

KfK 5227B

Juli 1993

**Spleißvarianten der
CD44-Membranproteinfamilie
sind Determinanten der
Metastasierung:
85 Aminosäuren einer Variante
des CD44-Moleküls reichen aus,
um diesen Prozeß zu induzieren**

W. Rudy
Institut für Genetik

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik

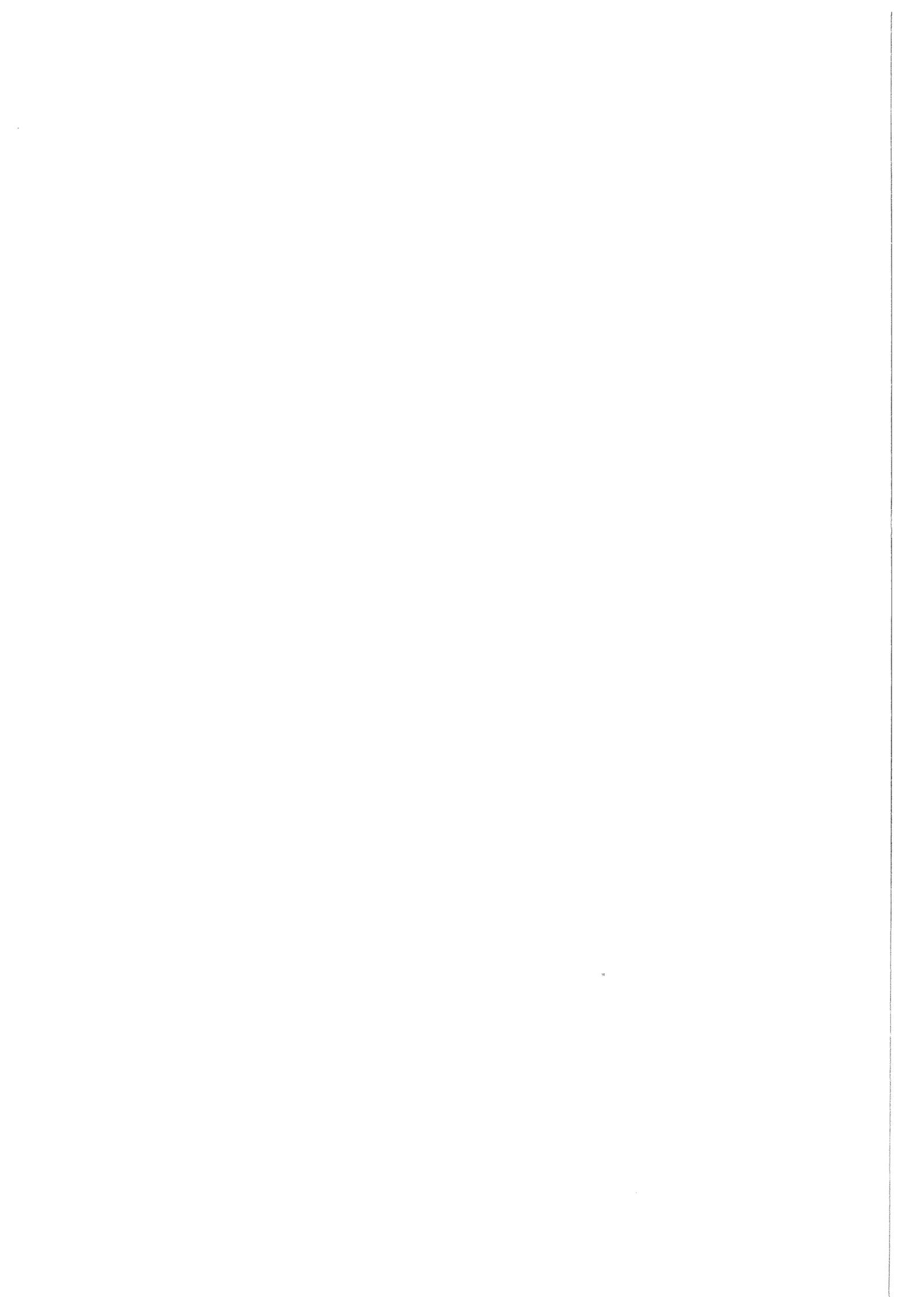
KfK 5227B

**Spleißvarianten der CD44-Membranproteinfamilie sind
Determinanten der Metastasierung:
85 Aminosäuren einer Variante des CD44-Moleküls
reichen aus, um diesen Prozeß zu induzieren**

Wolfgang Rudy

Dissertation
genehmigt von der
Fakultät für Bio-und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe



Zusammenfassung

Mit CD44 bezeichnet man eine Familie von Membranproteinen, die unter anderem bei so unterschiedlichen Prozessen wie der T-Zellaktivierung, der Lymphozyten-Rezirkulation und der Tumormetastasierung eine Rolle spielen. Diese Proteinfamilie besteht zum einen aus einer CD44-Grundform (CD44s) und zum anderen aus einer Reihe von Varianten, die zusätzlich zur Aminosäuresequenz von CD44s Insertionen unterschiedlicher Länge besitzen (CD44v).

