wurde deshalb gewählt, weil aus Voruntersuchungen bereits bekannt war, daß immortalisierte Keratinozytenzelllinien CD44-Varianten exprimieren (Hofmann et al., 1991). Aus den oben beschriebenen Experimenten wurde auch ersichtlich, daß die Antikörper spezifisch mit varianten CD44-Proteinen auf diesen Zelllinien reagieren. Außerdem wurde von Wang et al. (1992) eine starke Expression von CD44 in Paraffindünnschnitten menschlicher Haut nachgewiesen, wobei jedoch ein Anti-Standard-CD44-Antikörper verwendet wurde. Somit war es naheliegend, auch eine Expression von CD44-Varianten in normaler menschlicher Haut zu erwarten, zumal die Zellen im Stratum germinativum quasi einen immortalisierten Phänotyp aufweisen (analog zu HaCat- und HPKII-Zellen). In Abb. 5A ist deutlich zu erkennen, daß das Kaninchenserum Anti-CD44v3-v10 mit allen Schichten der Keratinozyten in der Haut mit Ausnahme des Stratum corneum reagiert. Eine Reaktion mit Zellen im Bereich der Dermis ist nicht zu erkennen. Mit einem Antikörper, der ein Epitop im Standardanteil des CD44-Moleküls erkennt (NKI-PI), ist ein identisches Reaktionsmuster mit den Keratinozyten zu

beobachten, wobei zusätzlich noch Fibroblasten und lymphozytäre Zellen im Bereich der Dermis angefärbt sind (Abb. 5B). Die beiden Antikörperfraktionen Anti-DI und Anti-DIII zeigen ein identisches Reaktionsmuster wie das Serum Anti-CD44v3-v10 (Ein Beispiel für das Serum Anti-DI ist in Abb. 5C gezeigt). Verwendet man an Stelle von Gefrierschnitten Paraffinschnitte, so läßt sich ein interessantes Phänomen beobachten. Das Serum Anti-CD44v3-v10 zeigt im wesentlichen die gleiche Färbung wie mit Gefriermaterial, mit dem Unterschied, daß im Paraffinschnitt das Stratum granulosum nicht angefärbt wird (Abb. 5D, Pfeile). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Wang et al. gemacht, die jedoch, wie bereits oben erwähnt, einen Antikörper gegen die Standardform von CD44 verwendet haben. Somit scheint die Fixierung und Einbettung von Geweben einen entscheidenden Einfluß auf die Reaktivität der Antikörper zu haben, wobei Kryokonservation im allgemeinen als die schonendere Methode betrachtet wird, da in diesem Fall das Gewebe unfixiert konserviert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Battifora und Kopinsky, 1986; Battifora, 1988; Slamon et al., 1989).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die affinitätsgereinigten Seren gegen variante Bereiche des CD44-Moleküls spezifisch mit varianten CD44-Molekülen *in situ* reagieren und somit für die Untersuchung von klinischem Tumormaterial geeignet sind. Aufgrund der verringerten Reaktivität mit Paraffin-fixierten Gewebematerial wurde für alle weiteren immunhistochemischen Analysen Gefriermaterial verwendet.



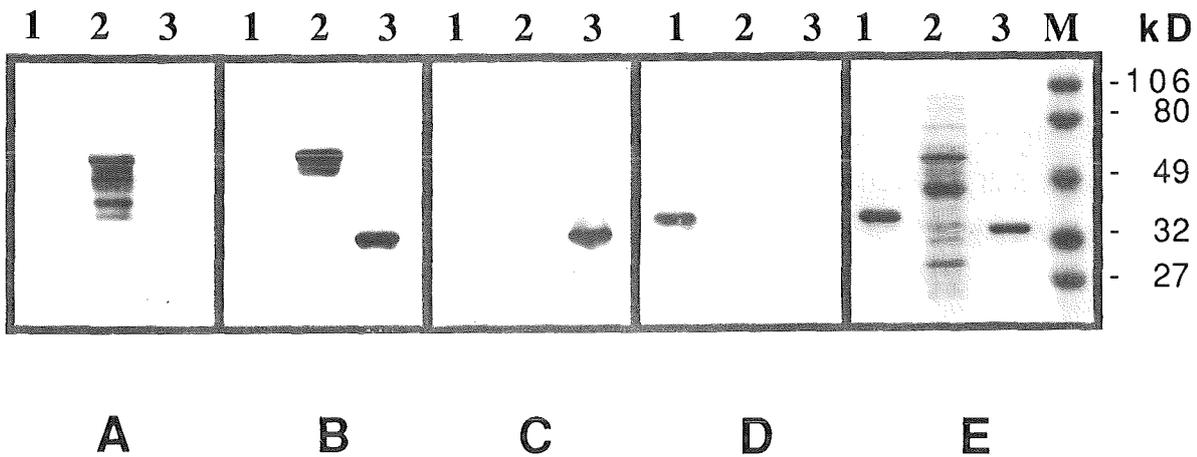
**Abb. 5 Normale menschliche Hautkeratinozyten exprimieren variante Formen von CD44**

Gefrierdünnschnitte (A-C) und ein Paraffindünnschnitt (D) normaler menschlicher Haut wurden immunhistochemisch mit den affinitätsgereinigten polyklonalen Seren Anti-CD44v3-v10 (A, D; Verdünnung 1:30) und Anti-DI (C; Verdünnung 1:30) gegen variantes CD44 und mit dem mAk NKI-P1 gegen die Standardform von CD44 (B; Verdünnung 1:100) untersucht. Man sieht, daß in den Keratinozyten mit Ausnahme des Stratum corneum variante Formen von CD44 exprimiert werden. Im Paraffinschnitt erfolgte keine Reaktion mit den Zellen des Stratum granulosum (D, Pfeile). Die Farbentwicklung erfolgte mittels DAB (A, B) oder AEC (C, D), die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerungen 8x (A, B), 20x (C) und 40x (D).

### 3.1.4 Charakterisierung von variantenspezifischen, monoklonalen Anti-CD44-Antikörpern

Parallel zur Herstellung der polyklonalen Seren wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Bender und Co GmbH in Wien Mäuse mit dem eingangs beschriebenen Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 (siehe auch Abb. 1) immunisiert, um monoklonale Antikörper gegen variante Formen des CD44-Moleküls zu erhalten. Der Vorteil von mAks gegenüber den polyklonalen Seren liegt in einer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und, was im Falle der Untersuchung von bestimmten CD44-Varianten wesentlich wichtiger ist, in der Spezifität der Antikörper für eines oder maximal zwei der möglichen varianten Exons von CD44. Die nach der Fusionierung von Milzzellen der Maus mit Myelomzellen erhaltenen Hybridome wurden von Bender und Co im ELISA auf Reaktivität mit dem Fusionsprotein GEX-CD44v3-v10 und dem Vektoranteil GEX-2T getestet. Alle Hybridomüberstände, die mit dem erstgenannten Fusionsprotein, nicht aber mit dem Glutathion-S-Transferase-Anteil allein, reagiert haben, wurden zur genaueren Kartierung der Exonspezifität in einer Western-Analyse mit verschiedenen bakteriell exprimierten Fusionsproteinen getestet. Dabei wurden Fusionsproteine verwendet, die unterschiedliche variante Bereiche von CD44 in überlappender Weise enthalten (eine genaue Beschreibung dieser Fusionsproteine ist in Material und Methoden zu finden). Aus den jeweils erhaltenen Reaktionsmustern konnte somit auf die Exonspezifität der einzelnen mAks geschlossen werden. Für die mAks VFF6, VFF7, VFF9 und VFF11 ist exemplarisch eine solche Western-Analyse dargestellt (Abb. 6). Eine Übersicht aller getesteten mAks mit ihrer Reaktivität in der Western-Analyse ist in Tabelle 2 dargestellt, die schematische Darstellung der Exonspezifität ist in Abbildung 1C zu sehen. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, daß die Mehrzahl der erhaltenen mAks mit dem von den Exons v5 bis v7 codierten Bereich des CD44-Moleküls reagieren.

Analog zu den Kaninchenserum wurde die Spezifität der mAks mit eukaryont exprimierten CD44-Varianten im FACS getestet (Labor Dr. S. Pals, Amsterdam). Als Zelllinie wurden wiederum HaCat-Zellen verwendet, da diese aufgrund der bekannten RNA-Daten und den Ergebnissen mit den variantenspezifischen polyklonalen Seren (siehe vorhergehendes Kapitel) mit großer Wahrscheinlichkeit die varianten Exons v3 bis v10 auf der Zelloberfläche exprimieren. Als Negativkontrolle wurde die CD44-variantenneegative Zelllinie SW480 verwendet. Alle getesteten mAks reagierten positiv mit den HaCat-Zellen. Eine Reaktion mit SW480-Zellen wurde mit keinem der mAks beobachtet (nicht gezeigt).



**Abb. 6 Charakterisierung der Exonspezifität von variantenspezifischen Anti-CD44-mAks**

Je 100 ng der bakteriell exprimierten Fusionsproteine GEX-DI (Spur 1), TrpE-DII/III (Spur 2) und GEX-DIII (Spur 3) wurden in einem SDS-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Primärantikörper für die Western-Analyse wurden die monoklonalen Antikörper VFF6 (A), VFF7 (B), VFF9 (C) und VFF11 (D) verwendet. Die Verdünnung der Hybridomüberstände betrug 1:2000. In E ist das mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Gel zu sehen. In den Spuren 1 und 3 wurden affinitätsgereinigte Fusionsproteine aufgetragen, in Spur 2 ein ungereinigtes Bakterienlysat. M: Proteinmolekulargewichtsstandard

**Tabelle 2**

**Kartierung variantenspezifischer Anti-CD44-mAks**

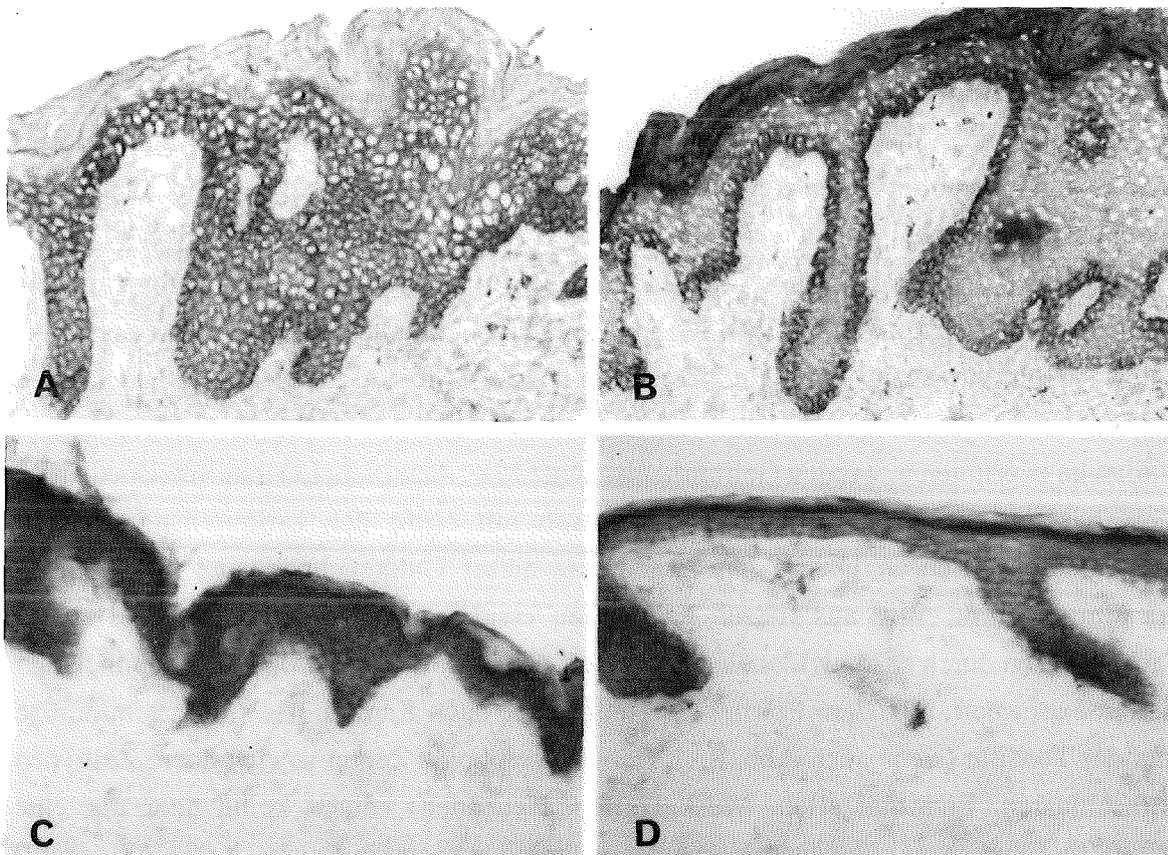
Fusionsproteine	monoklonale Antikörper: VFF									
	2	4	6	7	8	9	11	14	16	17
GEX-CD44v3-v10 (Exons v3-v10)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEX-DI (Exons v3/v4)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TrpE-DII/III (Exons v5/v6)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
GEX-DIII (Exons v6/v7)	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
GEX-DI-DIV (Exons v3-v8)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
GEX-DIII-DVI (Exons v7-v10)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
GEX-v6 (Exon v6)	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
GEX-v8 (Exon v8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Reaktion des mAks mit dem Fusionsprotein in einer Western-Analyse; -: keine Reaktion

### **3.1.5 Exonspezifische monoklonale Antikörper zeigen unterschiedliche Reaktionsmuster mit menschlicher Haut**

Die immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten menschlicher Haut mit diesen mAks hat gezeigt, daß alle variantenspezifischen Antikörper positiv mit Keratinozyten reagieren, wobei es erhebliche Unterschiede im beobachteten Reaktionsmuster gibt. Die mAks VFF4, VFF6, VFF7, VFF8, VFF9, VFF14 und VFF16 reagierten deutlich mit allen Kertinozytenschichten mit Ausnahme des Stratum corneum, analog zu den polyklonalen Seren (Abb. 7A, C). Dabei zeigen die gegen die Exons v9 und v10 gerichteten mAks (VFF14 und VFF16) eine diffusere Färbung der Keratinozyten als die gegen die anderen Exons gerichteten mAks (Abb. 7C). Der Antikörper VFF2 zeigt nur eine Reaktion mit dem Stratum basale und dem Stratum corneum der Haut (Abb. 7B), während mAk VFF11 hauptsächlich mit dem Stratum corneum reagiert (nicht gezeigt). Der mAk VFF17 zeigt eine schwache Färbung aller Schichten mit einer Zunahme im apikalen Bereich (Abb. 7D).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es mir in dieser Arbeit erstmalig gelungen ist, polyklonale Seren und monoklonale Antikörper gegen variante Bereiche des humanen CD44-Moleküls herzustellen und zu charakterisieren. Mit Hilfe der affinitätsgereinigten Serumfraktionen und der exonspezifischen mAks stehen darüberhinaus Werkzeuge zur Verfügung, mit denen die Expression varianter Formen von CD44 in klinischem menschlichen Tumormaterial in größerem Umfang mittels Immunhistochemie untersucht werden kann.



**Abb. 7 Variantenspezifische Anti-CD44-mAks reagieren unterschiedlich mit Hautkeratinozyten**

Immunhistochemische Analyse von Gefrierdünnschnitten normaler menschlicher Haut. Für die Antikörperreaktion wurden die mAks VFF7 (A), VFF2 (B), VFF16 (C) und VFF17 (D) in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Originalvergrößerung 20x, Gegenfärbung Hämatoxylin.

### 3.2 Expression von CD44-Varianten in normalen menschlichen Geweben

CD44-Moleküle werden auf einer Vielzahl verschiedenster Zelltypen exprimiert. Starke Expression findet man besonders auf Zellen des hämatolymphoiden Systems (z.B. Lymphozyten, Makrophagen) und in epithelialen Geweben (Thyroidea, Bronchien), aber auch auf Fibroblasten, Zellen des glatten Muskels und auf Astrozyten (Picker et al, 1989; Haynes et al., 1989). Da bei diesen Untersuchungen Antikörper verwendet wurden, die ein Epitop im Standardanteil des CD44-Moleküls erkennen, konnte zum damaligen Zeitpunkt keine Aussage über die Art der exprimierten CD44-Moleküle gemacht werden. Um zu untersuchen, ob normale, d. h. nicht pathologisch veränderte menschliche Gewebe CD44-Varianten exprimieren, wurden Gefrierdünnschnitte bzw. Ausstrichpräparate verschiedenster Gewebe- und Zelltypen immunhistochemisch mit Hilfe der variantenspezifischen polyklonalen Seren analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, werden CD44-Varianten, nachgewiesen durch das polyklonale Serum Anti-CD44v3-v10, vorwiegend auf epithelialen Zellen exprimiert, z.B. dem Epithel der Haut (siehe auch Kapitel 3.1.3), der Schilddrüse und der Tonsille (siehe auch Abb. 8A). Hämatolymphoide Zellen sowie andere Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, Neuronen) zeigen keine oder nur eine schwache Expression von CD44-Varianten, während eine starke Expression von Standard-CD44 nachgewiesen werden kann (Ein Beispiel ist in Abb. 8A und B gezeigt). Verwendet man die exonspezifischen Seren Anti-DI und Anti-DIII so findet man in Keratinozyten, der Mukosa von Tonsille und Pharynx, in den Pankreasgängen, im Urothel und im Epithel der Bronchien eine Expression der Exons v3/v4 und v6/v7 (ein Beispiel ist in Abb. 8C dargestellt). In der foveolären Proliferationszone und dem mukoiden Oberflächenepithel der Magenschleimhaut (siehe auch Kapitel 3.4.2) und in der Thyroidea ist dagegen nur eine Reaktion mit dem Serum Anti-DIII festzustellen, alle anderen untersuchten Epithelien zeigen keine oder nur eine sehr schwache Reaktion mit den variantenspezifischen Antikörpern (nicht gezeigt).

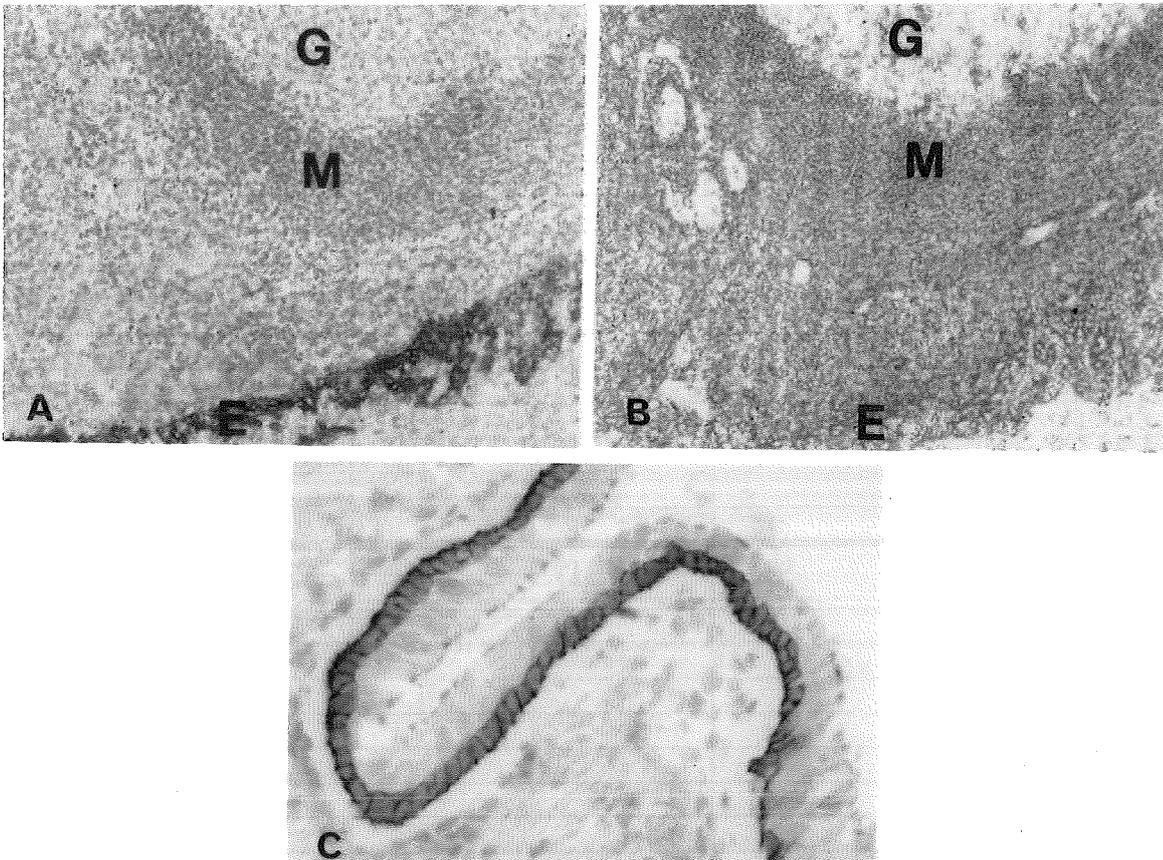
Somit ist die Expression varianter Formen von CD44 auf wenige menschliche Normalgewebe, vor allem epithelialen Ursprungs, beschränkt, während die Standardform von CD44 zusätzlich noch in vielen anderen Gewebetypen nachgewiesen werden kann. Diese eingeschränkte Expression von CD44-Varianten könnte jedoch die Voraussetzung für eine wichtige Rolle in malignen Prozessen, in Analogie zum eingangs beschriebenen Rattensystem, sein.

Tabelle 3

Expression von CD44-Varianten in normalen menschlichen Geweben

Gewebearten	Antikörperspezifität			
	NKI-PI	Anti-CD44	Anti-DIII	Anti-DI
	Anti-CD44s	(v3-v10)	(v6,v7)	(v3,v4)
<b>Hämatolymphoide Gewebe</b>				
Lymphozyten	+	(+)	-	-
Granulozyten	+	-	-	-
Monozyten/Makrophagen	+	(+)	-	-
Erythrozyten	+	-	-	-
Thrombozyten	-	-	-	-
<b>Epitheliale Gewebe</b>				
Keratinocyten	+	+	+	+
Mukosa von Tonsille u. Pharynx	+	+	+	+
Pankreas				
-Gänge	+	+	+	+
-Azini	-	-	-	-
Thyroidea	+	+	+	-
Mamma				
-Gänge	+	-	-	-
-Azini	+	-	-	-
Magen	+	+	+	-
Leber				
-Hepatozyten	-	-	-	-
-Gallengänge	-	-	-	-
Bronchialepithel	+	+	+	+
Nierentuben	-	-	-	-
Urothel	+	+	+	+
Dünndarm				
-Krypten	+	(+)	(+)	-
-Villi	-	-	-	-
Dickdarm				
-Kryptenbasis	+	(+)	(+)	-
-Krypten	-	-	-	-
<b>Andere Gewebe</b>				
Fibroblasten	+	-	-	-
Endothel	+	-	-	-
glatter Muskel	+	-	-	-
Skelettmuskel	-	-	-	-
Gehirn				
-Neuronen	-	-	-	-
-Astrozyten	+	-	-	-
-Mikroglia	+	+	+	-

+: deutliche Expression; (+): schwache Expression; -: keine Expression



**Abb. 8 Expression von CD44-Varianten in normalen menschlichen Geweben**  
 Gefrierdünnschnitte von menschlicher Tonsille (A, B) und von Bronchialepithel (C) wurden immunhistochemisch mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 (A; Verdünnung 1:30), Anti-DIII (C; Verdünnung 1:30) und dem Anti-Standard-CD44-mAk NKI-P1 (B; Verdünnung 1:100) untersucht. Man sieht, daß in der Tonsille nur die epithelialen Zellen mit dem variantenspezifischen polyklonalen Serum reagieren (A), während nach Inkubation mit dem Anti-Standard-CD44-mAk zusätzlich die Lymphozyten angefärbt werden (B). In C ist eine Expression von CD44-Varianten in der Basalschicht des Bronchialepithels zu erkennen. E: Epithel, M: Mantelzone, G: Keimzentrum. Originalvergrößerung 8x (A, B) und 40x (C). Gegenfärbung Hämatoxylin.