Der CD44v-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) 1.1ASML erkennt vier CD44v-Isoformen unterschiedlichen Molekulargewichts auf der Zelloberfläche der metastasierenden Rattentumorzelllinie BSp73ASML. Eine dieser CD44v-Isoformen, Meta-1, die zusätzliche 162 Aminosäuren im extrazellulären Anteil von CD44s enthält, vermittelt nichtmetastasierenden Tumorzellen Metastasierungsfähigkeit.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die vier CD44v-Isoformen der BSp73ASML-Zelllinie Produkte eines alternativ gespleißten CD44-Primärtranskripts darstellen und durch N- und O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide sowie mit Neuraminsäure-Resten modifiziert sind.

Durch PCR-Amplifikation wurde eine zweite CD44v-Isoform, Meta-2, aus cDNA der BSp73ASML-Zelllinie isoliert. Meta-2 weist nur die 85 C-terminalen Aminosäuren des varianten Bereiches von Meta-1 auf und stellt somit die kleinste nachweisbare CD44v-Isoform der BSp73ASML-Zelllinie dar. Nach Transfektion und Expression in einer nichtmetastasierenden Zelllinie ist Meta-2 in der Lage, ebenso wie Meta-1, Metastasierungsfähigkeit zu induzieren.

CD44v Proteine konnten mittels immunhistochemischer Methoden auch auf verschiedenen normalen Zelltypen, z.B. auf Keratinozyten der Haut, auf Zellen an der Basis der Lieberkühnschen Darmkrypten und auf aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden.

Um mögliche Funktionen von CD44v-Isoformen, z.B. die Bindung eines spezifischen Liganden oder die Wechselwirkung mit Komponenten der extrazellulären Matrix, zu untersuchen, wurden mit gentechnischen Methoden lösliche, leicht nachweisbare Formen von Meta-1 und CD44s hergestellt. Mit diesen löslichen CD44-Proteinen (sog. Rezeptorglobulinen) konnte eine starke Bindung an Tumor-assoziierte Hyaluronsäure, jedoch nicht an andere Komponenten der extrazellulären Matrix, festgestellt werden.

Abstract

Splice variants of the CD44 family of membrane proteins are determinants of metastasis: 85 amino acids of a CD44 variant are sufficient to induce this process

The term CD44 describes a family of membrane proteins which are involved in a variety of processes including T-cell activation, lymphocyte-recirculation and tumor metastasis. These proteins include the CD44 standard form (CD44s) and numerous isoforms with additional amino acids inserted into the primary structure of CD44s (CD44v).

The CD44 specific antibody (mAk) 1.1ASML recognizes four CD44v isoforms differing in molecular weight on the cell surface of the metastatic rat cell line BSp73 ASML. One of these isoforms, Meta-1 has 162 additional amino acids in the extracellular portion of CD44s, and confers metastatic behavior onto non-metastatic tumor cells.

I have demonstrated that the CD44v-isoforms of the BSp73ASML cell line represent N- and O-glycosylated as well as sialylated products of an alternatively spliced CD44 primary transcript. Using PCR-amplification a second CD44v isoform, Meta-2, was isolated from BSp73ASML cDNA. Meta-2 contains only the the 85 C-terminal amino acids of the Meta-1 insertion and therefore represents the smallest detectable CD44v isoform of the BSp73ASML cell line. Upon transfection and expression, Meta-2 is also able to confer metastatic behavior onto locally growing tumor cells.

Using immunohistochemical methods CD44v proteins could also be identified on normal cells including keratinocytes of the skin, cells on the base of the crypts of Lieberkühn and activated lymphocytes.

To identify possible functions of CD44v isoforms (e.g. binding of a specific ligand or interaction with components of the extracellular matrix) soluble versions of Meta-1 and CD44s were produced using molecular biological methods. With these soluble CD44 proteins strong binding to tumor associated hyaluronan but not to other components of the extracellular matrix could be detected.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AMCA	7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Azetat
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure(n)
AS	BSp73AS
ASML	BSp73ASML
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CBB R250	Coomassie Brilliant Blau R250
CD	"Cluster of differentiation"
CD44E	Epitheliale Form von CD44
CD44H	Hämatopoetische Form von CD44
CD44s	CD44 Standardform
CD44v	CD44 Variante(n)
cDNA	complementäre DNA
CEA	"Carcinoembryonic Antigen"
c	zellulär
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
d	deoxy
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion

ABKÜRZUNGEN

ECL	Signalverstärkung durch Chemiluminiszenz ("enhanced chemiluminescence")
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f.c.	Endkonzentration ("final concentration")
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	relative Beschleunigung
G418	Geneticin
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
HEV	Venole mit hochprismatischem Endothel ("High Endothelial Venule")
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin des Isotyps G
kB	Kilobase (1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton (1000 Dalton)
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
m	Maus, murin
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
min.	Minuten
MOPS	Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	Boten RNA ("messenger RNA")
Mw	Molekulargewicht
N-CAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NP40	Nonidet P40
Ntd	Nukleotid(e)
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	Plasmid

ABKÜRZUNGEN

p	Protein
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction ")
PNA	"Peanut Agglutinin"
PNK	Polynukleotidkinase
r	Ratte
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	RNase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
sek.	Sekunde(n)
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
STB	Standard Transformationspuffer
Std.	Stunde
SV 40	Simian Virus 40
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N',- Tetramethyl-Ethylendiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tm	Tunicamycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Enzymeinheiten pro Mikroliter
V	Volt
Vol.	Volumen

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden	10
Material.....	10
1. Bezugsquellen.....	10
2. Bakterienstämme.....	10
3. Eukaryontische Zellen:Verwendete Zelllinien und ihre Kulturbedingungen.....	12
4.1 Oligonukleotide für die Klonierung von Rezeptorglobulinen.....	13
4.2 Oligonukleotide für die Amplifikation von CD44v-cDNAs.....	14
5. Plasmide	14
6. Plasmidkonstruktionen.....	15
6.1 Rezeptorglobulin-Konstrukte.....	15
6.2 Konstrukte für in vitro Protein-Expression	16
7. Antikörper und Rezeptorglobuline.....	16
7.1 Antikörper.....	16
7.2 Rezeptorglobuline.....	16
7.3 Sekundärantikörper	17
Methoden.....	18
1. Analyse von Nucleinsäuren	18
1.1 Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren	18
1.2 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (modifizierte Version der Methode von Birnboim und Doly, 1979)	18
1.3 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Qiagen-Methode)	18
1.4 Fragmentierung der DNA durch Restriktionsendonukleasen	19
1.5 Präparation von DNA-Fragmenten.....	19
2. Klonierungstechniken.....	19
2.1 Auffüllen überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase ("blunting")	19
2.2 Dephosphorylierung von DNA.....	19
2.3 Phosphorylierung von 5'-OH-Enden.....	19
2.4 Ligation von DNA	20
3. Sequenzierung von DNA	20
4. DNA-Gelelektrophorese	21
4.1 Agarose-Gelelektrophorese	21
4.2 "Low-melting"-Agarose-Gelelektrophorese	21
4.3 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
5. cDNA-Synthese mit nachfolgender PCR	22
5.1 cDNA-Synthese (Erststrangreaktion).....	22

INHALTSVERZEICHNIS

8.3 Transformation von Bakterien.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Der mAk 1.1ASML reagiert spezifisch mit vier CD44v-Proteinen der metastasierenden Zelllinie BSp73ASML.....	33
3.2 Alle CD44v-Moleküle der BSp73ASML-Zelllinie sind auf der Zellmembran lokalisiert.....	34
3.3 Die Expression von CD44v korreliert mit dem metastatischen Phänotyp.....	35
3.4 Die CD44v-Proteine der BSp73ASML-Zellen sind glykosyliert	39
3.5 Identifizierung der CD44v-Isoform Meta-1 in BSp73ASML-Zellen.....	45
3.6 Meta-2 - die kleinste CD44v-Isoform aus BSp73ASML-Zellen.....	49
3.6.1 Das Meta-2 Protein wird in BSp73ASML-Zellen exprimiert.....	51
3.6.2 Expression der CD44v-Isoform Meta-2 induziert Metastasierung in BSp73AS-Zellen.....	56
3.7 Dimerisierung von CD44v-Isoformen	57
3.8 CD44v-Isoformen werden auch auf normalem Rattengewebe exprimiert.....	60
CD44v kann auf dem Darmepithel der Ratte nachgewiesen werden	64
3.9 CD44-Rezeptorglobuline	67
3.9.1 CD44-Rezeptorglobuline werden synthetisiert und sezerniert.....	68
3.9.2 CD44-Rezeptorglobuline binden spezifisch an Darmepithel der Ratte	71
3.9.3 Tumorgewebe bildet ein optimales Substrat für CD44-Rezeptorglobuline	73
3.9.4 Die Bindung der Rezeptorglobuline an Tumorgewebe ist Hyaluronidase sensitiv.....	74
3.9.5 CD44-Rezeptorglobuline binden an Hyaluronsäure.....	75
4. Diskussion.....	80
Glykosylierung der CD44v-Proteine	80
CD44 und Tumorentstehung.....	82
CD44v-Isoformen.....	84
Mechanismen der Metastasierung von v6-positiven Zellen	85
5. Literaturverzeichnis.....	91