### **3.3 Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese**

Kolorektale Tumoren gehören mit zu den am besten untersuchten Tumortypen überhaupt. Aufgrund von histopathologisch gut definierten Stadien der Karzinogenese und intensiver Untersuchung genetischer Veränderungen während dieses Prozesses konnte ein Modell der Tumorentstehung postuliert werden (Fearon und Vogelstein, 1990). Aus dysplastischen Veränderungen der Kolonschleimhaut entstehen benigne Tumoren, sogenannte Adenome oder adenomatöse Polypen. Diese Tumoren wachsen nur lokal begrenzt, sind nicht invasiv und zeigen keinerlei Metastasierung. Die nächste Stufe bilden die Karzinome, die je nach Invasivität und Art der gebildeten Metastasen in verschiedene Stadien eingeteilt werden (Klassifikation nach Dukes (1932): Stadium A: nicht invasiv, auf Mukosa beschränkt; Stadium B: lokal invasiv, keine Metastasen; Stadium C: invasiv mit Befall regionaler Lymphknoten; Stadium D: invasiv mit Ausbildung von Fernmetastasen). Man nimmt an, daß der größte Teil der malignen Tumoren aus bereits existierenden, gutartigen Adenomen hervorgeht. Die Untersuchung einer Vielzahl solcher kolorektaler Tumoren hat ergeben, daß die verschiedenen morphologischen Phänotypen mit einer progressiven Akkumulation genetischer Veränderungen einhergehen, z.B. Mutationen oder Verlust von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen (Fearon und Vogelstein, 1990; siehe auch Abb. 24). Mit den im folgenden beschriebenen Experimenten sollte geklärt werden, inwieweit variante Formen von CD44 im Verlauf dieses Transformationsprozesses exprimiert werden.

#### **3.3.1 Die Expression von CD44-Varianten nimmt im Verlauf der kolorektalen Tumorprogression zu**

68 Gewebeproben von kolorektalen Tumoren (22 adenomatöse Polypen, 38 Karzinome, 8 Lymphknotenmetastasen) und 10 Gewebeproben normaler Kolonschleimhaut wurden immunhistochemisch mit den variantenspezifischen polyklonalen Seren und mAks untersucht (siehe Tabelle 4). Normales Kolonepithel zeigte nur eine sehr schwache, lokal begrenzte Reaktion mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 und den mAks VFF17 (Exon v7) und VFF14 und 16 (Exon v9 oder v10). Diese sehr schwache Reaktion war nur an der Basis der Darmkrypten zu finden, während das restliche Epithel vollkommen negativ war (Abb. 9A).

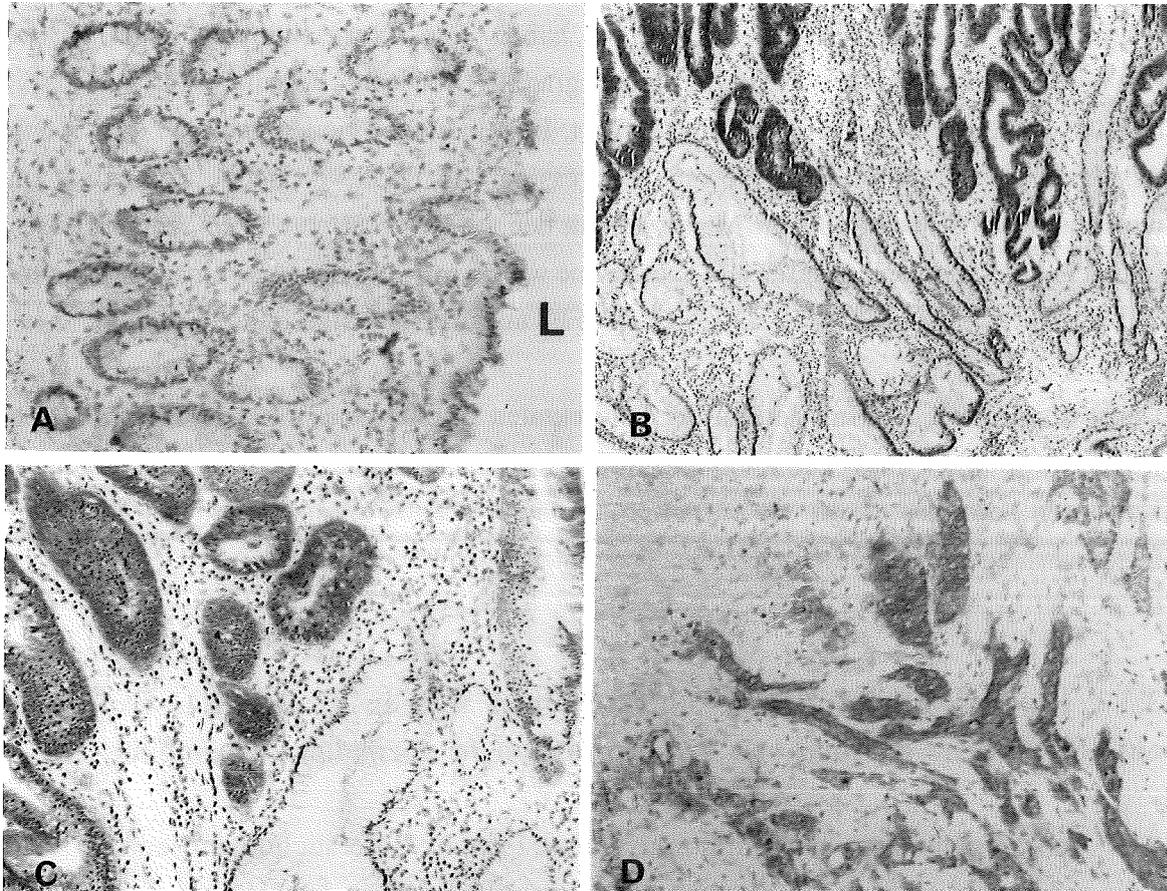
Tabelle 4

## Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese

Stadium	Antikörperspezifität					
	Anti-CD44 v3-v10	VFF11 v3/v4	VFF8 v5	VFF4/7 v6	VFF17 v7	VFF14/16 v9/v10
normales Epithel	10/10 <sup>a</sup>	0/10	0/10	0/10	10/10 <sup>a</sup>	10/10 <sup>a</sup>
frühe Adenome (≤ 1 cm)	11/11	0/11	9/11	1/11 <sup>b</sup>	11/11	11/11
späte Adenome (> 1 cm)	11/11	0/11	11/11	5/11 <sup>b</sup>	11/11	11/11
Karzinome						
- Dukes A	8/8	0/8	8/8	5/8	8/8	8/8
- Dukes B	12/12	0/12	12/12	6/12	12/12	12/12
- Dukes C/D	18/18	0/18	18/18	15/18	18/18	18/18
Lymphknoten- Metastasen	8/8	n.g.	n.g.	8/8	8/8	n.g.

<sup>a</sup> fokale Expression an der Basis der Krypten; <sup>b</sup> überwiegend fokale Expression (weniger als 10% der Tumorzellen positiv); n.g.: nicht getestet

Das Muster der CD44-Expression in kolorektalen Tumoren unterscheidet sich dagegen deutlich von dem in normaler Schleimhaut. Mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 und mit den für die varianten Exons v7 bis v10 spezifischen mAks (VFF14, VFF16, VFF17) konnte eine generelle Zunahme der Expression auf den Tumorzellen im Vergleich zu Zellen der normalen Mukosa beobachtet werden, sowohl was die Stärke der Färbung als auch die Anzahl der positiven Tumorzellen betrifft (Tabelle 4; ein Beispiel ist in Abb. 9C und D gezeigt). Darüberhinaus konnte schon in frühen Stadien der Karzinogenese (in frühen Adenomen) das Auftreten eines neuen Epitopes detektiert werden, das in normaler Kolonschleimhaut nicht exprimiert wird. Bereits 82% aller frühen Adenome zeigten eine deutliche Expression von Exon v5 (nachgewiesen mit dem mAks VFF8; siehe Tabelle 4). In späteren Stadien der kolorektalen Tumorprogression (späte Adenome und Karzinome) konnte eine Expression von Exon v5 enthaltenden Isoformen von CD44 in 100% der Fälle nachgewiesen werden. Interessanterweise gab es eine deutliche Korrelation mit der Expression des varianten Exons v6 (nachgewiesen durch die mAks VFF4 und VFF7) und der fortschreitenden Progression der kolorektalen Tumoren. In 9% der frühen Adenome, 45% der späten Adenome und 68% der Karzinome konnte eine Expression dieses Exons nachgewiesen werden, während in normaler Kolonschleimhaut keine Expression feststellbar war (Tabelle 4). Darüberhinaus zeigte die Expression von Exon v6 eine Korrelation zum Tumorstadium (nach Dukes). Der Anteil der v6-positiven Tumoren betrug im Falle der nicht



### Abb. 9 Expression von CD44-Varianten in kolorektalen Neoplasien

Gefrierdünnschnitte von normaler Kolonschleimhaut (A), einem adenomatösen Polypen (B, C) und einem invasiven kolorektalen Karzinom (D) wurden immunhistochemisch mit den polyklonalen Seren Anti-CD44v3-v10 (A-C) und Anti-DIII (D) untersucht. Während in normaler Magenschleimhaut keine Färbung zu erkennen ist (A), zeigt der adenomatöse Polyp Expression von CD44-Varianten. Diese Expression ist deutlich mit Bereichen fortgeschrittenen Dysplasigrades im Polypen korreliert (B, C). In D ist die Expression von CD44-Varianten auf den invasiven Tumorzellen des Kolonkarzinoms zu sehen. Originalvergrößerung 8x (A, B, D) und 32x (C). L: Darmlumen; Gegenfärbung Hämatoxylin.

metastasierenden Karzinome (Dukes A und B) 55%, während in den metastasierenden Dukes C und D Karzinomen 83% dieses Exon exprimierten (Tabelle 4; ein Beispiel ist in Abb. 9D gezeigt). Diese Zunahme der Expression von Exon v6 enthaltenden CD44-Isoformen im Verlauf der Tumourprogression wurde nicht nur durch eine erhöhte Anzahl VFF4- bzw. VFF7-positiver Fälle, sondern auch durch einen erhöhten Prozentsatz an positiven Tumorzellen innerhalb eines Tumors und stärkerer Expression (Zunahme der Intensität der Färbung) auf den Tumorzellen reflektiert (nicht gezeigt). In den Adenomen war

nur eine fokale Expression von Exon v6 nachzuweisen (weniger als 10% der Tumorzellen positiv), im Gegensatz zu den Karzinomen, die überwiegend eine diffuse Expression (mehr als 10% der Tumorzellen positiv) gezeigt haben. Die Expression von Exon v6 war darüberhinaus mit dem histologischen Tumorgrad der Adenome, der ein Maß für den Grad der Dysplasie des Tumors darstellt, korreliert. In keinem der niedriggradigen (d.h. wenig dysplastischen) Adenome konnte eine Expression von Exon v6 nachgewiesen werden, während 4 von 5 hochgradigen Adenomen mit den mAks VFF4 und VFF7 reagiert haben. In den Lymphknotenmetastasen der Karzinome wurde in 100% der Fälle eine Reaktion mit den Antikörpern Anti-CD44v3-v10, VFF4, VFF7 und VFF17 festgestellt (Tabelle 4).

Damit zeigte sich, daß im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt CD44-Varianten exprimiert werden. Besonders hervorzuheben ist, daß Varianten, die das Exon v6 enthalten, in signifikanter Weise verstärkt in weiter fortgeschrittenen und damit maligneren Tumorstadien zu finden sind.

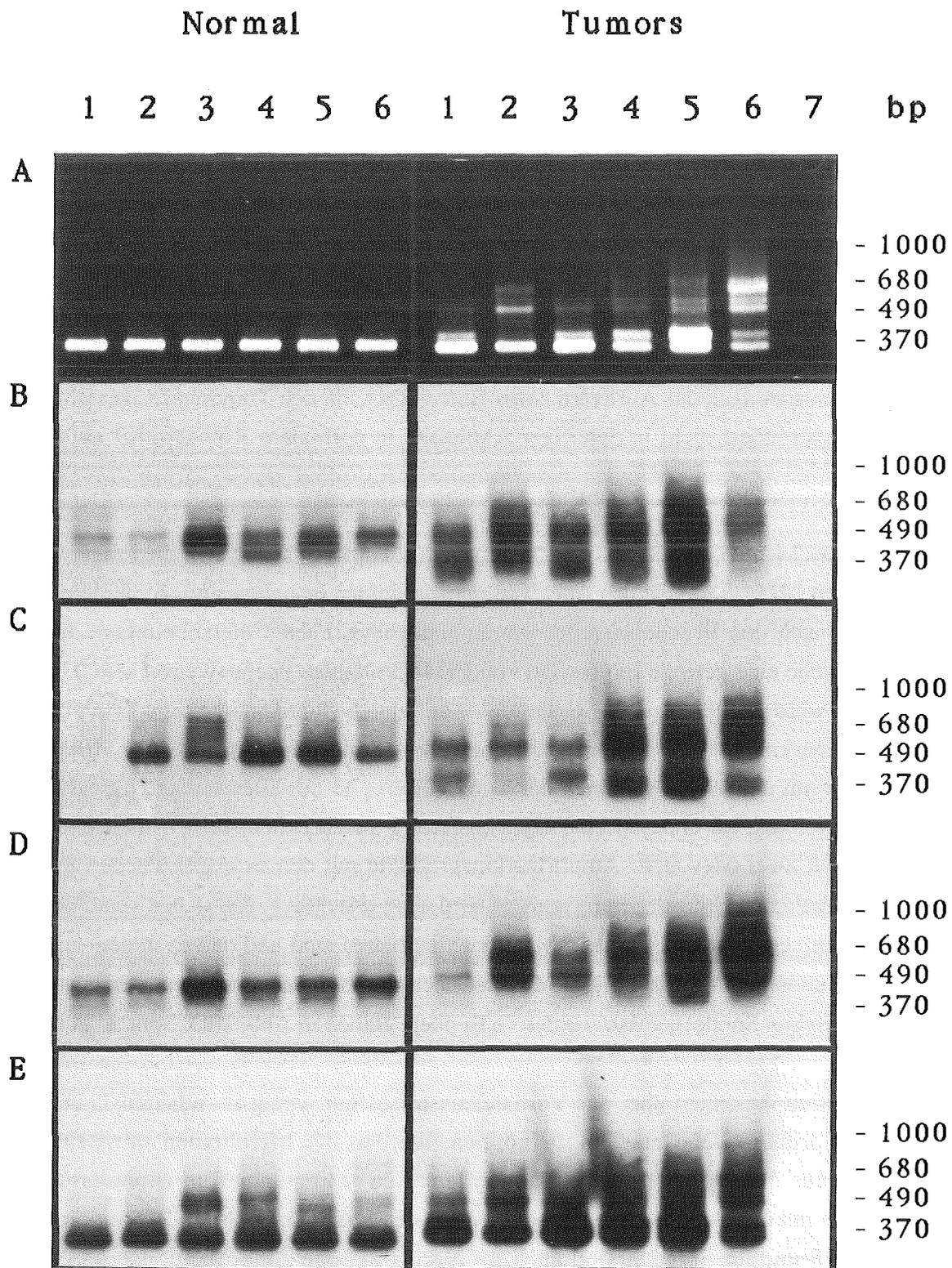
### **3.3.2 Kolorektale Karzinome unterscheiden sich in ihrer CD44-Expression auf RNA-Ebene deutlich von der Expression in normaler Schleimhaut**

Aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen an normaler Kolonschleimhaut und an Kolontumoren wird ersichtlich, daß in den Tumoren im Vergleich zu normaler Mukosa andere CD44-Varianten exprimiert werden (siehe vorhergehendes Kapitel). Dieses Auftreten zusätzlicher Isoformen von CD44 sollte auch auf RNA-Ebene durch das Auftreten neuer bzw. anderer Boten-RNAs nachweisbar sein. Eine Methode zum Nachweis solcher Boten-RNAs in klinischem Probenmaterial stellt die reverse Transkription-PCR Amplifikation von RNA aus solchen Proben dar. Im Gegensatz zur vorhin beschriebenen Methode der Immunhistochemie kann damit zwar nicht das Vorhandensein des Genproduktes auf den Zellen nachgewiesen werden, es ist aber möglich, Information über die Anzahl und Zusammensetzung verschiedener Boten-RNAs eines bestimmten Genes zu erhalten. Im vorliegenden Fall wurde aus je sechs Proben von invasiven Kolonkarzinomen und normaler Kolonschleimhaut gesamtzelluläre RNA isoliert und mittels eines Standard-CD44-spezifischen Oligonukleotids (3'-constant-1, siehe Material und Methoden) revers transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde mittels zweier Oligonukleotide PCR-amplifiziert. Die Oligonukleotide (5'-constant; 3'-constant-2) wurden dabei so gewählt, daß neben der Standard-CD44-cDNA auch cDNAs mit zusätzlich inserierten Sequenzen (also Varianten von CD44) amplifiziert werden. Nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte im Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid ist in allen

untersuchten Proben ein Produkt mit einer Länge von 370 Nukleotiden zu erkennen (Abb. 10A). Diese Bande entspricht der Standard-CD44-cDNA. In allen untersuchten Normalgewebeproben stellt dieses Amplifikationsprodukt die bei weitem häufigste Form dar, nur in Spur 2 und 5 ist schwach ein etwas größeres Amplifikationsprodukt zu erkennen. Im Gegensatz dazu treten bei den Tumorgeweben eine Vielzahl größerer Banden auf, die teilweise sogar die Standard-CD44-cDNA an Intensität übertreffen (z.B. Spur 5 und 6). Die Länge dieser Amplifikationsprodukte reicht von ca. 420 bis 700 Nukleotiden. Dies indiziert, daß in Tumoren im Gegensatz zur normalen Darmschleimhaut eine deutlich erhöhte Expression von CD44-Varianten stattfindet und bestätigt die durch die immunhistochemischen Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse (siehe Kapitel 3.3.1). Darüberhinaus ist auch das Auftreten neuer Boten-RNAs in den Tumoren festzustellen, die nicht oder zumindest nicht in derartiger Abundanz in normalem Kolonepithel exprimiert werden.

Aufgrund des komplexen Expressionsmusters in den Tumoren stellte sich die Frage, welche der varianten CD44-Exons in den Amplifikationsprodukten enthalten sind. Außerdem sollte, zumindest nach den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen, auch im Normalgewebe eine geringe Expression von CD44-Varianten nachzuweisen sein. Um dies abzuklären wurden die Amplifikationsprodukte auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten, CD44-exonspezifischen DNA-Sonden hybridisiert (Abb. 10B-E). In den Spuren mit den PCR-Produkten der Tumor-RNAs ist mit allen variantenspezifischen Sonden (Exon v5, v6 und v9) eine Hybridisierung zu erkennen, in den meisten Fällen hybridisieren zwei oder mehr Amplifikationsprodukte mit den exonspezifischen Sonden. Aus dem erhaltenen Hybridisierungsmuster wird auch ersichtlich, daß in den verschiedenen Transkripten verschiedene Exonkombinationen enthalten sind und daß es in den Tumoren weniger abundante Transkripte gibt, die erst nach der Hybridisierung mit der jeweiligen exonspezifischen Sonde sichtbar werden (z.B. obere Bande in Abb. 10D, Spur 3, Tumors).

Um qualitative Aussagen über das Vorhandensein solcher wenig abundanten Transkripte auch im Normalgewebe machen zu können, wurden die Membranen mit den PCR-Produkten aus den Normalgeweben länger dem Autoradiographiefilm exponiert als die Membranen mit den Amplifikationsprodukten aus den Karzinomen. Nach Expositionszeiten zwischen 18 und 24 Stunden sind auch im Normalgewebe Amplifikationsprodukte mit varianten CD44-Sequenzen zu erkennen. Zusätzlich zu Exon v9 konnte, im Gegensatz zu den immunhistochemischen Untersuchungen, auch eine Expression der varianten Exons v5 und v6 nachgewiesen werden (Abb. 10B-D). Im Gegensatz zu den Tumoren hat in den



**Abb. 10** Kolorektale Tumoren exprimieren andere CD44-Boten-RNAs als normale Kolonschleimhaut

**Legende zu Abb. 10**

Gesamtzelluläre RNA aus Proben normaler Kolonmukosa (Normal 1-6) und kolorektalen Karzinomen (Tumors 1-6) von sechs unterschiedlichen Patienten wurde CD44-spezifisch revers transkribiert (Oligonukleotid 3'-constant-1) und mittels Standard-CD44-spezifischer Oligonukleotide (5'-constant, 3'-constant-2) PCR-amplifiziert. In Spur 7 (Tumors) wurde A. dest. als Negativkontrolle verwendet. Nach 45 Amplifikationszyklen wurden je 10 µl des Ansatzes auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht photographiert (A). Anschließend wurde die DNA auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran transferiert und diese nacheinander mit folgenden radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert: B Exon v5 (Pos. 243-271, Hofmann et al., 1991); C Exon v6 (Pos. 357-482, *ibid.*); D Exon v9 (722-808, *ibid.*); E Standard-CD44 (Pos. 385-744; Stamenkovic et al., 1991). Nach jeder Hybridisierung wurde die Membran einem Autoradiographiefilm exponiert (zwischen drei und 24 Stunden) und anschließend die Radioaktivität mittels einer 0,5%igen SDS-Lösung abgewaschen. bp: DNA-Längenstandard in Basenpaaren.

meisten Fällen nur eines der Amplifikationsprodukte mit den Sonden hybridisiert, was zu einem wesentlich uniformeren Hybridisierungsmuster verglichen mit den Tumoren geführt hat. Alle drei Sonden hybridisieren mit einem Amplifikationsprodukt von ca. 500 Basenpaaren, wobei die unterschiedlichen Intensitäten darauf schließen lassen, daß die nachgewiesenen Exonsequenzen auf verschiedenen Boten-RNAs lokalisiert sind.

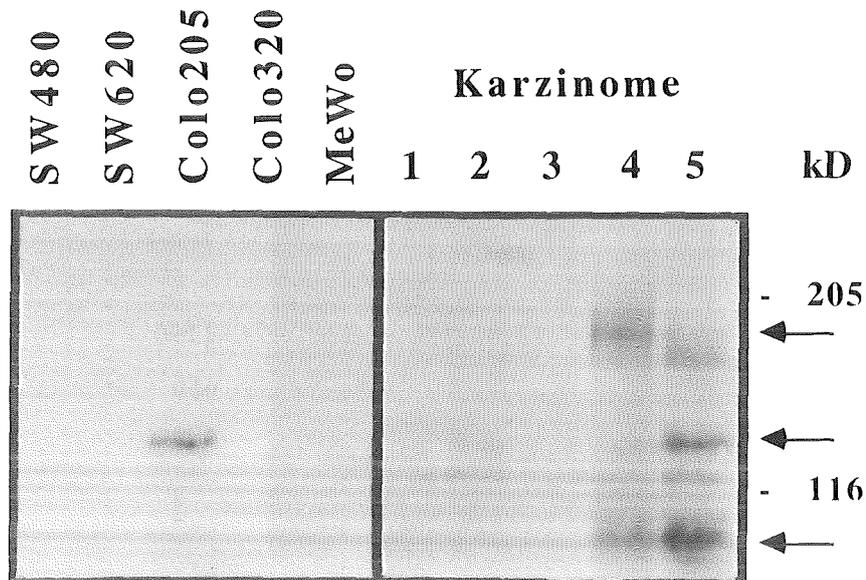
Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, daß die Expression von CD44-RNA in Kolonkarzinomen gegenüber normaler Kolonmukosa nicht nur drastisch erhöht ist, sondern daß auch eine Reihe neuer Spleißvarianten in den Tumoren zu finden ist. Da aber in den RNA-Präparationen immer auch RNA von Nicht-Tumorzellen enthalten ist (z.B. Lymphozyten und Makrophagen) könnte es auch sein, daß zumindest ein Teil der beobachteten Transkripte von solchen Zellen stammt. So wurde gezeigt, daß Lymphozyten nach Aktivierung CD44-Varianten exprimieren (Arch et al., 1992; Koopman et al., 1993). Aus diesem Grunde wurde untersucht, inwieweit die Expression von CD44-Varianten in den Tumorgewebe der in kolorektalen Zelllinien gleicht.

### **3.3.3 Vergleich der Expression von CD44-Varianten in kolorektalen Zelllinien und Karzinomen**

Bereits Untersuchungen von Stamenkovic et al. (1991) haben gezeigt, daß in humanen kolorektalen Zelllinien und in Tumormaterial von Kolonkarzinomen Varianten von CD44 exprimiert werden, die von ihm als "epitheliale" Formen von CD44 bezeichnet wurden. Da zu diesem Zeitpunkt keine Antikörper gegen die varianten Formen von humanen CD44 zur Verfügung standen, konnten diese Untersuchungen nur auf RNA-Ebene durchgeführt

werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Extrakte von fünf verschiedenen kolorektalen Karzinomen, in denen bereits immunhistochemisch die Expression von CD44-Varianten nachgewiesen werden konnte, in einer Western-Analyse mit dem variantenspezifischen polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 untersucht (Abb. 11). Man erkennt, daß drei verschiedene Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 90, 130 und 180 bis 200 kD mit den Antikörpern reagieren (siehe Pfeile in Abb. 11). Die scheinbar negative Reaktion der Extrakte in den Spuren 1 bis 3 ist dadurch erklärbar, daß in diesen Tumoren auch in der Immunhistochemie mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 nur 30 bis 50% der Tumorzellen eine schwache bis mittelstarke Expression von CD44-Varianten gezeigt haben, während in den anderen beiden Tumoren (Spur 4 und 5) 90% der Tumorzellen eine starke Variantenexpression gezeigt haben. Im Vergleich dazu wurden Extrakte von vier verschiedenen Kolonzelllinien untersucht. Nur einer dieser Zellextrakte (aus Colo205-Zellen) zeigte eine positive Reaktion mit den Antikörpern (Abb. 11). Das scheinbare Molekulargewicht von 130 kD stimmt mit dem von einem der drei Proteine überein, die in der Tumorprobe in Spur 5 detektiert wurden. Die mit den Zelllinien erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den RNA-Daten dieser Zelllinien. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in den Zelllinien SW480 und SW620 nur Standard-CD44 exprimiert wird (Hofmann et al., 1991). In der Zelllinie Colo205 konnte mittels reverser Transkription und PCR-Amplifikation variantenspezifische CD44-cDNA nachgewiesen werden, während in Colo320-Zellen nur die Standardform von CD44 nachweisbar war (Abb. 12). Zusammen mit den bereits gezeigten Ergebnissen der kolorektalen Zelllinie HT29, die eine variante Form von CD44 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 180 kD exprimiert (siehe Abb. 4) kann man feststellen, daß nur in einem Teil der untersuchten kolorektalen Zelllinien variante Formen von CD44 exprimiert werden. Die gefundenen Formen stimmen im scheinbaren Molekulargewicht mit CD44-Varianten überein, die in Kolonkarzinomen exprimiert werden. Im Gegensatz zu den Zelllinien, in denen nur jeweils eine Form von variantem CD44 zu finden ist, reagieren in den Tumorextrakten zwei oder drei Proteine mit den Antikörpern, was ein Hinweis auf eine heterogene Expression von CD44-Varianten in Tumoren sein könnte. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse der RNA-Untersuchungen an menschlichem Tumormaterial (siehe vorhergehender Abschnitt) bekräftigt.

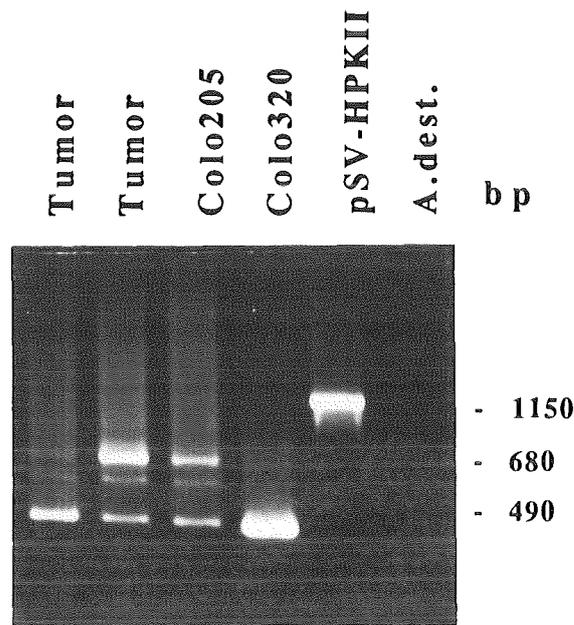
Nach den Ergebnissen der vorangehenden beiden Kapitel würde man vermuten, daß das Expressionsmuster von varianten CD44-Transkripten in Tumormaterial komplexer ist als in Zelllinien, da in den invasiven Karzinomen mehrere variante CD44-Proteine mit verschiedenen scheinbaren Molekulargewichten detektierbar sind und zudem in den meisten Karzinomen eine Vielzahl verschiedener Transkripte nachgewiesen werden kann. Zum



**Abb. 11 Western-Analyse verschiedener kolorektaler Zelllinien und kolorektaler Karzinome**

Je 100  $\mu$ g von Zellextrakten verschiedener kolorektaler Zelllinien wurden zusammen mit Gewebeextrakten aus kolorektalen Karzinomen von fünf verschiedenen Patienten auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Kontrolle zur Identifizierung unspezifischer Kreuzreaktionen wurde ein Zellextrakt der CD44-variantennegativen Zelllinie MeWo verwendet. Als Primärantikörper für die Western-Analyse wurde das CD44-variantenspezifische Serum Anti-CD44v3-v10 (Verdünnung 1:200 nach der Affinitätsreinigung) verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die Reaktion des Serums mit varianten CD44-Proteinen. kD: Molekulargewichtsstandard.

direkten Vergleich der RNA-Expression in invasiven Karzinomen und kolorektalen Zelllinien wurde RNA, die aus den in Abb. 11, Spur 4 und 5 gezeigten Tumoren isoliert wurde, parallel mit RNA aus den Zelllinien Colo205 und Colo320 revers transkribiert und PCR amplifiziert (Abb. 12). Überraschenderweise kann man feststellen, daß das Muster der Amplifikationsprodukte aus den beiden Tumoren und der Zelllinie Colo205 nahezu identisch ist. In allen drei Fällen sind neben der Standardform von CD44 (Bande bei 440 bp) zwei dominante Amplifikationsprodukte mit 650 und 750 Basenpaaren im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel nachweisbar.



**Abb. 12** Kolorektale Karzinome ähneln in ihrer RNA-Expression der Zelllinie Colo205

Gesamtzelluläre RNA aus zwei verschiedenen kolorektalen Karzinomen (identisch mit den in Spur 4 und 5 gezeigten Tumoren von Abb. 11) und PolyA<sup>+</sup>-RNA der Zelllinien Colo205 und Colo320 wurde mittels Oligo-dT Primern revers transkribiert und mit Standard-CD44-spezifischen Oligonukleotiden (5'-constant; 3'-constant-1) PCR-amplifiziert. Als Positivkontrolle wurden 0,05 ng des Plasmides pSV-HPKII verwendet. Nach 45 Amplifikationszyklen wurden je 10 µl des Ansatzes auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht photographiert. bp: DNA-Längenstandard in Basenpaaren.

### 3.3.4 Zusammenfassung

Im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese kommt es zu einer Neu- bzw. Überexpression von varianten Formen von CD44 im Vergleich zur Expression in normaler Kolonschleimhaut. Interessanterweise korreliert dabei die Expression des varianten Exons v6 sowohl mit dem Tumorstadium als auch mit dem histologischen Tumorgrad. Während in frühen Tumorstadien und niedriggradigen Tumoren keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurde eine deutliche Zunahme der Expression in fortgeschritteneren Tumorstadien und höhergradigen Tumorbereichen festgestellt. Eine Zunahme der CD44-Variantenexpression konnte auch auf RNA-Ebene mittels reverser Transkription-PCR Amplifikation nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß in den Tumoren neue variantenspezifische Boten-RNAs transkribiert werden, die in normalem

Kolonepithel nicht exprimiert werden. Der direkte Vergleich von kolorektalen Zelllinien und zwei Kolonkarzinomen hat ergeben, daß die kolorektale Zelllinie Colo205 auf RNA-Ebene stark den zwei Karzinomen ähnelt, jedoch weniger variante CD44-Proteine exprimiert als die beiden Tumoren.

### **3.4 Differentielle Expression von CD44-Varianten in humanen Magenkarzinomen des intestinalen und diffusen Typs und in normaler Magenschleimhaut**

Magenkarzinome gehören mit zu den häufigsten Tumoren weltweit und sind alleine in den Vereinigten Staaten für ein Sechstel aller Krebstoten verantwortlich (Howson et al., 1986; Correa, 1992). Trotz einer leicht zurückgehenden Zahl von Erkrankungen in Mitteleuropa und Nordamerika stellen diese Tumoren immer noch ein beträchtliches gesundheitliches Risiko dar, zumal über ihre Entstehungsursachen relativ wenig bekannt ist. 97% aller Magentumoren sind Adenokarzinome, die man in zwei große histologische Typen untergliedern kann, die Karzinome des intestinalen Typs und des diffusen Typs (Lauren, 1965). In Patienten mit Adenokarzinomen des intestinalen Typs findet man häufig auch eine chronische Gastritis B der Magenschleimhaut und intestinale Metaplasien, die als mögliche Vorstufen von Tumoren angesehen werden (Jida und Kusama, 1982; Jass, 1983; Sipponen et al., 1983). In jüngster Zeit werden auch Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* mit der Entstehung von Karzinomen des intestinalen Typs in Zusammenhang gebracht (Parsonnet et al., 1991; Nomura et al., 1991). Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs gehören überdurchschnittlich oft zur Blutgruppe A, was ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung genetischer Faktoren an der Krebsentstehung sein könnte (Piper, 1978). Das Ziel meiner Arbeit war es, die Expression von CD44-Varianten im Verlauf der Tumorprogression dieser histopathologisch klar zu trennenden Typen von Magenkarzinomen zu untersuchen.

#### **3.4.1 Magenkarzinome exprimieren CD44-Varianten**

Gefrierdünnsschnitte von 42 primären Adenokarzinomen des Magens (17 Fälle des diffusen Typs, 25 Fälle des intestinalen Typs) und 10 Lymphknotenmetastasen (je 5 von Primärtumoren des diffusen und intestinalen Typs) wurden immunhistochemisch mit den variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle untersuchten Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen positiv mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 reagieren (siehe Tabelle 5 und 6). In Abb. 13A und 13B ist ein Beispiel eines Primärtumors mit dazugehöriger Lymphknotenmetastase gezeigt. Die Reaktion mit dem Serum war heterogen sowohl im Hinblick auf die Intensität der Färbung als auch auf den Prozentsatz der positiven Tumorzellen (Tabelle 6). Zwischen 10% und 100% aller Tumorzellen des jeweiligen Präparates zeigten eine Reaktion mit dem Serum Anti-CD44v3-v10, wobei die Anfärbung der Tumorzellen in verschiedenen

Tabelle 5

Expression von CD44-Varianten in Adenokarzinomen des Magens

Tumortyp	Antikörperspezifität					
	αCD44v (v3-v10)	VFF11 (v3/v4)	VFF8 (v5)	VFF4 (v6)	VFF9 (v7)	VFF14 (v9/v10)
Adenokarzinome						
Diffuser Typ	17/17 <sup>a</sup>	0/17	14/17	3/17	0/17	0/17
Intestinaler Typ	25/25	0/25	25/25	23/25	0/25	0/25
Gesamt	42/42	0/42	39/42	26/42	0/42	0/42

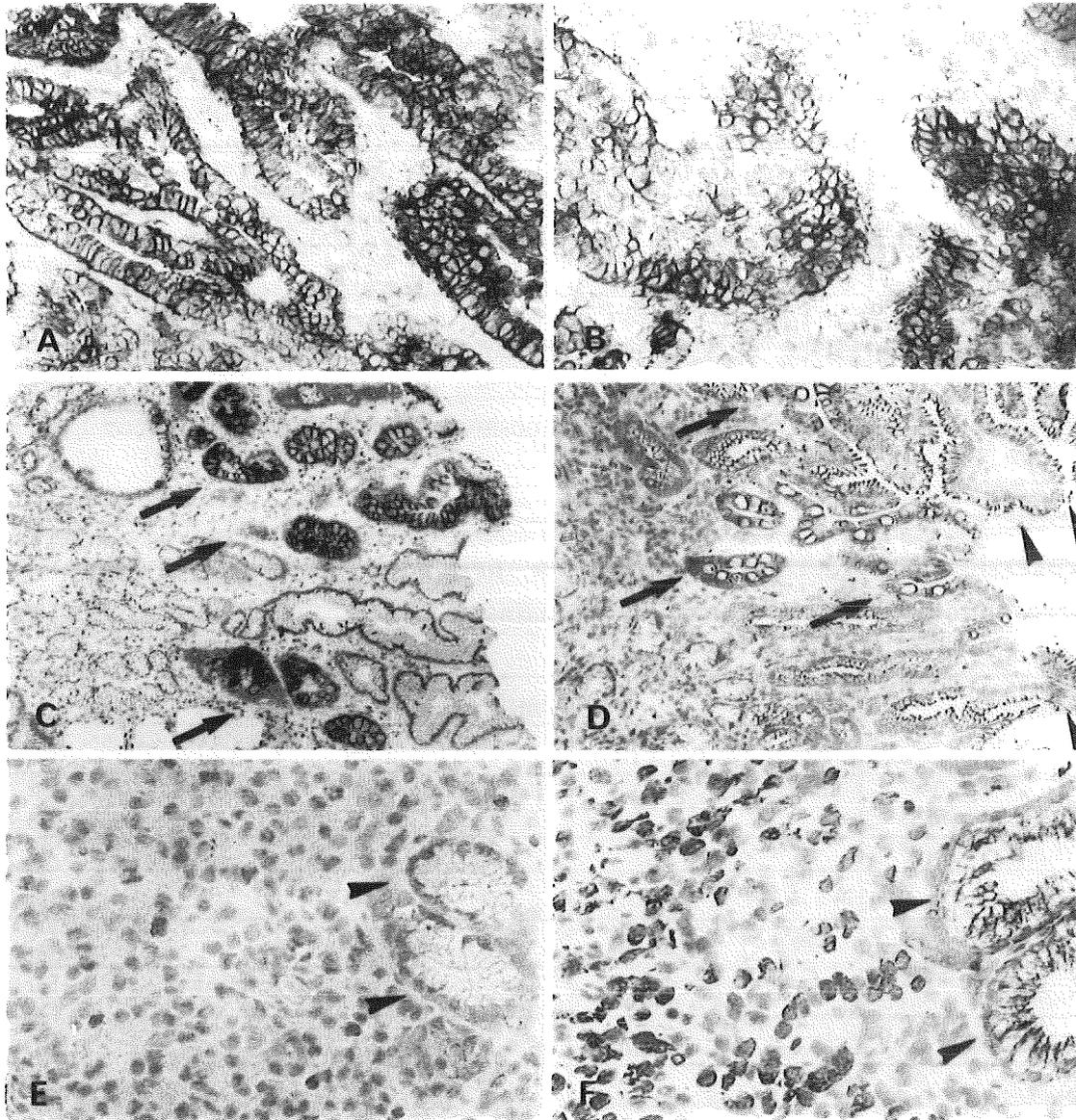
αCD44v = Serum Anti-CD44v3-v10; <sup>a</sup>Anzahl positiver Tumoren/Anzahl getesteter Tumoren

Tabelle 6

Expression von CD44-Varianten in primären Magenkarzinomen und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen

Tumortyp	Antikörperspezifität					
	Anti-CD44v3-v10		VFF8 (Exon v5)		VFF4 (Exon v6)	
	Intensität	Anteil pos. Zellen	Intensität	Anteil pos. Zellen	Intensität	Anteil pos. Zellen
Adenokarzinome						
Diffuser Typ						
645/89 <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup> /100 <sup>d</sup>	++	20/90	-	0/0
12589/89	++	40/50	++	80/90	-	0/0
12924/89	++	70/80	++	40/30	-	0/0
25501/89	++	90/70	++	70/70	++	30/30
33383/89	++	80/30	++	40/20	-	0/0
Intestinaler Typ						
32761/88	++	60/10	+	10/20	+	20/90
33295/88	++	90/10	++	80/60	+	40/40
9891/89	+++	100/80	++	70/70	++	20/5
18352/89	+++	90/90	+++	90/80	++	70/50
9069/90	++	90/90	++	60/60	+	20/80

<sup>a</sup>Die Nummern beziehen sich auf die Primärtumoren und die korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (nicht separat aufgeführt); <sup>b</sup>Intensität der Antikörperreaktion. Da es keine Unterschiede zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase gab, bezieht sich der angegebene Wert auf beide Tumorproben: - negativ, + schwach, ++ mittel, +++ stark; <sup>c</sup>Prozentsatz der positiven Tumorzellen im Primärtumor; <sup>d</sup>Prozentsatz der positiven Tumorzellen in einer Lymphknotenmetastase des gleichen Patienten



**Abb. 13 Expression von CD44-Varianten in Magenkarzinomen und normaler Magenschleimhaut**

Gefrierdünnanschnitte eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms vom intestinalen Typ (nach Lauren) (A) mit dazugehöriger Lymphknotenmetastase (B), von normaler Magenschleimhaut (C und D) und von einem Adenokarzinom des diffusen Typs (E und F) wurden immunhistochemisch mit CD44-variantenspezifischen Antikörpern untersucht. Eine positive Reaktion mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 kann im Karzinom vom intestinalen Typ (A) und der Lymphknotenmetastase (B) beobachtet werden. In normaler Magenschleimhaut mit chronischer Gastritis reagieren die Bereiche mit intestinaler Metaplasie positiv mit den mAks VFF4 gegen das Exon v6 (C, Pfeile) und VFF8 gegen das Exon v5 (D, Pfeile). Mit dem mAk VFF8 ist eine zusätzliche Reaktion mit dem mukoiden Oberflächenepithel zu erkennen (E, Pfeilspitzen). Im Karzinom des diffusen Typs erfolgt keine Reaktion mit dem mAk VFF4 (E), auch normales mukoides Epithel ist negativ (E, Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu reagiert der mAk VFF8 positiv mit den Tumorzellen (F) und dem normalen mukoiden Epithel (F, Pfeilspitzen). Originalvergrößerung 20x (A, B); 8x (C, D); 40x (E, F). Gegenfärbung Hämatoxylin.

Präparaten von mittel bis stark variiert hat (bewertet nach einer 4-stufigen Skala: negativ, schwach, mittel und stark).

Um nun herauszufinden, welche der varianten Exons von CD44 auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert werden, wurden die Tumordünnschnitte mit den exonspezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht. Annähernd alle Tumoren zeigten eine Reaktion mit dem mAk VFF8, der spezifisch für das variante Exon v5 ist (Tabelle 5; Abb. 13F). Im Gegensatz dazu war die Reaktion mit dem mAk VFF4 deutlich eingeschränkt, da nur 26 der 42 Primärtumoren mit diesem mAk reagierten (Tabelle 5). Interessanterweise gehörten 23 der 26 VFF4-positiven Tumoren zur Gruppe des intestinalen Typs, wohingegen 14 der 16 VFF4-negativen Proben Karzinome des diffusen Typs waren (ein Beispiel ist in Abb. 13E zu sehen). Alle anderen verwendeten mAks (VFF11, VFF9, VFF14) zeigten keine Reaktion mit den Tumorzellen, obwohl ihre Reaktivität auf normaler menschlicher Haut überprüft worden war (siehe Abschnitt 3.1.5).

Von 10 Patienten war sowohl der Primärtumor als auch eine Lymphknotenmetastase verfügbar. Fünf dieser Paare gehörten zum intestinalen Typ und fünf zum diffusen Typ. Wie bereits oben erwähnt reagierten sowohl die Primärtumoren als auch die Metastasen positiv mit dem Serum Anti-CD44v3-v10 (Tabelle 6). Alle Tumorpaare färbten auch positiv mit dem Exon v5-spezifischen mAk VFF8. Im Gegensatz dazu reagierte nur eines der Karzinome des diffusen Typs positiv mit dem mAk VFF4 (Exon v6), während alle fünf Paare des intestinalen Typs positiv mit diesem Antikörper reagierten (Tabelle 6). Es wurden keine essentiellen Unterschiede in der Expression der CD44-Varianten zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase beobachtet, sowohl im Hinblick auf die Stärke der Expression als auch auf den Prozentsatz der positiven Tumorzellen. Dies gilt besonders auch für die Lymphknotenmetastasen der VFF4 (Exon v6)- negativen Primärtumoren des diffusen Typs, die genauso wie der Primärtumor keine Reaktion mit diesem Antikörper gezeigt haben (Tabelle 6).

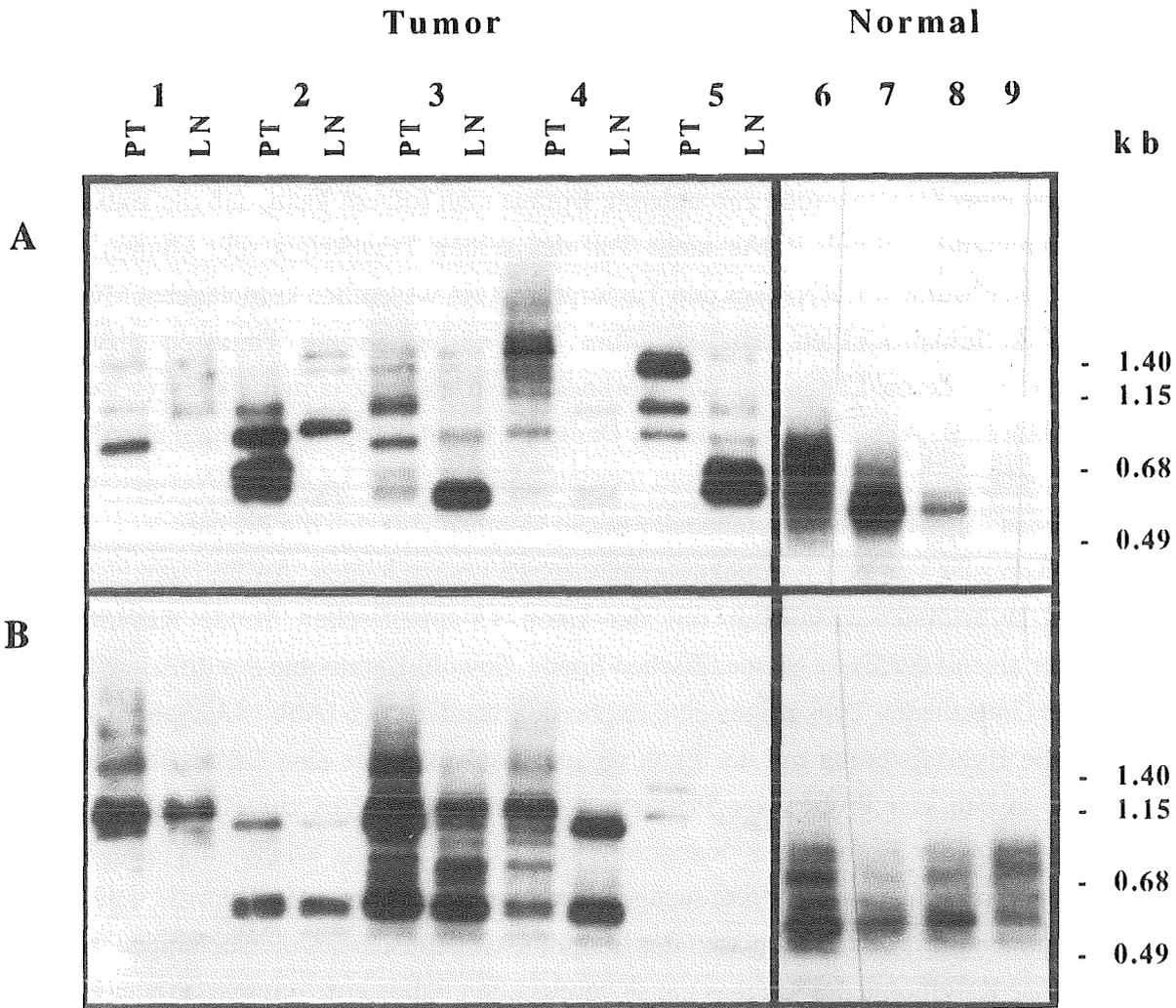
### **3.4.2 Normale Magenschleimhaut zeigt eine eingeschränkte Expression von CD44-Varianten**

Um herauszufinden, ob die Expression von CD44-Varianten in den Magenkarzinomen das Ergebnis eines Transformationsprozesses ist oder ob CD44-Varianten schon in normaler Magenschleimhaut exprimiert werden, wurden Gefrierdünnschnitte normaler Magenmukosa von 12 verschiedenen Patienten immunhistochemisch untersucht. Tatsächlich findet man

auch in normaler Schleimhaut eine eingeschränkte Expression von CD44-Varianten. Mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 und dem mAk VFF8 (Exon v5) wurde eine positive Reaktion mit Zellen des mukoiden Oberflächenepithels, in der foveolären Proliferationszone und in Bereichen mit intestinaler Metaplasie beobachtet (Abb. 13D). Letztere Bereiche reagierten auch positiv mit dem mAk VFF4 (Exon v6), während andere Bereiche der Magenschleimhaut keine Anfärbung gezeigt haben (Abb. 13C). Alle anderen mAks (VFF11, VFF9, VFF14) zeigten keine Reaktion mit normaler Mukosa. Somit wird in definierten Bereichen normaler Magenschleimhaut eine Variante von CD44 exprimiert, die, in Analogie zu den Karzinomen des diffusen Typs, das variante Exon v5 enthält. In Bereichen intestinaler Metaplasien jedoch konnte die Expression der varianten Exons v5 und v6 nachgewiesen werden, die auch in Karzinomen des intestinalen Typs exprimiert werden. Dieses Ergebnis würde dafür sprechen, daß die unterschiedlichen Tumortypen aus verschiedenen Populationen normaler Zellen entstehen, die dieses Expressionsmuster für variantes CD44 zeigen und es während der Tumorgenese aufrecht erhalten.