5.2 PCR-Amplifikation	22
6. Analyse von Proteinen	22
6.1 Präparation von Proteinextrakten.....	22
6.1.1 Extraktpräparation aus Zellen	22
6.1.2 Extraktpräparation aus Gewebe.....	23
6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE	23
6.2.1 2-D-Polyarylamid-Gelelektrophorese	23
1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (O'Farrell, 1975).....	23
2. Dimension: SDS-PAGE	23
6.2.2 Fixierung, Aktivierung und Trocknen von Gelen	24
6.3 Western-Analyse (modifizierte Version der Methode von Towbin et al., 1979).....	24
6.4 Detektion unterschiedlicher Oligosaccharidstrukturen glykosylierter Proteine durch Lektine.....	24
6.5 Enzymatische Iodierung von Membranproteinen <i>in vivo</i> (modifiziert nach Goding, 1980).....	25
6.5.1 Immunpräzipitation enzymatisch iodierter Membranproteine	25
6.5.2 Glykosidase-Behandlung enzymatisch iodierter Membranglyko- proteine.....	26
6.6 Metabolische Markierung von Proteinen <i>in vivo</i> durch Einbau von 35S- Methionin.....	26
6.6.1 Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung mit 35S-Methionin ...	27
6.7 <i>In vitro</i> Transkription mit nachfolgender Translation.....	27
6.8 Vergleich des Peptidmusters von Proteinen nach proteolytischem Verdau ("Peptide mapping").....	28
6.9 Immunfluoreszenzanalyse von Membranproteinen intakter Zellen.....	28
6.10 Immunhistochemie	28
6.11 Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie	29
7. Zellkultur	30
7.1 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen.....	30
7.2 Passagieren von eukaryontischen Zellen.....	31
7.3 Stabile Transfektionen von DNA in eukaryontische Zellen. (Calcium-Phosphat- Methode, Graham und van der Eb, 1973).....	31
7.4 Tunicamycin-Behandlung von Zellen.....	31
8. Kultivierung von Bakterien.....	32
8.1 Einfrieren von Bakterien	32
8.2 Präparation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983).....	32

1. Einleitung

Die Zellmembran eukaryontischer Zellen bildet das funktionell aktive Bindeglied zwischen Außen- und Innenmilieu der Zelle. Sie besteht aus einer Lipid-Doppelschicht in die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipidmolekülen eingelagert sind (Singer und Nicolson, 1972; Bretscher und Raff, 1975). Der Zellmembran können drei essentielle Funktionen zugeordnet werden:

1.) Sie stellt eine physikalische Barriere zwischen Extrazellularraum und Zytoplasma dar und hält somit die Bedingungen (z.B. die Ionenkonzentration) für biochemische Prozesse im Zytoplasma konstant (Gomperts, 1976).

2.) Die Zellmembran ist selektiv permeabel und aktiv beteiligt am Import von Nährstoffen und Ionen, am Export von Stoffwechselabfallprodukten sowie am Transport von anderen Molekülen, die für die Zelle lebensnotwendig sind (Finean et al., 1978; Sweadner und Goldin, 1980).

3.) Eine weitere wichtige Aufgabe der Zellmembran ist die Signaltransduktion von extrazellulären Signalen. Zellmembranrezeptoren dienen dabei als Empfänger externer Stimuli und modulieren gleichzeitig diese Botschaften in interne Signale (Cochran et al., 1983; Berridge, 1985; Cochran, 1985)