### **3.4.3 Magenkarzinome unterscheiden sich dramatisch in der Expression varianter CD44-Boten-RNAs gegenüber normaler Magenschleimhaut**

Nach den Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen stellte sich die Frage, inwieweit sich diese scheinbare Übereinstimmung der Expression von CD44-Varianten auch auf der RNA-Ebene widerspiegelt. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde gesamtzelluläre RNA aus primären Tumormaterial, Lymphknotenmetastasen und normaler Magenschleimhaut isoliert, revers transkribiert und PCR-amplifiziert (siehe Material und Methoden). Als Primer für die cDNA-Synthese wurde ein Oligo-dT-18mer verwendet, für die PCR-Amplifikation die bereits beschriebenen Oligonukleotide 5' und 3' der potentiellen Insertionsstelle der varianten Exonsequenzen (5'-constant; 3'-constant-1). Nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte im Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde in allen Proben im wesentlichen eine dominante Bande festgestellt, die der Standardform der CD44-RNA entspricht (nicht gezeigt). Zur Charakterisierung weniger abundanter Amplifikationsprodukte wurden diese auf eine Nylonmembran transferiert und mit exonspezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Hybridisierung mit einer Exon v5- bzw. Exon v6-spezifischen Sonde ergab in allen untersuchten Gewebeproben Expression variantenspezifischer RNAs (Abb. 14). Darüberhinaus war ein deutlicher Unterschied in der Variantenexpression zwischen Tumor- und Normalgeweben zu erkennen, sowie zwischen den verschiedenen Tumorproben untereinander.



**Abb. 14 Normale Magenschleimhaut exprimiert andere CD44-Spleißvarianten als Magenkarzinome**

Southern-Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten von vier individuellen Proben normaler Magenschleimhaut (6-8: Korpus-Region; 9: Andrum-Region), vier Proben von primären Adenokarzinomen des intestinalen Typs (PT) mit den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (LN) (1-4) und von einem primären Adenokarzinom des diffusen Typs (PT) mit zugehöriger Lymphknotenmetastase (LN) (5). Für die PCR-Amplifikation mit Standard-CD44-spezifischen Oligonukleotiden (5'-constant; 3'-constant-1) wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und revers transkribiert (mit Oligo-dT Primern). Die Qualität und Abundanz der cDNA wurde mittels GAPDH-PCR überprüft (nicht gezeigt). Nach 36 Amplifikationszyklen wurden je 10 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran transferiert. Die Filter wurden dann hintereinander mit einer Exon v5- (A) und Exon v6- (B) spezifischen Sonde hybridisiert (siehe auch Abb. 10) und einem Autoradiographiefilm exponiert. kb: DNA-Längenstandard in Kilobasenpaaren.

Mit RNA aus zehn der zwölf Proben normaler Magenmukosa, die bereits immunhistochemisch untersucht wurden (siehe vorhergehenden Abschnitt), ergab sich ein Hybridisierungsmuster von je zwei Banden mit der Exon v5- bzw. Exon v6-spezifischen Sonde (vier repräsentative Beispiele sind in Abb. 14A und B zu sehen). Die relative Intensität der Hybridisierung mit den zu Exon v5 und v6 homologen Sonden variierte deutlich von einer Gewebeprobe zur anderen, woraus man folgern kann, daß die Exon v5 und v6 enthaltenden Boten-RNAs nicht Teil des selben Transkripts sein können. Im Gegensatz dazu wurde mit RNA aus den Tumورproben ein wesentlich komplexeres Muster an Amplifikationsprodukten erhalten. Zum Teil enthielten die Tumoren größere Spleißvarianten, deren Länge auf das Vorhandensein aller varianten Exons (v3-v10) schließen läßt (z.B. Abb. 14A, Spur 4 PT). Derartige CD44-Varianten konnten allerdings immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4.1). Ein Vergleich der verschiedenen Tumورproben untereinander macht sichtbar, daß sich die Primärtumoren im Expressionsmuster von den Lymphknotenmetastasen unterscheiden. Auffälligerweise ist dabei das Hybridisierungsmuster mit der Exon v5-spezifischen Sonde wesentlich heterogener als mit der Exon v6-spezifischen Sonde. Sowohl Karzinome des diffusen Typs als auch des intestinalen Typs zeigen eine Expression von Exon v5 (Abb 14A, Spuren 1-5), während die Hybridisierung mit der Exon v6-spezifischen Sonde eine Expression dieses Exons nur in den vier Proben der Tumoren des intestinalen Typs aufzeigt (Abb. 14B, Spuren 1-4). In der Probe eines Karzinoms des diffusen Typs konnte nur eine sehr schwache Expression von Exon v6 nachgewiesen werden (Abb. 14B, Spur 5). Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen, nach denen diffuse Karzinome des Magens nur in vereinzelten Fällen eine Expression von Exon v6 gezeigt haben.

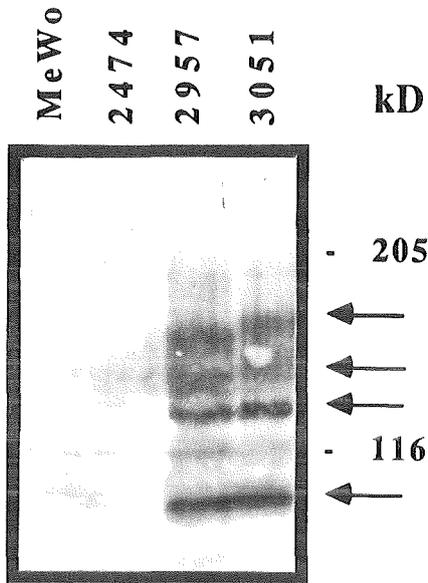
Damit haben die RNA-Analysen gezeigt, daß die Tumorgewebe ein wesentlich komplexeres Muster an varianten CD44-Boten-RNAs exprimieren als das Normalgewebe. Es muß jedoch angemerkt werden, daß die RNA-Präparationen heterogen im Hinblick auf den Inhalt verschiedener Zelltypen im Probenmaterial waren (siehe auch Kapitel 3.3.2). So findet man in Tumorgeweben neben Tumorzellen auch Lymphozyten, Makrophagen und mesenchymale Zellen, die alle zu dem beobachteten komplexen Boten-RNA-Muster beitragen können. Aus diesem Grunde wurden aus Magentumoren etablierte Zelllinien untersucht um festzustellen, ob die beobachteten Unterschiede in den klinischen Tumورproben auch in verschiedenen Zelllinien klonalen Ursprungs nachgewiesen werden können.

#### 3.4.4 Expression von CD44-Varianten in Magenkarzinomzelllinien

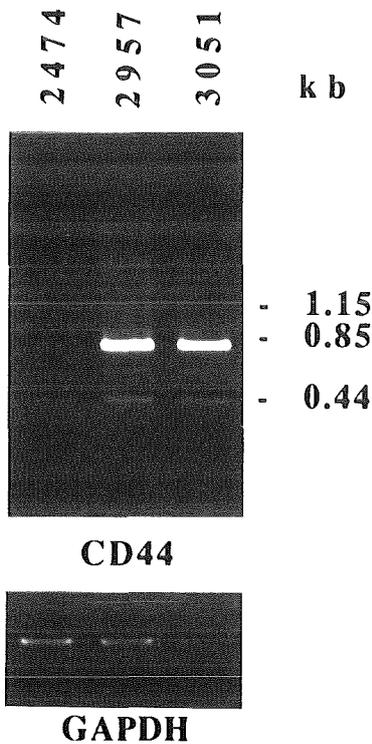
Drei erst kürzlich aus Adenokarzinomen des Magens etablierte Zelllinien (Vollmers et al., 1993) wurden für die Untersuchung der Expression von CD44-Varianten verwendet. Zwei dieser Linien (2957, 2474) wurden aus einer Lymphknotenmetastase eines Karzinoms des intestinalen Typs isoliert, die Dritte (3051) aus einem Primärtumor. Die beiden Linien 2957 und 3051 zeigen eine deutliche Expression von varianten CD44-Proteinen mit einem Molekulargewicht von 90 bis 180 kD in einer Western-Analyse mit dem Serum Anti-CD44v3-v10 (Abb. 15). Die Zelllinie 2474 unterscheidet sich nur unwesentlich von MeWo-Zellextrakten, die als Negativkontrolle zur Identifizierung unspezifischer Reaktionen des Antikörpers verwendet wurde. MeWo-Zellen exprimieren, wie bereits früher gezeigt wurde (Hofmann et al., 1991), nur die Standardform von CD44. Reverse Transkription und PCR-Amplifikation bestätigten das in der Western-Analyse erhaltene Ergebnis. Während in den Zelllinien 2957 und 3051 neben einem Amplifikationsprodukt mit einer Länge von 0,44 kb (entspricht der Standardform von CD44) eine abundante Bande mit einer Länge von 0,85 kb nachgewiesen werden kann, ist mit 2474-cDNA neben der 0,44 kb Bande nur andeutungsweise eine Bande bei 0,85 kb zu erkennen (Abb. 16). Mit MeWo-cDNA konnte nur die Standard-CD44-Bande amplifiziert werden (nicht gezeigt). Nach Transfer der Amplifikationsprodukte auf eine Nylon-Membran und Hybridisierung mit variantenspezifischen DNA-Sonden konnten zwar auch in der Zelllinie 2474 variante CD44-Transkripte nachgewiesen werden, doch waren diese sehr viel weniger abundant als in den beiden anderen Zelllinien (Abb. 17). Außerdem ist ersichtlich, daß neben dem dominanten Amplifikationsprodukt von 0,85 kb noch viele weitere Transkripte vorhanden sind, wobei die beiden Zelllinien 2957 und 3051 wiederum ein identisches Muster (mit Ausnahme von Intensitätsunterschieden) gezeigt haben. Die Verwendung der exonspezifischen Sonden läßt dabei den Schluß zu, daß sowohl die varianten Exons v5 und/oder v6 und v8 bis v10 exprimiert werden.

Zum Nachweis der Oberflächenexpression der varianten CD44-Moleküle wurden die verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen variantenspezifischen mAks und dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 inkubiert, mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper markiert und unter UV-Licht ausgewertet. Alle Magenkarzinomzelllinien zeigten eine Reaktion mit dem Serum Anti-CD44v3-v10 und den mAks VFF7 und VFF8 (Beispiele siehe Abb. 18). Der mAk VFF9 (Exon v7) hat nur sehr schwach mit den Zelllinien 2474 und 3051 reagiert, mit der Zelllinie 2957 war keine Fluoreszenz zu beobachten. Der mAk VFF11 reagierte nicht mit den drei Zelllinien (nicht gezeigt). Mit dem mAk Hermes 3,

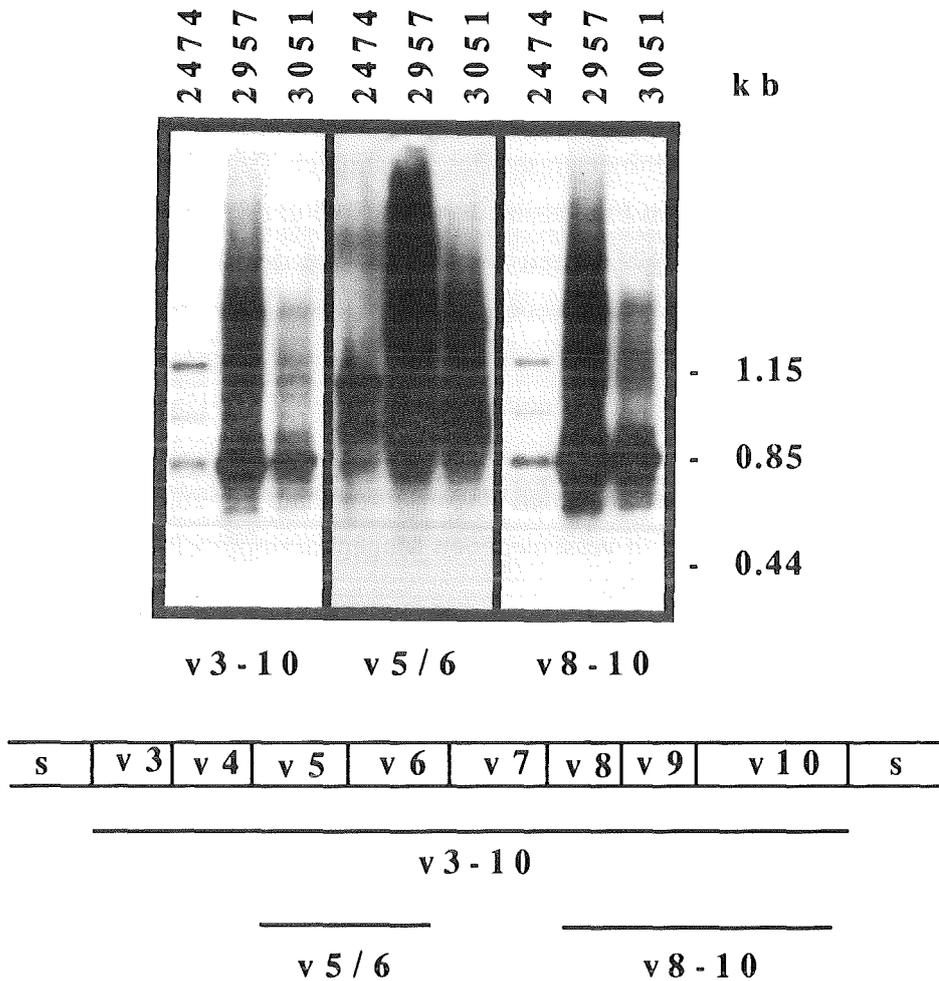
der ein Epitop im Standardanteil des CD44-Moleküls erkennt, wurde in allen drei Fällen eine starke Reaktion mit Membranproteinen beobachtet (nicht gezeigt).



**Abb. 15 Magenkarzinomzelllinien exprimieren variante CD44-Proteine**  
Western-Analyse verschiedener Magenkarzinomlinien mit dem CD44-variantenspezifischen Serum Anti-CD44v3-v10 (nach Affinitätsreinigung; Verdünnung 1:200). Zur Identifizierung unspezifischer Reaktionen des Serums wurde die CD44-variantenneegative Melanomzelllinie MeWo verwendet. Je 100 µg der Zellextrakte wurden auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt. Die Pfeile indizieren variante CD44-Proteine. kD: Proteinmolekulargewichtsstandard in Kilo-dalton.



**Abb. 16 Magenkarzinomzelllinien exprimieren mehr variante CD44-Transkripte als Standard-CD44-Transkripte**  
Reverse Transkription-PCR Amplifikation von CD44-Transkripten in Magenkarzinomzelllinien. PolyA<sup>+</sup>-RNA aus den indizierten Zelllinien wurde revers transkribiert und mit Standard-CD44-spezifischen Oligonukleotiden PCR-amplifiziert (siehe auch Abb. 14). Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die GAPDH-spezifischen PCR-Amplifikationsprodukte der gleichen cDNA-Proben.

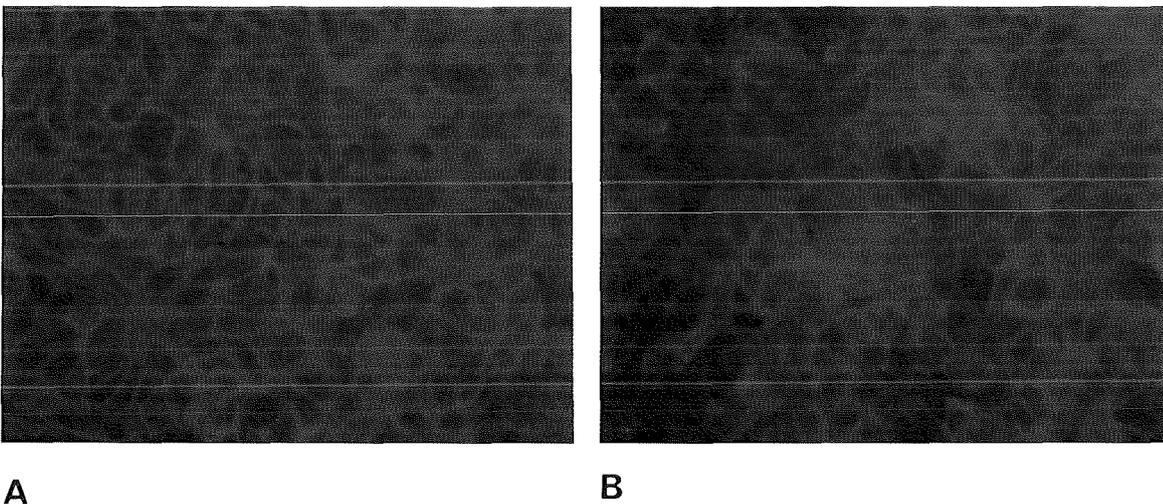


**Abb. 17 Magenkarzinomzelllinien exprimieren unterschiedliche variante CD44-Transkripte**

Southern-Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten verschiedener Magenkarzinomzelllinien (siehe Abb. 16). Nach der Auftrennung auf einem 1,2%igen Agarosegel wurden die Amplifikationsprodukte auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran transferiert und diese nacheinander mit den exonspezifischen Sonden v3-10, v5/6 und v8-10 hybridisiert. Im unteren Bereich der Abbildung ist die Lokalisation der Sonden schematisch dargestellt. kb: DNA-Längenstandard in Kilobasenpaaren; s: Standardanteil des CD44-Moleküls.

### 3.4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, daß in Magenkarzinomen eine deutliche Expression von CD44-Varianten stattfindet. Dabei zeigen primäre Karzinome des diffusen Typs und korrespondierende Lymphknotenmetastasen ein anderes Expressionsmuster als Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des intestinalen Typs. In letzteren konnte in fast allen untersuchten Proben die Expression der Exons v5 und v6 nachgewiesen werden, während in der überwiegenden Mehrheit der Karzinome des diffusen Typs nur eine Expression von Exon v5 nachgewiesen werden konnte. Diese Unterschiede wurden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gefunden. Eine begrenzte Expression solcher CD44-Varianten ist auch in normaler Magenschleimhaut zu finden. RNA-Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß es zu einer deutlichen Zunahme von variantenspezifischen Boten-RNAs in den Tumoren gegenüber normaler Magenschleimhaut kommt. Diese Vielfalt von CD44-Transkripten konnte auch in verschiedenen Magenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden.



**Abb. 18 Magenkarzinomzelllinien exprimieren CD44-Varianten auf ihrer Oberfläche**  
Immunfluoreszenzanalyse der Magenkarzinomzelllinie 2957 (A) und 3051 (B) mit den variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern Anti-CD44v3-v10 (A) und VFF7 (B). In beiden Fällen ist eine Membranfluoreszenz der Tumorzellen zu erkennen. Originalvergrößerung 40x.

### 3.5 Expression von CD44-Varianten in Brusttumoren

Derzeit erkrankt jede 8. bis 10. Frau in westlichen Ländern an einem Mammakarzinom und die Inzidenz ist weiter steigend (Special Report, Science, 1993). Damit ist dieses Karzinom der häufigste bösartige Tumor bei Frauen und nach dem Bronchialkarzinom der am häufigsten zum Tode führende Tumor überhaupt. Mammakarzinome sind charakterisiert durch eine frühe Bildung von Mikrometastasen und eine ausgesprochen große Heterogenität. Zur genauen Einschätzung des individuellen Rezidiv- und Todesrisikos gibt es bisher kein verlässliches Verfahren, es werden vor allem histopathologische Größen wie die Tumorgroße oder der axilläre Lymphknotenstatus zur Beurteilung herangezogen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob in Mammakarzinomen CD44-Varianten exprimiert werden und ob eine solche Expression gegebenenfalls als prognostischer Parameter benutzt werden kann.

#### 3.5.1 Expression von CD44-Varianten in normalem Brustgewebe und benignen Läsionen der Mamma

Die Expression von CD44-Varianten wurde immunhistochemisch an Gefrierschnitten von normalem Mammagewebe, fibrös-zystischen Mastopathien und Fibroadenomen untersucht. Die Intensität der Färbung wurde auf einer 5-stufigen Skala mit 0 bis 4 bewertet, wobei Werte von 0 und 1 als keine Expression und Werte von 2 bis 4 als positive Expression eingestuft wurden. Im normalen, luminalen Epithel der Gänge und Lobuli war keine Reaktion der Antikörper Anti-CD44v3-v10, Anti-DI, Anti-DIII, VFF7, VFF8 und VFF16 zu erkennen (Tabelle 7; Abb. 19A, B). Mit dem mAk VFF17 konnte eine lokal begrenzte Expression nachgewiesen werden (Tabelle 7, Abb. 19C). Im Gegensatz dazu zeigten die Myoepithelien (sowohl duktal als auch lobulär) eine Reaktion mit den genannten Antikörpern mit Ausnahme des mAk VFF16 (Tabelle 7, Abb. 19A-C). Die Intensität der Färbung war dabei heterogen und teilweise lokal begrenzt (mit dem Serum Anti-DI und den mAks VFF7 und VFF17; siehe Tabelle 7 und Abb. 19C). Der Antikörper VFF9 reagierte weder mit dem luminalen Epithel noch mit dem Myoepithel des Normalgewebes und wurde im folgenden als Kontrollantikörper verwendet (Abb. 19D).

In zwei Fibroadenomen der Mamma, die eine gutartige, echte Mischgeschwulst mit einer epithelialen und einer mesenchymalen Tumorkomponente darstellen, konnte eine schwache Expression des varianten CD44-Exons v7 (mAk VFF17) festgestellt werden, alle anderen Antikörper zeigten keine Reaktion (Abb. 20C). Die Myoepithelien reagierten analog wie im Normalgewebe (Abb. 20A, B).

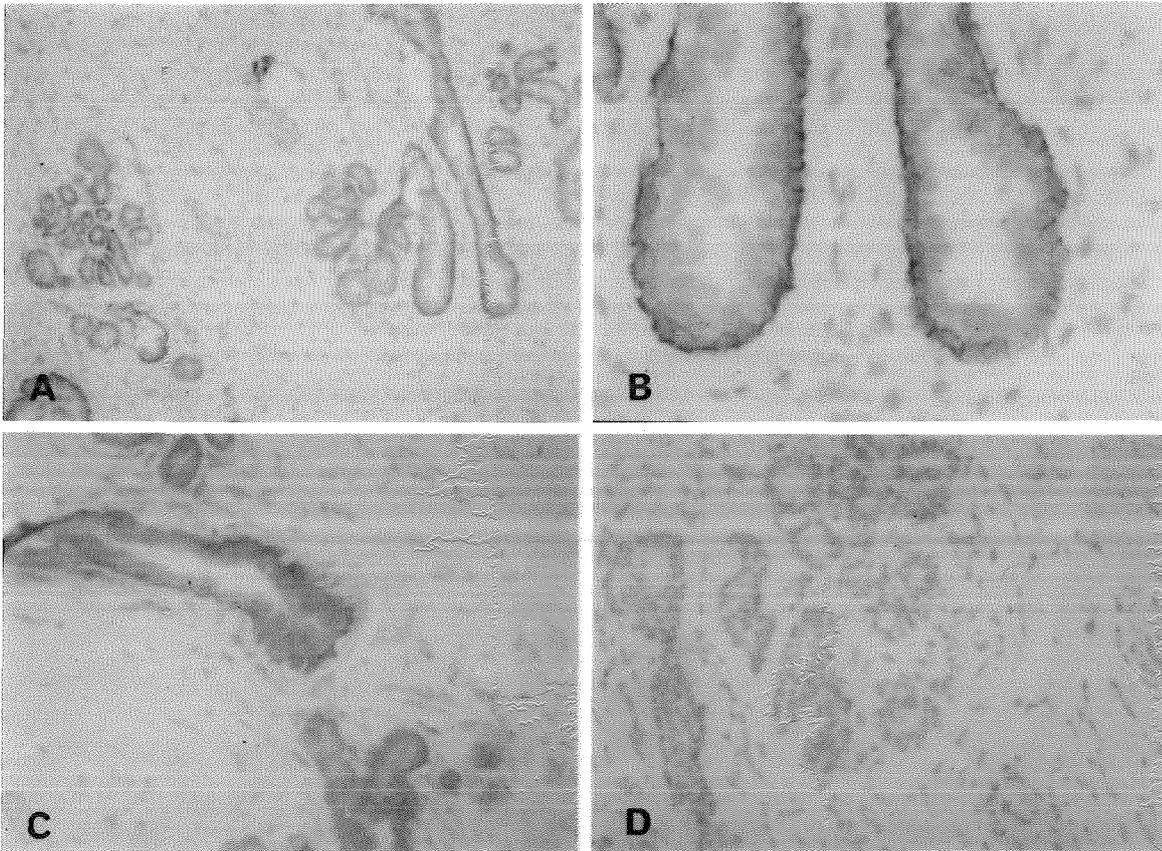
Tabelle 7

**Expression von CD44-Varianten in normalem Brustgewebe und hyperplastischem Epithel**

Antikörperspezifität	Gewebetyp		
	luminal.Epithel lobulär/ ductal	Myoepithel	Epithel hyperplastisch
polyklonale Seren			
Anti-CD44v3-v10	-	+	(+)
Anti-DI (Exon v3/v4)	-	(+)	-
Anti-DIII (Exon v 6/v7)	-	+	(+)
monoklonale Antikörper			
VFF8 (Exon v5)	-	+	(+)
VFF7 (Exon v6)	-	(+)	(+)
VFF9 (Exon v7)	-	-	-
VFF 17 (Exon v7)	(+)	(+)	+
VFF16 (Exon v9/v10)	-	-	(+)

-: keine Expression; (+): schwach und/ oder fokal positiv; +: positiv

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung von acht Fällen mit zystisch-fibröser Mastopathie, einer ebenfalls benignen Erkrankung der weiblichen Brustdrüse, bei der Atrophie, Hyperplasie und Metaplasie des Gewebes mit unterschiedlicher Ausprägung vorkommen können. Während augenscheinlich normales luminales Epithel und das Myoepithel das gleiche Reaktionsmuster mit den verwendeten Antikörpern wie normales Mammagewebe zeigten, konnte in hyperplastischen Epithelien eine deutlich andere Expression von CD44-Varianten festgestellt werden (Tabelle 7). Sowohl mit den polyklonalen Seren Anti-CD44v3-v10 und Anti-DIII als auch mit den mAks VFF7, VFF8, VFF16 und VFF17 konnte eine Expression nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Antikörperreaktion mit dem Grad der Hyperplasie des luminalen Epithels korrelierte (Ein Beispiel ist in Abb. 20D dargestellt).

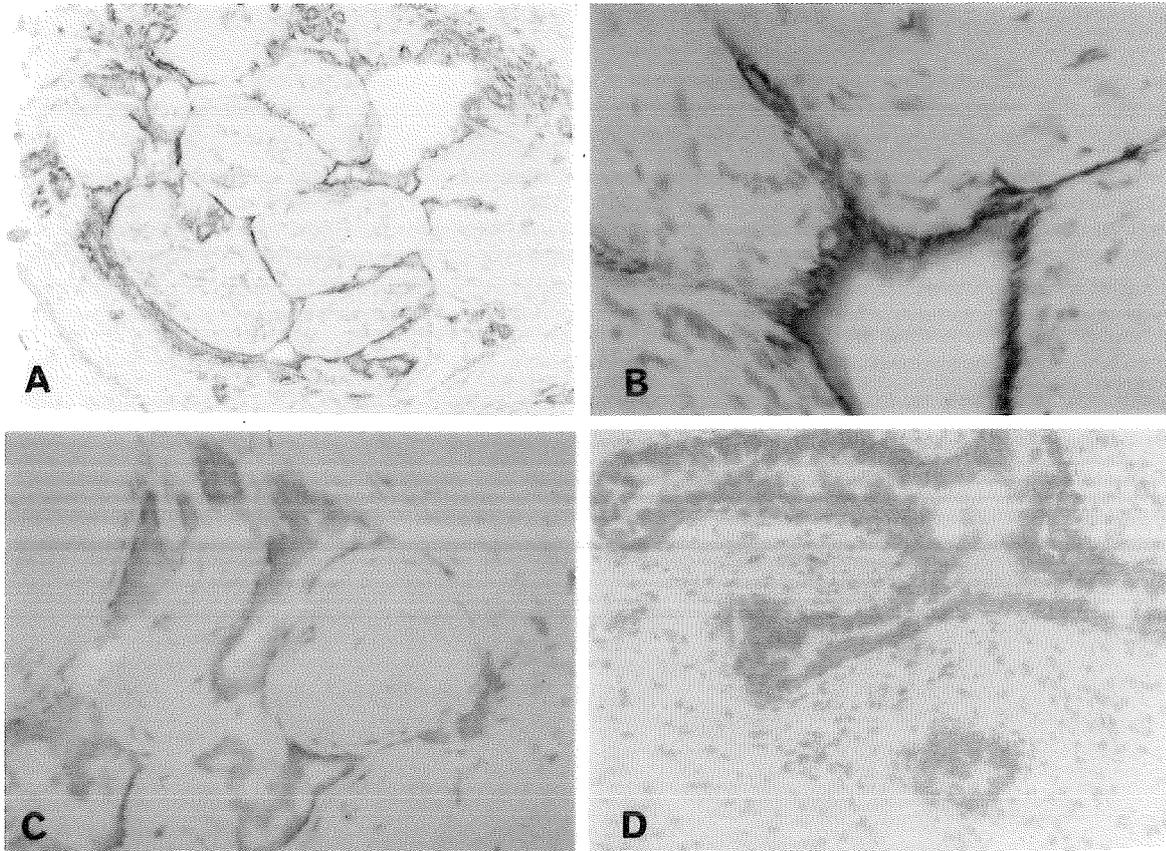


**Abb. 19 Expression von CD44-Varianten in normalem Mammagewebe**

Immunhistochemische Analyse von Gefrierdünnschnitten normalen Brustgewebes mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 (A, B) und den mAbs VFF17 (C) und VFF9 (D). Eine Reaktion der Antikörper Anti-CD44v3-v10 und VFF17 mit dem Myoepithel, nicht jedoch mit dem luminalen Epithel, ist deutlich zu erkennen. Originalvergrößerung 10x (A), 20x (C, D) und 40x (B). Gegenfärbung Hämatoxylin.

**3.5.2 Expression von CD44-Varianten in *in situ*-Karzinomen der Mamma**

Bei *in situ*-Karzinomen der Mamma handelt es sich um Tumoren, die entweder intraduktal oder intralobulär wachsen können. Aufgrund ihres nicht invasiven Charakters werden sie als benigne eingestuft. In vielen Patientinnen ist neben dem *in situ*-Anteil auch eine invasive Komponente des Tumors nachzuweisen, was zu der Annahme geführt hat, daß es sich bei *in situ*-Karzinomen um echte Vorstufen von malignen Tumoren handelt. Andererseits gibt es jedoch Patientinnen, bei denen diese *in situ*-Tumoren eine beachtliche Größe erreichen, aber weder eine Invasion in das umgebende Gewebe noch eine Metastasierung festgestellt werden kann.



**Abb. 20 Expression von CD44-Varianten in einem Fibroadenom und in hyperplastischem luminalen Epithel**

Immunhistochemische Analyse eines benignen Fibroadenoms der Mamma und von hyperplastischem luminalen Epithel in einer Patientin mit zystisch-fibröser Mastopathie. Im Fibroadenom ist eine Reaktion des Myoepithels mit den Antikörpern VFF7 (A, 10x), Anti-CD44v3-v10 (B, 40x) und VFF17 (C, 20x) zu sehen. Das hyperplastische Epithel reagiert positiv mit dem polyklonalen Serum Anti-DIII (D, 20x). Gegenfärbung Hämatoxylin.

Im vorliegenden Fall wurden 16 verschiedene Fälle von *in situ*-Karzinomen der Brust immunhistochemisch auf die Expression von CD44-Varianten untersucht. Es handelte sich dabei um vier Fälle von reinen *in situ*-Karzinomen des duktaalen Typs (CDIS), um zwei Fälle von reinen *in situ*-Karzinomen des lobulären Typs (CLIS) und um 10 Fälle von Tumoren mit einer zusätzlichen invasiven Komponente (IDK+CDIS). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zeigten, daß es keinen signifikanten Unterschied zwischen den reinen *in situ*-Karzinomen vom duktaalen und lobulären Typ gibt. In fast allen Fällen konnte eine deutliche Expression der varianten Exons v3, v5 bis v7 und v9/v10 nachgewiesen werden (Tabelle 8, Abb. 21A). In den Fällen, in denen sowohl ein invasiver als auch ein *in situ*-Anteil im gleichen Präparat vorhanden war, konnte kein deutlicher

Unterschied in der Expression von CD44-Varianten in den beiden verschiedenen Tumoranteilen festgestellt werden (Abb. 21B-D). Auffallend war, daß deutlich weniger Tumorproben mit dem mAk VFF16 (Exons v9/v10) reagiert haben als im Vergleich zu den reinen *in situ*-Karzinomen (Tabelle 8). Die Expression der CD44-Varianten war bisweilen sehr heterogen, sowohl in den invasiven Anteilen des Tumors als auch in der *in situ*-Komponente (Abb. 21D).

**Tabelle 8**  
**Expression von CD44-Varianten in *in situ*-Karzinomen der Mamma**

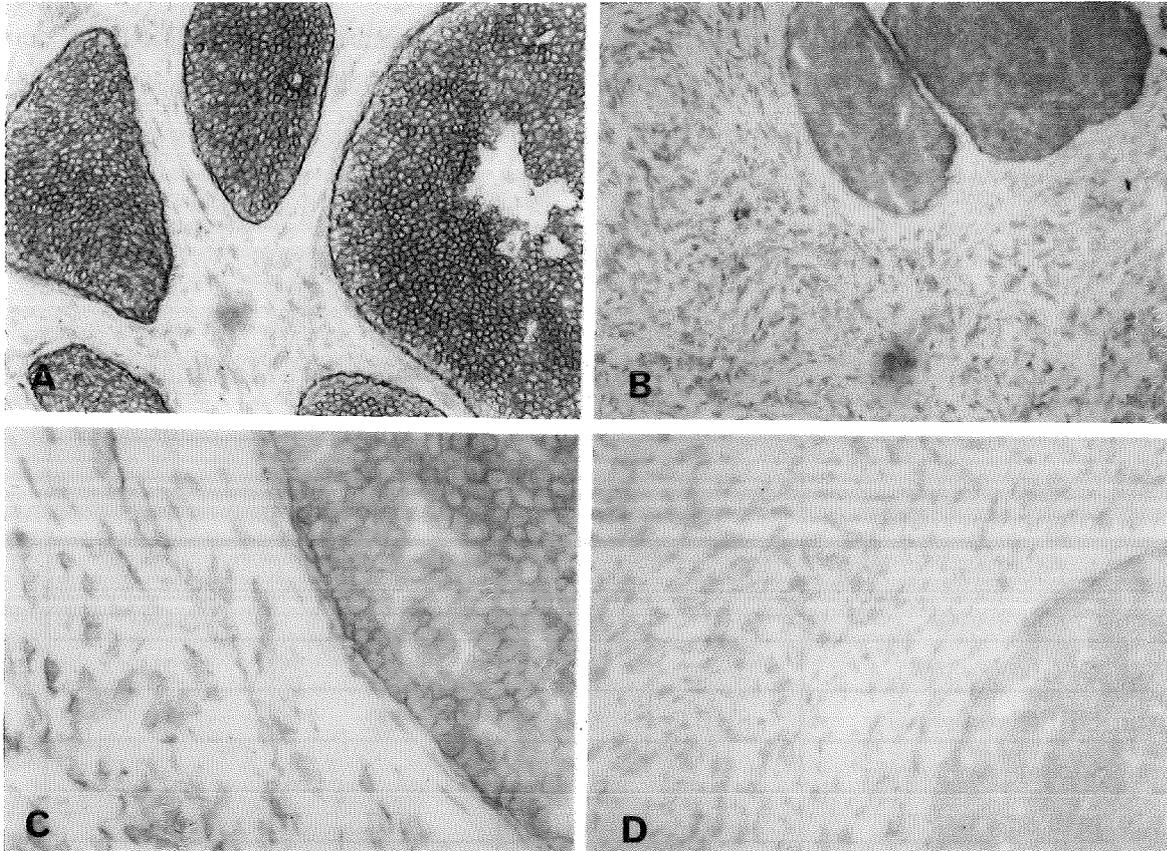
Antikörperspezifität	Tumortyp			
	IDK+CDIS		CLIS	CDIS
polyklonale Seren	invasiv	<i>in situ</i>		
Anti-CD44v3-v10	9/10*	10/10	2/2	4/4
Anti-DI (Exon v3/v4)	6/10	8/10	2/2	2/4
Anti-DIII (Exon v6/v7)	8/10	9/10	2/2	4/4
monoklonale Antikörper				
VFF8 (Exon v5)	8/10	8/10	2/2	4/4
VFF7 (Exon v6)	6/10	6/10	2/2	3/4
VFF 17 (Exon v7)	5/10	5/10	0/2	2/4
VFF16 (Exon v9/v10)	2/10	0/10	2/2	4/4

IDK+CDIS: invasiv duktales Karzinom mit *in situ*-Komponente

CLIS: "carcinoma lobulare *in situ*"

CDIS: "carcinoma ductale *in situ*"

\* Anzahl positiver Fälle/ Anzahl untersuchter Fälle



**Abb. 21 Expression von CD44-Varianten in *in situ*-Karzinomen der Mamma**  
Die Expression von CD44-Varianten in einem reinen *in situ*-Karzinom (A) und einem *in situ*-Karzinom mit invasiver Komponente (B-D) ist gezeigt. Es wurden die Antikörper Anti-CD44v3-v10 (A-C) und VFF7 (D) verwendet. Originalvergrößerung 10x (B), 20x (A, D) und 40x (C). Gegenfärbung Hämatoxylin.

### 3.5.3 Expression von CD44-Varianten in invasiven Mammakarzinomen und axillären Lymphknotenmetastasen

Insgesamt wurden 114 Fälle invasiver Primärtumoren, 11 Rezidive und 16 axilläre Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch mit den variantenspezifischen polyklonalen Seren und monoklonalen Anti-CD44-Antikörpern analysiert. Unter den Primärtumoren befanden sich 95 Fälle von invasiv duktalem Karzinom und 19 Fälle von invasiv lobulärem Karzinom. Alle Präparate wurden zufällig ausgewählt und beinhalten einen repräsentativen Querschnitt histologischer Tumortypen, Gradierungen und Tumorstadien. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen sind in Tabelle 9 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß die überwiegende Mehrheit aller invasiven Tumoren und

Lymphknotenmetastasen CD44-Varianten exprimiert, wobei mit dem exonspezifischen polyklonalen Serum Anti-DI und den mAks VFF7, VFF16 und VFF17 der Anteil der positiven Fälle deutlich geringer ist als mit den polyklonalen Seren Anti-CD44v3-v10, Anti-DIII und dem mAk VFF8. Lymphknotenmetastasen zeigen mit allen polyklonalen Seren und den mAks VFF7 und VFF8 in nahezu 100% der Fälle eine positive Reaktion. Das Färbemuster in individuellen Tumordünnschnitten, insbesondere in den Primärtumoren, war bisweilen sehr heterogen. In diesen Tumoren variierte der Anteil der positiven Tumorzellen von 5% bis 100%, wobei vereinzelte Tumorzellen meist deutlich positiv waren. Größere Tumorzellaggregate zeigten an der Grenze zum umgebenden Stroma eine besonders starke Färbung (Abb. 22A und B). In Präparaten, in denen neben dem Tumoranteil auch normale Milchgänge erhalten waren, reagierte nur das Myoepithel des Ductus neben den Tumorzellen mit den variantenspezifischen Antikörpern (Abb. 22C). In den axillären Lymphknotenmetastasen war das Reaktionsmuster der Antikörper mit den Tumorzellen wesentlich homogener als in den Primärtumoren (Abb. 22D).

**Tabelle 9**

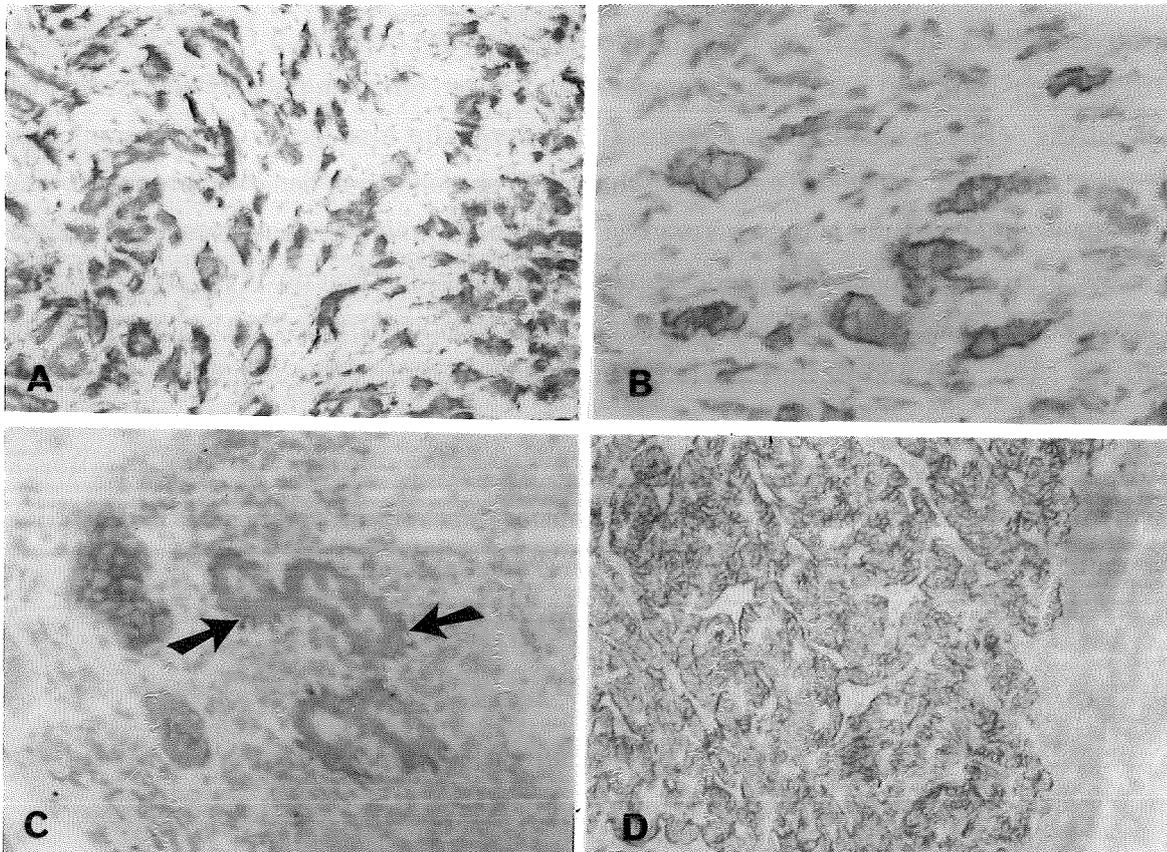
**Expression von CD44-Varianten in invasiven Mammakarzinomen, Rezidiven und axillären Lymphknotenmetastasen**

Antikörperspezifität	Tumortyp			
	IDK	ILK	Rezidive	LK-Metastasen
polyklonale Seren	n=95	n=19	n=11	n=16
Anti-CD44v3-v10	91%*	89%	91%	100%
Anti-DI (Exon v3/v4)	56%	47%	54%	100%
Anti-DIII (Exon v6/v7)	83%	89%	100%	100%
monoklonale Antikörper				
VFF8 (Exon v5)	85%	68%	91%	100%
VFF7 (Exon v6)	73%	47%	82%	94%
VFF 17 (Exon v7)	38%	32%	50%	46%
VFF16 (Exon v9/v10)	44%	26%	80%	70%

IDK: invasiv duktales Karzinom; ILK: invasiv lobuläres Karzinom; LK: Lymphknoten

n: Anzahl der untersuchten Tumorproben von verschiedenen Patienten

\*Prozentsatz der in der immunhistochemischen Analyse positiven Tumoren



**Abb. 22 Expression von CD44-Varianten in invasiven Mammakarzinomen und einer axillären Lymphknotenmetastase**

Gefrierdünnschnitte eines invasiv duktales Karzinoms (A, C), eines invasiv lobulären Karzinoms (B) und einer axillären Lymphknotenmetastase eines invasiv duktales Karzinoms (D) wurden immunhistochemisch mit CD44-variantenspezifischen Antikörpern untersucht. In allen Fällen ist eine positive Reaktion der Antikörper mit den Tumorzellen zu erkennen. In C ist zu sehen, daß in residualem Normalgewebe nur das Myoepithel positiv reagiert (Pfeile), während das luminales Epithel des Ductus negativ ist. Im tumorbefallenen Lymphknoten erfolgt nur eine Reaktion mit den Tumorzellen, nicht mit den Lymphozyten (D). Verwendete Antikörper: Anti-CD44v3-v10 (A, B, D) und VFF8 (C). Originalvergrößerung 20x (A, C, D) und 40x (B); Gegenfärbung Hämatoxylin.

**3.5.4 Die Expression von CD44-Varianten in primären Mammakarzinomen korreliert invers mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen**

Die wichtigsten Faktoren für die Prognose von Brusttumoren sind die Größe des Primärtumors, das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose, der Hormonrezeptorstatus und die Anzahl der axillären Lymphknotenmetastasen (Clark et al., 1983). Dem zuletzt genannten Parameter wird dabei die größte Bedeutung zugemessen. Neben diesen

"klassischen" Parametern finden auch andere Größen Anwendung in der Klinik, so z B. die Ploidie der Tumor-DNA, die Anzahl der Zellen in der S-Phase, Angiogenese im Primärtumor und, seit kurzem, auch die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGF-R (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und c-erbB2 (Slamon et al., 1987; Berger et al., 1988; Sainbury et al., 1987). Für das hier untersuchte Kollektiv von Brustkrebspatientinnen wurden einige dieser bekannten Prognoseparameter mit dem Überlebenszeitraum der Patientinnen in Beziehung gesetzt. Parallel dazu wurde die Expression von CD44-Varianten mit dem Überleben der Patientinnen verglichen.

Von 93 Patientinnen mit invasiven Primärtumoren, die immunhistochemisch untersucht worden waren (Kapitel 3.5.3) lagen Daten über einen klinischen Nachbeobachtungszeitraum von durchschnittlich 34 Monaten (variierend von 6 bis 90 Monaten) vor. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 52 Jahren (von 31 bis 78 Jahren). Neben der TumorgroÙe waren der Tumorgrad, der axilläre Lymphknotenstatus, die Ploidie der DNA, der Anteil der Zellen in der S-Phase und der Hormonrezeptorstatus bekannt. Alle diese Daten wurden im Verlauf der normalen klinischen Routinediagnostik gewonnen. Zusätzlich zu diesen bereits vorhandenen Daten wurde die Expression von CD44-Varianten (siehe Kapitel 3.5.3) und von c-erbB2 und EGF-R immunhistochemisch bestimmt (nicht gezeigt). Dabei wurden 42% der Primärtumoren als c-erbB2 positiv und 47% als EGF-R positiv gewertet.

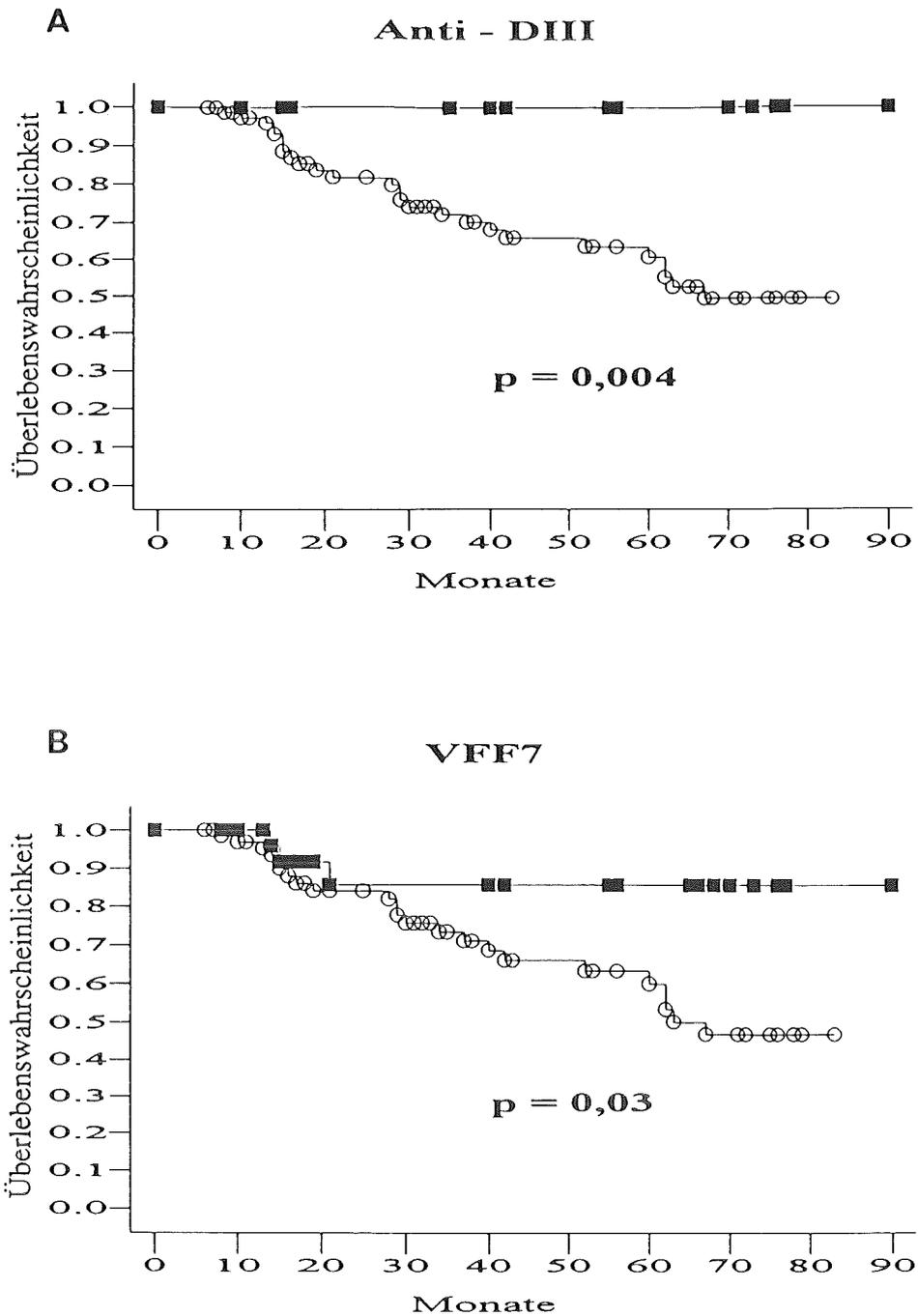
Für alle der vorhin genannten Größen wurde das Gesamtüberleben dieses Patientenkollektivs in einer univariaten Analyse nach der Methode von Kaplan und Meier (1958) berechnet. Die Zufälligkeit der so erhaltenen Überlebenskurven wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests errechnet (Peto et al., 1977). P-Werte von 0,05 und kleiner wurden dabei als statistisch signifikant erachtet. Die für die Berechnungen gewählten Parameter sind aus Tabelle 10 zu entnehmen. Die Auswertung der Überlebenskurven ergab, daß der histologische Tumorgrad ( $p=0,04$ ), der axilläre Lymphknotenstatus ( $p=0,004$ ), der Hormonrezeptorstatus ( $p<0,001$ ) und die Expression von CD44-Varianten signifikant mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert. Die Anti-CD44-Antikörper mit denen eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben erhalten wurde, waren Anti-DI ( $p=0,017$ ), Anti-DIII ( $p=0,004$ ), VFF8 ( $p=0,01$ ) und VFF7 ( $p=0,03$ ) (Tabelle 10). Die Kaplan-Meier Überlebenskurven für die Antikörper Anti-DIII und VFF7 sind in Abbildung 23A und B dargestellt. Alle anderen untersuchten Parameter zeigten keine signifikante Korrelation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit (Tabelle 10).

**Tabelle 10**

**Univariate Analyse zum Vergleich von klassischen Tumorprognosefaktoren und der Oberflächenexpression von CD44-Varianten in primären Mammakarzinomen mit dem Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen**

Parameter	Kriterium	OAS (P-Wert)
Tumorgrad	I, II/ III	0,04
Axill. Lymphknotenstatus	0/ 1-3/ 4-9/ >9 pos. LK	0,004
Ploidie	≤1,1/ >1,1	0,5
S-Phase	≤5/ >5%	0,1
Östrogen-Rezeptor	≤20/ >20*	<0,001
Progesteron-Rezeptor	≤20/ >20*	<0,001
c-erbB2	0-1/ 2-4	0,6
EGF-R	0-1/ 2-4	0,6
Anti-CD44v3-v10	0-1/ 2-4	0,13
Anti-DI (Exon v3/v4)	0-1/ 2-4	0,017
Anti-DIII (Exon v6/v7)	0-1/ 2-4	0,004
VFF8 (Exon v5)	0-1/ 2-4	0,01
VFF7 (Exon v6)	0-1/ 2-4	0,03
VFF17 (Exon v7)	0-1/ 2-4	0,8
VFF18 (Exon v9/v10)	0-1/ 2-4	0,5

OAS: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs, angegeben als P-Wert für die statistische Zufälligkeit der erhaltenen Überlebenskurven; LK: Lymphknoten; Ploidie (der Tumorzell-DNA): dargestellt durch den DNA-Index; S-Phase: Anteil der Tumorzellen in der S-Phase (in %); \*fmol/ mg Zytosolprotein; die Intensität der Färbung mit den Antikörpern wurde mit 0 bis 4 bewertet, wobei Werte von 0 und 1 als negativ und Werte von 2 bis 4 als positiv gezählt wurden.



**Abb. 23 Die Expression von CD44-Varianten in primären Mammakarzinomen korreliert invers mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven für Tumorpatientinnen, deren Primärtumor auf eine Expression von CD44-Varianten mit Hilfe der Antikörper Anti-DIII (A) und VFF7 (B) untersucht wurde. A: keine von 14 Patientinnen mit Anti-DIII-negativen Primärtumor (-■-) bzw. 26 von 79 Patientinnen mit Anti-DIII-positiven Primärtumor (-○-) sind während des Beobachtungszeitraums von 90 Monaten verstorben. B: 3 von 29 Patientinnen mit VFF7-negativen Primärtumor (-■-) bzw. 23 von 64 Patientinnen mit VFF7-positiven Primärtumor (-○-) sind während des Beobachtungszeitraums von 90 Monaten verstorben.

### 3.5.5 Zusammenfassung

Die immunhistochemische Analyse von normalem Brustgewebe, benignen Läsionen der Brust, *in situ*- und invasiven Karzinomen sowie axillären Lymphknotenmetastasen hat ergeben, daß schon in frühen Stadien der Transformation (in hyperplastischem Epithel) CD44-Varianten exprimiert werden, während in normalem Mammaepithel keine Expression stattfindet. Bei den invasiven Karzinomen schwankte der Prozentsatz der CD44-variantenpositiven Fälle zwischen 26 und 100%, je nach der Spezifität der verwendeten Antikörper, was darauf schließen läßt, daß unterschiedliche CD44-Varianten in den Tumoren exprimiert werden. Die Reaktivität der verwendeten exonspezifischen Anti-CD44-Antikörper war dabei äußerst heterogen. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Lymphknotenmetastasen eine wesentlich homogenere Expression bestimmter CD44-Varianten. Ein Vergleich der CD44-Variantenexpression in den invasiven Primärtumoren mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen hat ergeben, daß die Expression bestimmter CD44-Varianten mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen invers korreliert. Damit könnten CD44-Varianten eine molekulare Determinante für das Metastasierungspotential dieser Tumoren darstellen.

### **3.6 Expression von CD44-Varianten in Nicht-Adenokarzinomen**

Die in den vorigen Kapiteln beschriebenen Tumoren gehören alle zur großen Gruppe der Adenokarzinome und zeichnen sich durch ein mehr oder weniger hohes Metastasierungspotential aus. Daneben gibt es aber auch nicht-epitheliale Tumoren (z.B. Melanome, Lymphome), die ein hohes Metastasierungspotential besitzen, während andererseits bestimmte epitheliale Tumoren (z.B. Basalzellkarzinome der Haut) nicht metastasieren. Um zu untersuchen, ob die Expression von CD44-Varianten auf metastasierende bzw. epitheliale Tumoren beschränkt ist, wurden verschiedene andere Tumortypen immunhistochemisch mit den CD44-variantenspezifischen Antikörpern untersucht.

#### **3.6.1 Nicht-metastasierende Basalzellkarzinome der Haut exprimieren andere CD44-Varianten als stark-metastasierende maligne Melanome**

Im Zeitalter einer zunehmenden Strahlenbelastung der Haut durch veränderte Umweltbedingungen spielen Hauttumoren eine immer größer werdende Rolle in der klinischen Onkologie. Aus den verschiedenen Zelltypen der Haut können verschiedene Arten von Tumoren entstehen, die sich in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden. Drei dieser Tumortypen wurden immunhistochemisch auf die Expression von CD44-Varianten untersucht. Das Basalzellkarzinom (Synonym: Basaliom) ist ein lokal destruierend wachsender Tumor der Haut, der histologisch aus basaloiden Zellen besteht und aus Zellen des follikulären Epithels entsteht. Eine Metastasierung findet extrem selten statt. Plattenepithelkarzinome (Carcinoma spinocellulare) entstehen aus dem interfollikulären Epithel der Haut und können, im Gegensatz zu den Basaliomen, Metastasen bilden, wenn auch mit sehr geringer Frequenz. Sowohl Basaliome als auch Plattenepithelkarzinome der Haut zeigten eine fast 100%ige Reaktion mit allen verwendeten variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern (Tabelle 11). Sie zeigen damit ein ähnliches CD44-Expressionsmuster wie normale Haut (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.1.5).

Deutlich anders war die Reaktion von malignen Melanomen und Metastasen dieser Tumoren mit den variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern. Melanome entstehen aus Melanozyten, also Zellen ekto-neurodermalen Ursprungs, und besitzen schon in frühen Stadien der Tumorentwicklung ein sehr hohes Metastasierungspotential. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, konnte in den Melanomen und zugehörigen Metastasen nur eine Expression der varianten Exons v7 und v9/v10 nachgewiesen werden, während eine Färbung mit den

Exon v5- und v6-spezifischen mAks nicht festzustellen war. Die Intensität der Antikörperreaktion und der Prozentsatz der reagierenden Tumorzellen war deutlich geringer als in den untersuchten Karzinomen der Haut (nicht gezeigt).

**Tabelle 11**

**Expression von CD44-Varianten in Hauttumoren**

Tumortyp	Antikörperspezifität				
	$\alpha$ CD44v	VFF8	VFF7	VFF17	VFF16
	(v3-v10)	(v5)	(v6)	(v7)	(v9/v10)
Basaliome	9/10 <sup>a</sup>	10/10	11/11	11/11	11/11
Plattenepithelkarzinome	8/8	8/8	8/8	6/6	8/8
Maligne Melanome PT	2/6	0/6	0/6	4/5	4/5
Maligne Melanome Met.	0/8	0/8	0/8	5/8	8/8

<sup>a</sup> Anzahl positiver Tumoren/Anzahl getesteter Tumoren; PT: Primärtumor; Met: Metastase

### 3.6.2 Die Expression des varianten CD44-Exons v6 korreliert mit der Aggressivität von Nicht-Hodgkin-Lymphomen

Bereits frühere Untersuchungen konnten zeigen, daß die Expression von CD44-Molekülen in Nicht-Hodgkin-Lymphomen mit der Tumordissemination und dem aggressiven Verhalten der Tumoren korreliert (Horst et al., 1990; Pals et al., 1989a; Jalkanen et al., 1990). Zum damaligen Zeitpunkt konnte aber nicht unterschieden werden, ob auf den Tumorzellen variante Formen von CD44 oder nur die Standardform exprimiert wird, da die in den damaligen Studien verwendeten Antikörper ein Epitop im Standardanteil des CD44-Moleküls erkannt haben. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Typen von Nicht-Hodgkin-Lymphomen mit den variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern immunhistochemisch analysiert. Zur Klassifizierung der Tumoren wurde dabei die Arbeitsformulierung des National Cancer Institute (1982) verwendet. Es zeigte sich, daß in keinem der niedriggradigen Lymphome eine Expression von CD44-Varianten nachweisbar war, während in mittel- und hochgradigen Tumoren ausschließlich eine Reaktion mit dem mAk VFF7 (Exon v6) zu sehen war (Tabelle 12). Dabei waren je ca. 40% der diffus großzelligen, immunoblastischen und anaplastischen Lymphome positiv für diesen Antikörper. Alle

anderen verwendeten mAks (VFF11, VFF6, VFF9) zeigten keine Reaktion mit den Tumoren.

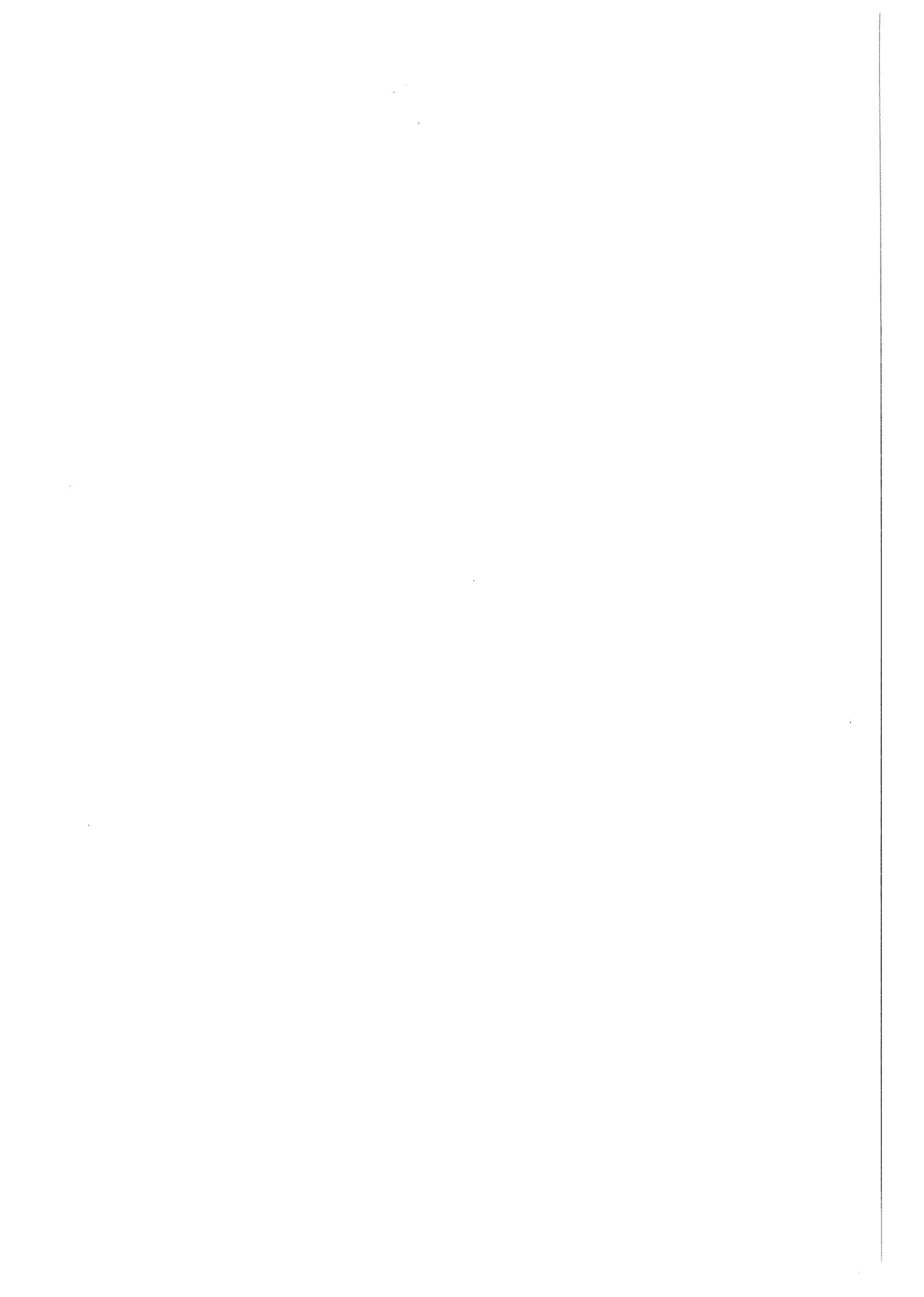
**Tabelle 12**  
**Expression von CD44-Varianten in Nicht-Hodgkin-Lymphomen**

Tumortyp	Antikörperspezifität				
	$\alpha$ CD44v	VFF11	VFF6	VFF7	VFF9
	(v3-v10)	(v3)	(v5)	(v6)	(v7)
niedriggradig					
diffus kleinzellig	0/7 <sup>a</sup>	0/7	0/7	0/7	0/7
follikulär	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
mittel- und hochgradig					
diffus großzellig	7/14	0/14	0/14	6/14	0/14
immunoblastisch	3/5	0/5	0/5	2/5	0/5
anaplastisch	4/5	0/5	0/5	2/5	0/5

<sup>a</sup> Anzahl positiver Tumoren/ Anzahl getesteter Tumoren

### 3.6.3 Zusammenfassung

Die Untersuchungen an Tumoren nicht-epithelialen Ursprungs haben gezeigt, daß die Expression von CD44-Varianten nicht nur auf Karzinome beschränkt ist. Dabei war im Falle der Nicht-Hodgkin-Lymphome der Prozentsatz der CD44-variantenpositiven Tumoren deutlich geringer als bei allen bis jetzt untersuchten Karzinomen. In malignen Melanomen, einem ebenfalls nicht-epithelialen, hochgradig metastasierenden Tumor, konnte keine Expression des varianten CD44-Exons v6 nachgewiesen werden, während nicht-metastasierende Basaliome und Plattenepithelkarzinome der Haut ähnliche CD44-Varianten exprimieren wie menschliche Hautkeratinozyten.



## 4 Diskussion

Bei den ursprünglich mit CD44 beschriebenen Molekülen handelt es sich um eine Familie verschiedener Proteine, die sich sowohl in Art und Ausmaß der posttranslationalen Modifikationen als auch in ihrer Aminosäureprimärsequenz unterscheiden. Ursache für die verschiedenen Proteinisoformen ist differentielles Spleißen der Vorläufer-Boten-RNA. Die am häufigsten exprimierte Form von CD44 ist die sogenannte Standardform oder hämatopoetische Form von CD44. Sie entsteht durch das Herausspleißen von 10 Exons des CD44-Gens, die für einen Anteil im extrazellulären Bereich des Proteins codieren und als variante Exons bezeichnet werden. Für diese Standardform von CD44 wurden eine Reihe verschiedener Funktionen beschrieben. Dabei handelt es sich in der Mehrzahl um physiologische Prozesse, bei denen Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktionen eine wichtige Rolle spielen. Solche Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen haben jedoch auch bei der Tumormetastasierung eine große Bedeutung. Daher war es naheliegend zu vermuten, daß bestimmte Formen von CD44 eine Rolle in dem letztgenannten Prozeß spielen könnten.

1991 konnte erstmals gezeigt werden, daß variante Formen des CD44-Moleküls sowohl notwendig als auch ausreichend sind, um einer nicht-metastasierenden Rattenpankreas-Adenokarzinomzelllinie metastatische Eigenschaften zu verleihen. Damit wurde erstmals ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von CD44-Varianten in Tumorzellen und dem metastatischen Potential dieser Zellen hergestellt. Interessanterweise enthalten alle bis dato untersuchten Varianten von CD44, die metastatisches Potential auf nicht-metastasierende Tumorzellen übertragen können, das variante Exon v6 (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993; Dr. J. Sleeman, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CD44-Varianten, insbesondere solche, die das variante Exon v6 beinhalten, auch in humanen Tumoren *in situ* exprimiert werden und ob aus dieser Expression ein Zusammenhang mit dem Metastasierungspotential der Tumoren hergestellt werden kann.

Zum Nachweis varianter CD44-Proteine in humanem klinischen Tumormaterial wurden sowohl polyklonale Seren als auch monoklonale Antikörper hergestellt. Die durchgeführten Western- und FACS-Analysen haben gezeigt, daß diese Antikörper spezifisch mit eukaryont exprimierten CD44-Molekülen reagieren, die die varianten Exons v3 bis v10 enthalten. Eine Kreuzreaktion mit der Standardform des CD44-Moleküls wurde nicht beobachtet. Diese Antikörper stellen damit nach meinem Wissen die ersten verfügbaren Antikörper dar, die spezifisch mit den varianten Bereichen des humanen CD44-Moleküls reagieren.

Eine Untersuchung der CD44-Variantenexpression in der Keratinozytenzelllinie HaCat hat gezeigt, daß sie auf ihrer Oberfläche die varianten Exons v3 oder v4, v5 bis v7 und v9 oder v10 exprimiert. Da mittels reverser Transkription-PCR Analyse das Vorhandensein eines dominanten Transkripts mit diesen Exons nachgewiesen werden konnte (Hofmann et al., 1991) liegt es nahe, daß es sich bei dem mit den variantenspezifischen Antikörpern nachgewiesenen CD44-Molekül um eine Variante mit den Exons v3 bis v10 handelt. Die Tatsache, daß in einer Western-Analyse mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10 vier Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachgewiesen werden konnten ist ein Hinweis darauf, daß das CD44-Protein in verschiedenen Modifikationen in dieser Zelllinie vorliegt. Für eine CD44-Variante, die die varianten Exons v8 bis v10 enthält und in humanen neonatalen Vorhautkeratinozyten exprimiert wird, wurden solche Modifikationen nachgewiesen (Brown et al., 1991). Es könnte jedoch auch sein, daß in den HaCat-Zellen unterschiedliche variante CD44-Proteine mit unterschiedlichen Aminosäureprimärsequenzen synthetisiert werden. Dafür spricht, daß man in diesen Zellen und in primären Keratinozyten nach reverser Transkription-PCR Amplifikation auch kürzere Amplifikationsprodukte nachweisen kann, die nicht alle varianten Exons v3 bis v10 enthalten (Goldstein und Butcher, 1990; Brown et al., 1991; Hofmann et al., 1991 und eigene Beobachtungen).

Die immunhistochemische Analyse von Hautdünnschnitten mit den variantenspezifischen Antikörpern hat ergeben, daß in allen Schichten der Haut CD44-Varianten exprimiert werden. Durch das Reaktionsmuster mit den verschiedenen affinitätsgereinigten Seren und mAks wurde ersichtlich, daß CD44-Varianten mit den Exons v3 oder v4, v5 bis v7 und v9 oder v10 exprimiert werden. Es könnte sich dabei um die gleiche Variante von CD44 handeln, die auch in immortalisierten Keratinozyten (HaCat) exprimiert wird und die varianten Exons v3 bis v10 enthält. Ein cDNA-Klon, der für eine solche CD44-Variante codiert, wurde erst kürzlich aus einer cDNA-Bibliothek normaler humaner Keratinozyten isoliert (Kugelman et al., 1992). Außerdem konnte ich zeigen, daß aus primären Hautkeratinozyten angelegte Zellkulturen eine CD44-RNA-Spezies exprimieren, die die gleiche Länge wie die Maximalvariante in HaCat- und HPKII-Zellen besitzt (Daten nicht gezeigt). Sie stellt die größte CD44-Spleißvariante dar, die bis jetzt aus humanen Zellen isoliert werden konnte. Möglicherweise werden CD44-Spleißvarianten, die zusätzlich die Exons v1 und v2 enthalten, in menschlichen Geweben nicht exprimiert. Dafür spricht ein vor kurzem von G. Sreaton veröffentlichter Bericht, wonach im humanen Exon v1 ein Stopcodon vorhanden ist (Sreaton et al., 1993).

Die oben diskutierten Ergebnisse zeigen, daß immortalisierte Keratinozytenzelllinien und primäre Hautkeratinozyten die gleichen CD44-Varianten exprimieren. Es handelt sich dabei

sehr wahrscheinlich um die "humane Maximalvariante" von CD44 mit den varianten Exons v3 bis v10. Aufgrund der Expression der varianten Exons v3 bis v10 in primären Hautkeratinozyten wurden Gefrierdünnschnitte normaler menschlicher Haut als Kontrollgewebe für die Antikörperreaktion in der Immunhistochemie verwendet.

#### **4.1 Die Expression von CD44-Varianten in Normalgeweben ist auf wenige Gewebetypen beschränkt**

Vor der Isolierung der variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörper konnte der Nachweis der Expression von humanen CD44-Varianten nur auf RNA-Ebene durchgeführt werden. Dabei wurden sowohl Zelllinien als auch menschliche Normal- und Tumorgewebe auf ihre CD44-Expression untersucht (Stamenkovic et al., 1991; Brown et al., 1991; Dougherty et al., 1991; Hofmann et al., 1991; Cooper et al., 1992; Jackson et al., 1992; Matsumura und Tarin, 1992; Tanabe et al., 1993). Im Vergleich zur nahezu ubiquitären Expression der Standardform von CD44 konnte nur eine sehr eingeschränkte Expression von CD44-Varianten in Normalgeweben beobachtet werden. Eine deutliche Expression varianter CD44-Transkripte konnte in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen werden (nach Hybridisierung mit Sonden homolog zu den Exons v8 bis v10 bzw. v10; Dougherty et al., 1991), eine schwache Expression wurde in normalem Brust- und Kolongewebe gefunden (nach Hybridisierung mit Sonden homolog zu den Exons v5 und v6; Matsumura und Tarin, 1992; Tanabe et al., 1993).

Meine Untersuchungen an verschiedensten menschlichen Normalgeweben haben gezeigt, daß die Expression varianter CD44-Proteine im wesentlichen auf Gewebe epithelialen Ursprungs beschränkt ist (siehe Tabelle 3). Anhand der unterschiedlichen Reaktivität mit den exonspezifischen polyklonalen Seren kann gesagt werden, daß verschiedene epitheliale Gewebe unterschiedliche CD44-Varianten exprimieren. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß eine negative Reaktion der Antikörper auf eine Maskierung dieser Epitope zurückzuführen ist, z.B. durch gewebespezifische Modifikationen der CD44-Moleküle.

Im Vergleich zu der homogenen Expression in epithelialen Geweben konnte in hämatolymphoiden Geweben nur eine Expression von CD44-Varianten auf einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um Lymphozyten bzw. Monozyten und Makrophagen. Bei den CD44-variantenpositiven Lymphozyten könnte es sich um aktivierte T- oder B-Zellen handeln, die in transienter Weise CD44-Varianten exprimieren. Diese

Vermutung wird dadurch unterstützt, daß ich zusammen mit der Arbeitsgruppe von S. Pals zeigen konnte, daß humane T-Lymphozyten nach antigener Stimulation mit dem Phorbolster PMA oder mit Interleukin-2 und einem Anti-CD3-mAk transient eine CD44-Variante exprimieren, die das variante Exon v6 enthält (Koopman et al, 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Ratten-B- und T-Lymphozyten nach antigener *in vivo*-Stimulation gefunden (Arch et al., 1992).

Die Untersuchungen an menschlichen Normalgeweben haben gezeigt, daß die Expression varianter CD44-Moleküle auf wenige Gewebe, vor allem epithelialen Ursprungs, beschränkt ist. Dies impliziert, daß CD44-Varianten eine Funktion in physiologischen Prozessen besitzen. Über solche Funktionen kann bis jetzt nur spekuliert werden. Das Vorhandensein zusätzlicher varianter Exons in den CD44-Molekülen könnte ihre Affinität zu bestimmten Liganden im Vergleich zur Affinität der Standardform von CD44 verändern. Einen Hinweis darauf lieferten *in vitro*-Experimente, bei denen das Vorhandensein der varianten Exons v8 bis v10 die Bindung an Hyaluronsäure, einen Liganden für die Standardform von CD44 (Aruffo et al., 1990), im Vergleich zur Bindung der Standardform von CD44 verringert hat. Gleichzeitig wurde die Adhäsion von Lymphozyten, die diese CD44-Variante exprimieren, an kultivierte Endothelzellen (HEVs) verringert (Stamenkovic et al., 1991). Die Bindung von CD44 an andere Liganden in der extrazellulären Matrix wie Kollagen (Carter und Wayner, 1988) und Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992) könnte durch zusätzliche variante CD44-Exons ebenfalls beeinflusst werden. Alternativ dazu könnte das Einführen neuer Sequenzen in den extrazellulären Anteil des Standard-CD44-Moleküls völlig neue Bindeeigenschaften vermitteln. Auf diese Weise könnten variante CD44-Formen zum gewebespezifischen "Homing" bestimmter Zelltypen beitragen.

## 4.2 Tumorzellen exprimieren CD44-Varianten

Mit der Untersuchung von klinischem Tumormaterial sollte die Frage beantwortet werden, ob in menschlichen Tumoren die Expression von CD44-Varianten mit dem Metastasierungspotential der Tumoren korreliert. Um einen möglichst repräsentativen Querschnitt von Tumoren zu erfassen, wurden neben verschiedenen Typen von Adenokarzinomen, die ca. 90% aller Tumoren ausmachen, auch Nicht-Adenokarzinome immunhistochemisch auf die Expression varianter CD44-Moleküle untersucht. Bei den Nicht-Adenokarzinomen handelte es sich um Tumoren epithelialen Ursprungs (Basaliome, Plattenepithelkarzinome der Haut), neuro-ektodermalen Ursprungs (Melanome) und mesenchymalen Ursprungs (Nicht-Hodgkin-Lymphome).

Interessanterweise zeigten dabei Basaliome und Plattenepithelkarzinome der Haut, also beides nicht oder extrem selten metastasierende Tumoren, eine Expression von CD44-Varianten in 100% der untersuchten Fälle. Immunhistochemische Analysen und reverse Transkriptions-PCR Analysen (Daten nicht gezeigt) haben ergeben, daß Basaliome ähnliche CD44-Varianten exprimieren wie primäre Hautkeratinozyten. Somit gibt es Tumoren, die CD44-Varianten exprimieren, aber offensichtlich nicht metastasieren. Dafür sind mehrere Gründe denkbar. Zum einen könnte es bedeuten, daß generell in humanen Tumoren, im Gegensatz zum Rattensystem, CD44-Varianten keine Rolle im Metastasierungsprozeß spielen. Dagegen sprechen die später diskutierten Ergebnisse. Wahrscheinlicher ist es, daß in diesen nicht-metastasierenden Tumoren den Tumorzellen noch eine Reihe anderer Eigenschaften fehlen, um metastasieren zu können. Diese Annahme stünde in Übereinstimmung mit dem Modell der multifaktoriellen Metastasierung (van Roy und Mareel, 1992). Es könnte jedoch auch sein, daß in den Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen andere CD44-Varianten, die *per se* nicht im Stande sind, Metastasierungsfähigkeit zu vermitteln (z.B. "Keratinozytentyp" v3-v10 versus Meta-1 (v4-v7) oder Meta-2 (v6-v7)), exprimiert werden als in den metastasierenden Tumoren.

Im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Tumortypen war in den stark metastasierenden malignen Melanomen keine Expression von CD44-Varianten, die das variante Exon v6 enthalten, nachweisbar. Eine Ursache dafür könnte die Maskierung der entsprechenden Antikörper-Epitope in diesen Tumoren sein. Dagegen sprechen meine präliminären RNA-Untersuchungen an diesen Tumoren, nach denen das Exon v6 auch auf RNA-Ebene nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Nimmt man also an, daß bestimmte variante Formen von CD44, die das Exon v6 enthalten, im kausalen Zusammenhang mit dem Metastasierungspotential bestimmter Tumortypen stehen, so muß man aus diesen Ergebnissen folgern, daß es auch andere Wege der Metastasierung gibt, die unabhängig von solchen CD44-Varianten ablaufen (siehe auch Adenokarzinome des Magens vom diffusen Typ).

In Nicht-Hodgkin-Lymphomen korreliert die Expression von CD44-Varianten, die das Exon v6 exprimieren, in signifikanter Weise mit der Aggressivität dieser Tumoren. Im Gegensatz zu den untersuchten Karzinomen konnte in den Lymphomen nur die Expression des Exons v6 nachgewiesen werden, andere exonspezifische Antikörper reagierten nicht. Damit scheinen diese Tumoren die selben CD44-Varianten wie aktivierte Lymphozyten zu exprimieren (Arch et al., 1992; Koopman et al., 1993). Da die Lymphome ähnliche infiltrative und migratorische Eigenschaften wie die aktivierten Lymphozyten aufzeigen, könnte es sein, daß die Expression der CD44-v6 Varianten auf den Tumorzellen

verantwortlich für deren aggressiveres Verhalten gegenüber den nicht exprimierenden Zellen ist.

In Adenokarzinomen konnte generell eine Expression von CD44-Varianten in 90% bis 100% der untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden (mit dem polyklonalen Serum Anti-CD44v3-v10). Die Verwendung der exonspezifischen mAbs hat jedoch ergeben, daß es beträchtliche Unterschiede bezüglich der CD44-Variantenexpression zwischen verschiedenen Tumortypen einerseits und individuellen Tumorproben des selben Tumortyps andererseits gibt. Die Normalgewebe, aus denen diese Tumoren hervorgehen, zeigten in allen untersuchten Fällen eine deutlich andere CD44-Variantenexpression als die jeweiligen Tumoren.

Normale Magenschleimhaut gehört zu den wenigen Normalgeweben, die eine Expression von CD44-Varianten zeigen. Es wurden zwei unterschiedliche Expressionsmuster beobachtet. Definierte Bereiche normaler Magenschleimhaut (foveoläre Proliferationszone und mukoides Oberflächenepithel) exprimieren CD44-Varianten, die das Exon v5 enthalten, während in intestinalen Metaplasien CD44-Varianten mit den Exons v5 und v6 exprimiert werden. Interessanterweise unterscheiden sich auch die beiden untersuchten Magenkarzinomtypen in ihrer Expression von CD44-Varianten. In Karzinomen des diffusen Typs wurde überwiegend eine Expression von CD44-Varianten mit dem Exon v5 festgestellt, während in Karzinomen des intestinalen Typs eine Expression der Exons v5 und v6 nachweisbar war. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die beiden Typen der Magenkarzinome aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entstehen (P. Correa, 1992).

Die immunhistochemischen Analysen vermitteln den Eindruck, daß die Tumoren das CD44-Expressionsmuster aufrecht erhalten, das bereits in normaler Magenschleimhaut anzutreffen ist und daß die Expression der CD44-Varianten in keinsten Weise mit der Tumorprogression bzw. dem Metastasierungspotential der Tumoren in Zusammenhang steht. Die reversen Transkriptions-PCR Analysen haben jedoch gezeigt, daß sich die Expression von CD44-Varianten in den Karzinomen auf RNA-Ebene dramatisch von der Expression im Normalgewebe unterscheidet. Im Vergleich zur sehr uniformen Expression im Normalgewebe (ein bis zwei Transkripte, die die Exons v5 und/ oder v6 enthalten) werden in den Tumoren eine Vielzahl verschiedener Transkripte synthetisiert. Ursache dafür ist eine Störung im Spleißmechanismus der Tumorzellen (Hofmann et al., 1993). Somit findet in den transformierten Tumorzellen eine deutlich andere CD44-Expression statt als in den nicht-transformierten Vorläuferzellen. Ob diese Störung im Spleißmechanismus kausal mit der Transformation der Tumorzellen in Verbindung steht kann zur Zeit nicht gesagt werden.

Bei der Anwendung der reversen Transkription-PCR Analyse kann man nie ausschließen, daß die erhaltenen Signale auch von Nicht-Tumorzellen stammen. So findet man in Tumorgewebe neben dem Tumorstroma auch infiltrierende Lymphozyten und Makrophagen. *In vitro*- und *in vivo*-Experimente haben gezeigt, daß B- und T-Zellen nach antigener Stimulation transient CD44-Varianten exprimieren (Arch et al., 1992; Koopman et al., 1993). Aus den Daten, die mit den Magenkarzinomzelllinien erhalten wurden, kann man jedoch folgern, daß das komplexe Spleißmuster, das in den Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, nicht nur das Ergebnis einer Kontamination mit anderen Zellen sein kann. Die Zelllinien produzieren eine Reihe verschiedener CD44-Varianten ähnlicher Größe wie die Tumoren und nur wenig Standard-CD44. Das läßt darauf schließen, daß die Mehrheit der nachgewiesenen Standard-CD44-Transkripte in den Tumorproben von Nicht-Tumorzellen stammt, während die CD44-Varianten von den Tumorzellen exprimiert werden.

Lymphknotenmetastasen von Magenkarzinomen exprimieren in allen Fällen CD44-Varianten. Vergleicht man diese Expression mit der Expression in den korrespondierenden Primärtumoren, so stellt man eine Diskrepanz zwischen Exon v5- und Exon v6-enthaltenden Transkripten fest. Bei Verwendung der Exon v6-spezifischen Sonde in der Southern-Analyse (nach reverser Transkription-PCR Amplifikation) zeigten die Paare von Primärtumor und Metastase des intestinalen Typs ein ähnliches Muster an CD44-Varianten, während keine offensichtliche Korrelation zwischen den Exon v5-enthaltenden Transkripten in diesen Primärtumoren und Metastasen festgestellt werden konnte. Daraus kann man folgern, daß es in den Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen Populationen von Zellen gibt, die sich im Hinblick auf ihre v6-Expression ähneln, was ein Indiz für eine mögliche Rolle dieses Exons im metastatischen Prozeß sein könnte.

Es ist bemerkenswert, daß die meisten untersuchten Tumoren des diffusen Typs nicht das Exon v6 exprimieren. Dies wurde sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene beobachtet. Derselbe Befund trifft überraschenderweise auch für die Lymphknotenmetastasen dieser Tumoren zu. Falls Spleißvarianten, die das Exon v6 enthalten, irgendeinen Selektionsvorteil für die Tumorzellen bedeuten, so muß es sich im Fall der diffusen Tumoren um einen anderen Weg der Tumorprogression handeln, bei dem solche CD44-Varianten keine Rolle spielen.

Sowohl die immunhistochemischen als auch die RNA-Daten indizieren, daß es einen Unterschied zwischen Magenkarzinomen des intestinalen Typs und des diffusen Typs bezüglich ihrer CD44-Variantenexpression gibt. Die meisten Siegelringkarzinome des diffusen Typs exprimieren CD44-Spleißvarianten, die das Exon v5 enthalten, während

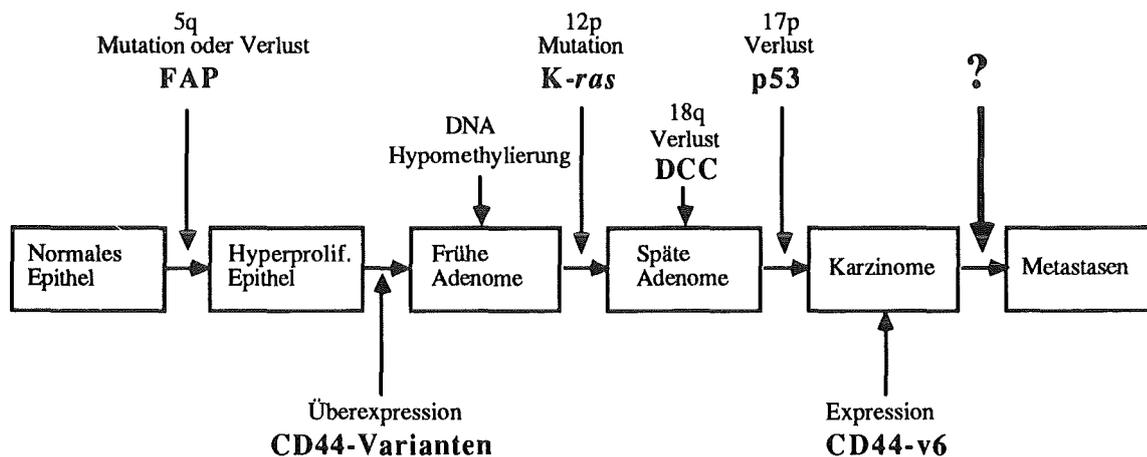
Karzinome vom intestinalen Typ sowohl Exon v5 als auch Exon v6 exprimieren. Eine Subpopulation von Zellen der normalen Magenschleimhaut exprimiert ebenfalls nur das Exon v5. Intestinale Metaplasien, die als Vorläuferstadien in der Karzinogenese von Magenkarzinomen des intestinalen Typs betrachtet werden (Correa et al., 1990), exprimieren dagegen CD44-Varianten mit den Exons v5 und v6, in Analogie zu den intestinalen Tumoren. Diese Unterschiede zwischen Adenokarzinomen des diffusen und intestinalen Typs erlauben es zum ersten Mal, diese beiden Tumortypen durch molekulare Marker zu unterscheiden. Darüberhinaus sind auch potentielle Vorläuferläsionen von Tumoren leicht von normaler Magenschleimhaut aufgrund ihrer Expression des Exons v6 zu unterscheiden. Diese Unterschiede unterstützen auch die Hypothese, daß Magenkarzinome des diffusen Typs und des intestinalen Typs aus verschiedenen Vorläuferzellen entstehen und sich entlang verschiedener "Tumorpfade" entwickeln (P. Correa, 1992).

#### **4.3 Die Expression von Exon v6 korreliert mit der Tumorprogression**

Kolorektale Tumoren eignen sich besonders gut zum Studium der Zwischenschritte der Karzinogenese, da bei diesem Tumortyp klar abgegrenzte, histopathologisch definierte Stadien der Tumorentstehung unterschieden werden können. Diese unterschiedlichen Stadien (adenomatöse Polypen (= Adenome) und Karzinome) zeichnen sich durch ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf ihr Metastasierungspotential aus. Während Adenome nicht metastasieren und als benigne Tumoren betrachtet werden, zeigen Karzinome je nach Tumorstadium (Dukes A bis D) ein unterschiedlich großes Metastasierungspotential.

Durch umfangreiche Untersuchungen an menschlichem Tumormaterial konnte gezeigt werden, daß im Verlauf der kolorektalen Tumorentstehung eine Vielzahl genetischer Veränderungen auftreten (zur Übersicht siehe Fearon und Vogelstein, 1990 und Abb. 24). Ein Teil dieser genetischen Veränderungen ist schon in frühen Stadien der Tumorgenese nachzuweisen, während andere häufiger in späteren Stadien auftreten. So findet man in 50% aller kolorektalen Karzinome und in einem ähnlichen Prozentsatz später Adenome (Durchmesser > 1cm) eine Mutation im *ras*-Gen, während solche Mutationen nur in 10% der frühen Adenome (Durchmesser ≤ 1cm) nachweisbar sind (Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988). Somit sind Mutationen im *ras*-Gen relativ frühe Ereignisse im Prozeß der kolorektalen Tumorentstehung. Neben diesen Mutationen findet man in kolorektalen Tumoren häufig den Verlust von chromosomalen Regionen, wobei überdurchschnittlich oft die Region 17p (mehr als 75% aller Karzinome) und 18q (mehr als

70% aller Karzinome) betroffen ist (Vogelstein et al., 1988; Delattre et al., 1989). Die Gene, die durch diese Deletionen verloren gehen, sind die Tumorsuppressorgene p53 (17p; Baker et al., 1989) und DCC (18q; Fearon et al., 1990). Im Gegensatz zu den *ras*-Mutationen wurde ein Verlust der Region 17p in verstärktem Maße in späteren Tumorstadien nachgewiesen, was darauf schließen läßt, daß es sich um ein relativ spätes Ereignis im Prozeß der kolorektalen Tumorgenese handelt (siehe Abb. 24). Die in diesem Modell dargestellte zeitliche Abfolge des Erwerbs der genetischen Veränderungen sollte jedoch nicht als unbedingte Voraussetzung für die Tumorprogression betrachtet werden. So findet man z.B. den Verlust der chromosomalen Region 17p auch schon in einem geringen Prozentsatz der frühen Adenome. In einem anderen Fall, bei dem von einem Patienten ein Adenom mit einer Karzinomkomponente untersucht worden war, wurde der Verlust der Region 18q im Adenom gefunden, während im Karzinomanteil die *ras*-Mutation nachzuweisen war. Dies hat zu dem Schluß geführt, daß nicht die zeitliche Reihenfolge des Erwerbs der genetischen Veränderungen, sondern vielmehr ihre Akkumulation für die Progression dieser Tumoren verantwortlich ist. Dies wird dadurch bestätigt, daß in mehr als 90% der Karzinome eine Veränderung von zwei oder mehr genetischen Markern nachzuweisen ist (Mutation im *ras*-Gen und Deletionen der chromosomalen Regionen 5q, 17p und 18q), während nur 7% der frühen Adenome eine Veränderung in mehr als einem dieser Marker aufzeigen (Fearon und Vogelstein, 1990).



**Abb. 24 Stadienmodell der kolorektalen Karzinogenese (modifiziert nach Fearon und Vogelstein)**

Die mögliche Beteiligung von varianten CD44-Proteinen am Prozeß der kolorektalen Tumorentstehung ist eingezeichnet. FAP: Familial adenomateous polyposis; DCC: Deleted in colorectal carcinoma.

Versucht man nun, die von mir gefundenen Ergebnisse bezüglich der Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese in das von Fearon und Vogelstein vorgeschlagene Stadienmodell einzubinden, so kann man zwei verschiedene Ereignisse unterscheiden. Zum einen ist dies eine Über- bzw. Neuexpression von CD44-Varianten, die die varianten Exons v7 und v9 oder v10 bzw. v5, v7 und v9 oder v10 enthalten, in frühen Stadien (Adenome) der Karzinogenese. Zum anderen findet man eine prozentuale Zunahme von Tumoren, die CD44-Varianten mit dem Exon v6 exprimieren, in späteren Stadien der Karzinogenese (siehe Tabelle 4 und Abb. 24).

Der Erwerb des varianten CD44-Exons v6 könnte den Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen, da sich solche Varianten in zunehmendem Maße in den progressiveren Stadien der Tumorentwicklung (83% der metastasierenden Karzinome (Dukesstadium C und D) und alle untersuchten Metastasen) nachweisen lassen. Solch ein Selektionsvorteil könnte durch veränderte adhäsive Eigenschaften der Tumorzellen, bedingt durch diese CD44-Varianten, verursacht werden und zu einer Expansion der v6-positiven Zellen führen, die dann metastasieren. Dies würde bedeuten, daß auch in einem humanen Tumor, in Analogie zum Rattensystem, CD44-Varianten kausal am Metastasierungs geschehen beteiligt sind. Damit könnte der Nachweis solcher CD44-Varianten in Tumoren, bei denen im Patienten noch keine Metastasen nachgewiesen werden konnten (Dukesstadium A und B), einen Hinweis auf das Metastasierungspotential dieser Tumoren liefern und mögliche Therapieschemata beeinflussen.

Der Grund für das Auftreten neuer CD44-Spleißvarianten in den Karzinomen ist eine Störung im Spleißkontrollmechanismus der Tumorzellen (Hofmann et al., 1993). Ursache für diese Störung könnte die Expression eines mutierten *ras*-Genproduktes in den Tumoren sein. Diese Annahme wird durch die Tatsache bestärkt, daß in einem großen Prozentsatz kolorektaler Tumoren Mutationen im *ras*-Gen gefunden wurden (Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987). Außerdem konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die Überexpression von c-Ha-ras in klonierten embryonalen Rattenfibroblasten zu einer erhöhten CD44-Promotoraktivität und dem transienten Anstieg der Expression von CD44-Varianten im Verhältnis zur Gesamt-CD44-Expression führt (Hofmann et al., 1993). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Mutationen im *ras*-Gen zu frühen Zeitpunkten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese auftreten, während eine Expression von CD44-Varianten, die das Exon v6 enthalten, erst in späteren Stadien nachzuweisen ist (siehe Abb. 24). Im Moment liegen keine experimentellen Daten darüber vor, in welchem Prozentsatz der CD44-v6-exprimierenden Kolontumoren gleichzeitig eine Mutation im *ras*-Gen nachzuweisen ist, es ist

jedoch plausibel anzunehmen, daß die *ras*-Mutationen eine erhöhte CD44-Variantenexpression in einem Teil der Tumoren zur Folge haben.

Die prozentuale Zunahme von CD44-v6 positiven Tumoren im Verlauf der kolorektalen Tumorprogression ist ein starker Hinweis darauf, daß CD44-Varianten auch in humanen Tumoren kausal am Metastasierungs-geschehen beteiligt sind. Einen indirekten Nachweis für eine solche Kausalität können Überlebensanalysen der Tumorpatienten liefern. Für die hier untersuchten kolorektalen Tumoren waren solche Daten nicht verfügbar. Im Fall der Mammakarzinome konnte jedoch gezeigt werden, daß die Expression bestimmter CD44-Varianten mit dem Metastasierungs-potential der Primärtumoren korreliert.

#### **4.4 Die Expression bestimmter CD44-Varianten korreliert mit dem Metastasierungs-potential von Mammakarzinomen**

Verglichen mit anderen Malignomen ist das Mammakarzinom durch eine besonders große Tumorheterogenität charakterisiert (M. Kaufmann, 1991). Diese Tatsache erschwert die Prognose für die betreffenden Patientinnen. Um das individuelle Risiko einer Brustkrebspatientin besser abschätzen und eine Therapie entsprechend gestalten zu können, werden eine Reihe verschiedenster prognostischer Faktoren verwendet. Als wichtigster wird immer noch der axilläre Lymphknotenstatus der Patientin angesehen (Clark et al., 1983). Es gibt jedoch eine Reihe von Patienten, deren Krankheitsverlauf durch die "klassischen" Prognoseparameter nicht befriedigend vorhergesagt werden kann. Um so wichtiger wäre es, einen biologischen Marker auf den primären Tumorzellen zu identifizieren, mit dem das Metastasierungs-potential dieser Tumoren bestimmt werden könnte. Meine Arbeiten an Mammakarzinomen haben gezeigt, daß bestimmte CD44-Varianten solche Marker darstellen.

Die immunhistochemische Analyse von primären Mammakarzinomen hat ergeben, daß 90% dieser Tumoren CD44-Varianten exprimieren (nachgewiesen durch das polyklonale Serum Anti-CD44v3-v10). Im Gegensatz dazu konnte im normalen luminalen Epithel, dem Entstehungsgewebe dieser Tumoren, nur eine Expression der Standardform von CD44 nachgewiesen werden (Sinn et al., Manuskript eingereicht zur Publikation). Die Analyse der Tumoren mit den exonspezifischen Anti-CD44-mAks und -Seren hat ergeben, daß es signifikante Unterschiede in der Expression der verschiedenen varianten Exons in den primären Tumoren gibt (Tabelle 9). Dabei reagierten vor allem die Antikörper gegen die varianten Exons v3/v4, v6, v7 und v9/v10 mit einem geringeren Prozentsatz der Tumoren als die anderen Antikörper. Dies läßt den Schluß zu, daß in unterschiedlichen Tumoren

verschiedene CD44-Varianten exprimiert werden. Dies wird durch die RNA-Analyse von klinischem Tumormaterial bestätigt (Daten nicht gezeigt). Da in dem untersuchten Kollektiv ein repräsentativer Querschnitt aller histologischen Gradierungen enthalten war und der histologische Tumorgrad in signifikanter Weise mit dem Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen korreliert (Clark et al., 1983), kann man annehmen, daß in dem untersuchten Patientenkollektiv Primärtumoren mit unterschiedlichem Metastasierungspotential vorhanden waren. Die unterschiedliche Positivität der einzelnen Antikörper war somit ein erster Hinweis darauf, daß die Expression bestimmter CD44-Varianten mit den biologischen Eigenschaften der Tumorzellen korrelieren könnte.

Im Gegensatz zu den Primärtumoren zeigten die axillären Lymphknotenmetastasen in nahezu 100% der Fälle eine Reaktion mit den verwendeten variantenspezifischen Anti-CD44-Antikörpern, mit Ausnahme der mAks VFF16 und VFF17. Dies könnte bedeuten, daß ein gewisser Prozentsatz der Tumorzellen des Primärtumors, der bestimmte CD44-Varianten exprimiert, einen Selektionsvorteil bezüglich der Metastasierung besitzt und deshalb bevorzugt Metastasen bilden kann (siehe auch Expression in kolorektalen Tumoren). Somit könnte die Expression bestimmter CD44-Varianten in den Tumorzellen des Primärtumors Aufschluß über das Metastasierungspotential dieses Tumors geben.

Um Information über das Metastasierungspotential eines Primärtumors zu erhalten, wird der Überlebenszeitraum der Patientin nach der Entfernung des Primärtumors herangezogen. Da ein Patient in der Regel an den Folgen des Primärtumors, also an den Fernmetastasen, verstirbt, kann der postoperative Überlebenszeitraum als Maß für das Metastasierungspotential des Primärtumors angesehen werden. Will man nun eine Korrelation einer bestimmten Eigenschaft des Primärtumors (z.B. Tumorgrad oder Expression eines bestimmten Antigens) mit dem Metastasierungspotential dieses Tumors bestimmen, so kann man eine univariate Analyse nach der Methode von Kaplan und Meier (1958) ausführen. Dabei wird das Gesamtüberleben eines Patientenkollektivs in Bezug auf diese Tumoreigenschaft statistisch errechnet. Anhand der erhaltenen Überlebenskurven kann man dann beurteilen, ob diese Tumoreigenschaft eine prognostische Signifikanz für das Patientenkollektiv besitzt (Peto et al., 1977).

Die univariate Analyse der Überlebensrate der Brustkrebspatientinnen des von mir untersuchten Kollektivs hat ergeben, daß die Expression von CD44-Varianten, die die varianten Exons v3 bis v7 enthalten, in den Primärtumoren mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen invers korreliert. Die erhaltenen P-Werte für die Zufälligkeit der Überlebenskurven zeigen dabei zum Teil die gleiche Signifikanz wie die P-Werte von

"klassischen" Prognoseparametern (z.B.  $p=0,004$  für den axillären Lymphknotenstatus und die Expression einer CD44-Variante, nachgewiesen mit dem Serum Anti-DIII). Somit kann die Expression bestimmter CD44-Varianten als prognostischer Parameter für Mammakarzinome verwendet werden.

Wie die Experimente in einem Rattensystem zeigen konnten, sind CD44-Varianten, die das Exon v6 enthalten, maßgeblich am Metastasierungsprozeß beteiligt (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). Dabei scheint dieses Exon eine funktionelle Rolle bei der Metastasierung zu spielen, da ein mAk, der ein Epitop in diesem Exon erkennt, das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen entscheidend beeinflussen kann (Seiter et al., 1993; Herrlich et al., 1993). Auch in primären Mammakarzinomen werden solche Exon v6-enthaltenden CD44-Varianten exprimiert (nachgewiesen durch die Antikörper Anti-DIII und VFF7) und die Expression dieser Varianten korreliert invers mit dem Überleben der Patientinnen ( $p=0,004$  bzw. 0,03). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß dieses variante CD44-Exon auch in humanen Tumoren mit dem Metastasierungspotential der Tumorzellen in kausalem Zusammenhang steht.

#### 4.5 Ausblick

Zusammenfassend kann man feststellen, daß variante Formen von CD44 in hohem Maße in menschlichen Tumoren exprimiert werden, während ihre Expression auf wenige Normalgewebe beschränkt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, daß die Expression bestimmter CD44-Varianten sowohl mit der Aggressivität als auch mit dem Metastasierungspotential einiger Tumortypen in signifikanter Weise korreliert. Für einen der häufigsten und lebensbedrohlichsten Tumoren überhaupt, das Mammakarzinom, kann die Expression bestimmter CD44-Varianten als neuer prognostischer Faktor benutzt werden. Diese Ergebnisse lassen an verschiedene mögliche Anwendungen denken. So könnte der Nachweis der Expression von CD44-Varianten in der Tumordiagnostik eingesetzt werden, um z.B. Vorläuferstadien von Karzinomen (z.B. intestinale Metaplasien bei Magenkarzinomen) zu identifizieren. Der Nachweis der Expression des varianten Exons v6 in Primärtumoren könnte zudem die angewandten Therapieschemata beeinflussen (z.B. in Mammakarzinomen und Kolonkarzinomen).

Viel verlockender ist jedoch der Gedanke, die Anti-CD44-Varianten-Antikörper für die Tumordiagnose und Therapie *in vivo* ("Tumormaging" bzw. "Tumortargeting") zu benutzen. Das Prinzip ist dabei, daß der Antikörper als Sonde spezifisch an die Tumorzellen

bindet und über ein an ihn gekoppeltes Agens die Tumorzellen entweder zerstört (z.B. durch Toxine oder Zytostatika; Schrappe et al., 1992; Vitetta et al., 1991; Kreitman et al., 1993) oder durch extern angewandte Methoden sichtbar macht (Szintigraphie, Kernspinresonanz; Larson et al., 1991; Thomas et al., 1989; Greiner et al., 1993). Für eine Reihe von tumorassoziierten Antigenen wurden klinische Studien zur Behandlung von Tumoren oder zum Imaging der Tumoren bereits durchgeführt (Mulshine et al., 1991; Vitetta et al., 1991; Larson et al., 1991). Die von mir in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich bestimmte CD44-Varianten für die Durchführung solcher Methoden eignen und damit einen wichtigen Beitrag zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen liefern können.

## 5 Literaturverzeichnis

- Albelda, S. M. und Buck, C. A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-2880.
- Allen, R. W., Trach, K. A. und Hoch, J. A. (1987). Identification of the 37-kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262: 649-653.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332: 166-171.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., und 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. und Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61: 1303-1313.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R. und Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221.
- Battifora, H. und Kopinsky, M. (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J. Histochem. Cem.* 34: 1095-1100.
- Battifora, H. (1988). Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am. Pathol.* 12: 24-42.
- Bendicht, U. P., Augustin-Voss, H. G., El-Sabban, M. E., Johnson, R. C. und Hammer, D. A. (1990). Organ-preference of metastasis. *Cancer Met. Rev.* 9: 175-189.
- Berger, M. S., Locher, G. W., Saurer, S., Gullick, W. J., Waterfield, M. D., Groner, B. und Hynes, N. E. (1988). Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 48: 1238-1243.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. und Vogelstein, B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E. und Carter, W. G. (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* 113: 207-221.
- Carey, T.E., Takanashi, T. und Resnick, L.A. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 3278-3282.

- Carter, W.G. und 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.
- Chan, B. M. C., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B. R. und Hemler, M. E. (1991). In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 251: 1600-1602.
- Clark, G. M., McGuire, W. L., Hubay, C. A., Pearson, O. H. und Marshall, J. S. (1983). Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 309: 1343-1347.
- Cooper, D. L., Dougherty, G., Harn, H.-J., Jackson, S., Baptist, E. W., Byers, J., Datta, A., Phillips, G. und Isola, N. R. (1992). The complex CD44 transcriptional unit: alternative slicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182: 569-578.
- Correa, P., Haenszel, W. und Cuello, C. (1990). Gastric precancerous process in a high risk population: cross sectional studies. *Cancer Res.* 50: 4731-4736.
- Correa, P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - first american cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 52: 6735-6740.
- Delattre, P., Olschwang, S., Law, D. J., Melot, T., Remvikos, Y., Salmon, R. J., Sastre, X., Validire, P., Feinberg, A. P. und Thomas, G. (1989). Multiple genetic alterations distinguish distal from proximal colorectal cancer. *Lancet* 353: 356.
- Dougherty, G. J., Lansdorp, P. M., Cooper, D. L. und Humphries, R. K. (1991). Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 174: 1-5.
- Dukes, C. E. (1932). The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* 35: 323-332.
- Fearon, E. R. und Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56.
- Fidler, I. J., Gersten, D. M. und Hart, I. R. (1978). The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.* 28: 149-250.
- Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E. und Perucho, M. (1987). Detection of high incidence of k-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327: 298-303.
- Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D. und Birchmeier, W. (1991). E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113: 173-185.
- Gabbert, H., Wagner, R., Moll, R. und Gerharz, C.-D. (1985). Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin. Exp. Metastasis* 3: 257-279.

- Gehlsen K. R., Argraves, W. S., Pierschbacher, M. D. und Ruoslahti, E. (1988). Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J. Cell Biol.* 106: 925-930.
- Glisin, V., Crkvenjakov, R. und Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13: 2633.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F. H., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F. und 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.
- Goldstein, L. A. und 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.
- Goodfellow, P. N., Banting, G., Wiles, M. V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R. und 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.
- Greiner, J. W., Ullmann, C. D., Nieroda C., Qi, C.-F., Eggenesperger, D., Shimada, S., Steinberg, S. M. und Schlom, J. (1993). Improved radioimmunotherapeutic efficacy of an anticarcinoma monoclonal antibody (<sup>131</sup>I-CC49) when given in an combination with  $\gamma$ -interferon. *Cancer Res.* 53: 600-608.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. und Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hart, I. R., Goode, N. T. und Wilson, R. E. (1989). Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 989: 65-84.
- Harwerth, I.-M., Wels, W., Marte, B. M. und Hynes, N. (1992). Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J. Biol. Chem.* 267: 15160-15167.
- Haynes, B. F., Telen, M. J., Hale, L. P. und Denning, S. M. (1989). CD44 - a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today* 10: 423-428.
- Herrlich, P., Rudy, P., Hofmann, M., Arch, R., Zöller, M., Zawadzki, V., Tölg, C., Hekele, A., Koopman, G., Pals, S., Heider, K.-H., Sleeman, J. und Ponta, H. (1993). CD44 and splice variants of CD44 in normal differentiation and tumor progression. In: "Cell adhesion molecules". Hemler, M.E. und Mihich, E. (Eds.), Plenum Press, New York und London, pp. 265-288
- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P. und Günthert, U. (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 5292-5297.
- Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S. G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993). A link between RAS and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level

- expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.* 53: 1516-1521.
- Honn, K. V. und Tang, D. G. (1992). Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Met. Rev.* 11: 353-375.
- Horst, E., Meijer, C. J. L. M., Radaszkiewicz, T., van Dongen, J. J. M., Pieters, R., Figdor, C. G., Hooftmann, A. und Pals, S. T. (1990). Expression of a human homing receptor (CD44) in lymphoid malignancies and related stages of lymphoid development. *Leukemia* 4: 383.
- Howson, C. P., Hiyama, T. und Wynder, E. L. (1986). The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol. Rev.* 8: 1-27.
- Humphries, M. J., Olden, K. und Yamada, K. M. (1986). A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467-470.
- Hynes R. O. und Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68: 303-322.
- Idzerda, R. L., Carter, W. G., Nottenburg, C., Wayner, E. A., Gallatin, W. M. und St. John, T. (1989). Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4659-4663.
- Jackson, D. G., Buckley, J. und Bell, J. I. (1992). Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 267: 4732-4739.
- Jalkanen, S. und Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116: 817-825.
- Jalkanen, S., Steere, A., Fox, R. und Butcher, E. C. (1986). A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 233: 556-558.
- Jalkanen, S., Bargatze, R. F., de los Toyos, J. und 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., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. und Butcher, E. C. (1988). Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* 141: 1615-1623
- Jalkanen, S., Joensuu, H., Soderstrom, K.-O. und Klemi, P. (1991). Lymphocyte homing and clinical behaviour of non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Invest.* 87: 1835-1840.
- Jass, J. R. (1983). A classification of gastric dysplasia. *Histopath.* 7: 181-193.
- Jida, F. und Kusama, J. (1982). Gastric carcinoma and intestinal metaplasia. Significance of type of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. *Cancer* 50: 2854-2858.
- Kaplan, E. L. und Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.

- Kaufmann, M. (1991). Primäres Mammakarzinom; Aktueller Stand der Therapie. *TW Gynäkologie* 4: 298-307.
- Koopman, G., Heider, K.-H., Horst, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. T. (1993). Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904.
- Kramer, R. H. und Nicholson, G. L. (1979). Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: a model for metastatic invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5704-5708
- Kreitman, R. J., Hansen, H. J., Jones, A. L., FitzGerald, D. J., Goldenberg, D. M. und Pastan, I. (1993). *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res.* 53: 819-825.
- Kugelman, L.C., Ganguly, S., Haggerty, J.G., Weissman, S.M. und Milstone, L.M. (1992). The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J. Invest. Dermat.* 99: 887-891.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larson, S. M., Cheung, N.-K.V. und Leibel, S. A. (1991). Radioisotope conjugates. in: DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (eds.). *Biologic therapy of cancer*. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, pp. 496-511.
- Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta path. microbiol. scand.* 64: 31-49.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Matsumura, Y. und Tarin, D. (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340: 1053-1058.
- Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J. und Kincade, P.W. (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172: 69-75.
- Morson, B. C. und Dawson, I. M. (1979). *Gastrointestinal pathology*. 2nd ed. Blackwell, London.
- Mulshine, J. L., Magnani, J. L. und Linnoila, R. I. (1991). Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors. in: DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (eds.). *Biologic therapy of cancer*. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, pp. 563-588.
- Navarro, P., Gomez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M. und Cano, A. (1991). A role for E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115: 517-533.
- NCI-Klassifikation: The non-Hodgkin's lymphoma classification project: National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. (1982). *Cancer* 49: 2112.

- Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyon, P. H., Kato, I., Perez-Perez, G. I. und Blaser, H. J. (1991). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 325: 1132-1136.
- Nottenburg, C., Rees, G. und 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.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., Takeichi, M. und Mori, T. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecule in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 53: 1696-1701.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573.
- Pals, S. T., Horst, E., Ossekoppele, G. J., Figdor, C. C., Scheper, R. J. und Meyer, C. J. L. M. (1989a). Expression of lymphocyte homing receptor (CD44) as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 73: 995-998.
- Pals, S. T., Hogervorst, F., Keizer, G. D., Thepen, T., Horst, E. und Figdor, C. C. (1989b). Identification of a widely distributed 90-kDa glycoprotein that is homologous to the hermes-1 human lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143: 851-857.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. F., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., und Sikley, R. K. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325: 1127-1131.
- Peto, R., Pike, M. C., Armitage, P., Breslow, N. E., Cox, D. R., Howard, S. V., Mantel, N., McPherson, K., Peto, J. und Smith, P. G. (1977). Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. *Br. J. Cancer* 35: 1-39.
- Picker, L. J., Nakache, M. und Butcher, E. C. (1989). Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules in diverse cell types. *J. Cell Biol.* 109: 927-937.
- Piper, D. W. (1978). Stomach cancer. In: "Geneva: *International Union Against Cancer*". UICC Technical Report Series, Vol. 34.
- Poste, G. und Fidler, I. J. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283: 139-145.
- Raz, A., Hanna, N. und Fidler, I. J. (1981). In vivo isolation of a metastatic tumor cell variant involving selective and nonadaptive processes. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 183-189.
- Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H. und Herrlich, P. (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.* 53: 1262-1268.
- Ruoslahti, E. und Giancotti, F. G. (1989). Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells* 4: 119-126.

- Sainsbury, J.R.C., Farndon, J.A., Needham, G.K., Malcom, A.J. und Harris, A.L. (1987). Epidermal growth factor receptor status as a predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* 1: 1398-1402.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Schipper, J. H., Frixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K. und Birchmeier, W. (1991). E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: Inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 51: 6328-6337.
- Schrapppe, M., Bumol, T. F., Apelgren, L. D., Briggs, S. L., Koppel, G. A., Markowitz, D. D., Mueller, B. M. und Reisfeld, R. A. (1992). long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Res.* 52: 3838-3844.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. und 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.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. und 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. *J. Biol. Chem.* 268: 12235-12238.
- Seiter, S., Arch, R., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S. und Zöller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* 177: 443-455.
- Shearman, P. J., Gallatin, W. M. und Longnecker, B. M. (1980). Detection of a cell-surface antigen correlated with organ-specific metastasis. *Nature* 286: 267-269.
- Sipponen, P., Kekki, M., und Surala, M. (1983). Atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia in gastric carcinoma. Comparison with a representative population sample. *Cancer* 52: 1062-1068.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. und McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. und Press, M. F. (1989). Studies of HER/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Special report (1993). in: *Science* 259: 616-632.

- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M. und 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. und 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.
- Sugarbaker, E. V. (1981). in: "*Cancer Biology Reviews*", Vol. 2; Marchalonis, J. J., Hanna, M. G., Fidler, I. J. (eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 235-278.
- Sy, M. S., Guo, Y.-J. und 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. und Stamenkovic, I. (1992). Inhibition of tumor growth *in vivo* with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J. Exp. Med.* 176: 623-627.
- Tanabe, K. K., Ellis, L. M. und Saya, H. (1993). Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 341: 725-726.
- Thomas, G. D., Dykes, P. W. und Bradwell, A. R. (1989). Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling. In: Catty, D. (eds). *Antibodies*. IRL Press Oxford, pp. 223-244.
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.* 21: 1225-1229.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W. J. und Goodman, H. M. (1977). Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196: 1313.
- Underhill, C. (1992). CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell Science* 103: 293-299.
- Van Roy, F. und Mareel, M. (1992). Tumour invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends in Cell Biol.* 2: 163-169.
- Vitetta, E. S., Stone, M., Amlot, P., Fay, J., May, R., Till, M., Newman, J., Clark, P., Collins, R., Cunningham, D., Ghetie, V., Uhr, J. W. und Thorpe, P. E. (1991). Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 51: 4052-4058.
- Vlemingcx, K., Vakaet Jr., L., Mareel, M., Fiers, W. und Van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M. und Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319: 525-532.
- Vollmers, H. P., Stulle, K., Dämmrich, J., Pfaff, M., Papadopoulos, T., Betz, C., Saal, K., und Müller-Hermelink, H.-K. (1993). Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchow's Archiv B* 63: 335-343.

- Wang, C., Tammi, M. und Tammi, R. (1992). Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages. *Histochemistry* 98: 105-112.
- Weinstein, R. S., Merk, F. B. und Alroy, J. (1976). The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv. Cancer Res.* 23: 23-89.
- Yamada, K. M., Kennedy, D. W., Yamada, S. S., Gralnick, H., Chen, W.-T., Akiyama, S. K. und Olden, K. (1990). Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res.* 50: 4485-4496.



## 6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
A. dest.	destilliertes Wasser
AMV	Avian Myoblastosis Virus
APS	Adenosin 5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CBB R250	Commassie-Brilliant-Blau R250
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	alkalische Kälberdarmphosphatase
cpm	"counts per minute"
C-terminal	Carboxyterminal
CTP	Cytidintriphosphat
d	deoxy
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	"deleted in colorectal carcinoma"
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dT	Deoxythimidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	"enhanced chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	"fluorescence activated cell sorter"
FAP	"familial adenomatous polyposis"
f. c.	Endkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszin-Isothiozyanat
g	relative Beschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEV	"high endothelial venules"
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton

k- <i>ras</i>	Kirsten- <i>ras</i>
LB	Luria-Bertani Medium
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
Min.	Minute
mg	Milligramm
mM	millimolar
MOPS	Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NaAc	Natrium-Acetat
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
P-Wert	Wahrscheinlichkeitswert
rATP	Ribo-Adenosintri-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sek.	Sekunde
STB	Standard-Transformationspuffer
STE	NaCl-Tris-EDTA-Puffer
SSC	"standard saline citrat"-Puffer
SV 40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Trp	Tryptophan
U	Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLA	"very late activation"
w/v	Gewicht pro Volumen