Während die Grundstruktur der Zellmembran durch die Lipid-Doppelschicht festgelegt ist, werden ihre spezifischen Aufgaben vorwiegend von Proteinen ausgeführt. Zu der Vielzahl von Reaktionen, die von solchen Proteinen vermittelt werden, gehört z.B. die Regulation der Zellteilung (Collett und Erikson, 1978), die Signaltransduktion (Berridge, 1985) und der Transport von Ionen (Gomperts, 1976; Finean et al., 1978) und Glukose (Finean et al., 1978). Auch für die Erkennung und Eliminierung von Fremdstoffen, Krankheitserregern und Virusinfizierten Körperzellen sind Membranproteine (auf B- und T-Lymphozyten des Immunsystems) verantwortlich. Dabei ist die enorme Diversität, die notwendig ist um jedes mögliche Antigen zu erkennen, in diesen Antigenrezeptoren der Immunzellen repräsentiert (Warner, 1974; Tonegawa, 1985). Proteine der Zellmembran spielen ebenfalls eine Rolle bei komplexen Vorgängen wie der Präsentation von körperfremden Molekülen an das Immunsystem (Klein et al., 1981), der Endozytose (Pastan und Willingham, 1981), der Signalperzeption von Sinnesreizen (Bownds, 1981), der Ausbildung von Aktionspotentialen bei Nervenzellen (Hodgkin und Huxley 1952) und der Zellmigration während der Embryogenese (Edelman, 1985) sowie beim Prozeß der Tumormetastasierung (Poste und Fidler, 1980; Nicolson 1982 und 1988; Van Roy und Mareel, 1992).

Aufgrund technischer Probleme, z.B. der schlechten Löslichkeit von Membranproteinen, war es jedoch für lange Zeit schwierig, diese Moleküle zu isolieren und ihre Funktion zu bestimmen. Als revolutionäres Hilfsmittel für die Charakterisierung von Membranproteinen und ihrer Funktion erwiesen sich monoklonale Antikörper (mAk; Köhler und Milstein, 1976; Milstein 1980; Yelton und Sharff, 1981). Diese Proteine werden von sog. Hybridomzellen, Zellfusionen aus einer Antikörper-produzierenden B-Zelle und einer Myelomzelle, produziert. Der Terminus monoklonal besagt, daß von jedem einzelnen Hybridom-Zellklon ein spezifischer (monoklonaler) Antikörper synthetisiert wird. Der entscheidende Vorteile dieser Moleküle ist, neben der unbegrenzten Verfügbarkeit, die hohe Spezifität gegenüber dem Antigen: Nur eine bestimmte antigene Determinante, ein sog. Epitop wird erkannt. Seit es möglich ist mAks gegen Membranproteine herzustellen, konnte eine Vielzahl von biologischen Funktionen dieser Proteine aufgeklärt werden.

Vor allem Oberflächenproteine von weißen Blutzellen (Leukozyten) konnten mit Hilfe von mAks intensiv untersucht werden. Dabei stellt die Identifizierung von Struktur und Funktion eines physiologisch essentiellen Membrankomplexes der T-Zellen, des T-Zell-Rezeptors, ein Musterbeispiel für die Aufklärung komplexer biologischen Prozesse durch mAks dar (Allison et al., 1982; Meuer et al., 1984). Mit Hilfe von mAks war es jedoch auch möglich den physiologischen Prozeß der Lymphozyten-Rezirkulation zwischen Blutgefäßsystem und sekundären lymphoiden Organen ("lymphocyte homing") aufzuklären (Kieran et al., 1989). Dabei konnten die für diesen Prozeß essentiellen lymphozytären Membranrezeptoren identifiziert werden. Einer dieser "lymphocyte homing-Rezeptoren" wurde, nach der internationalen Nomenklatur der Lymphozytenantigene, mit CD44 bezeichnet.

"Lymphocyte Homing"

Nichtaktivierte Lymphozyten zirkulieren auf der Suche nach Antigen ständig zwischen den Geweben der Organe und den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, lymphoides System des Magen-Darm-Trakts). Sie müssen dabei vom Blutgefäßsystem ins Lymphsystem überwechseln. Die Auswanderung der Lymphozyten ist jedoch nur in bestimmten Venolen von Lymphknoten, den HEVs ("high endothelial venules"), möglich, die ein spezielles, hochprismatisches Endothel aufweisen (Anderson et al., 1976; Kieran et al., 1989). Lymphozyten binden an das hochprismatische Endothel, veranlassen ein Auseinanderweichen der Endothelzellen und dringen zwischen den Endothelzellen in die subendotheliale Basalmembran ein (Gowans und Knight, 1964). Nach der Passage der Basalmembran wechseln sie in die benachbarten Lymphgefäße (Duijvestijn und Hamann, 1989; Kieran et al., 1989).

Mit Hilfe von mAks, die eine Bindung von Lymphozyten an das hochprismatische Endothel der HEVs blockieren, konnten auf Lymphozyten verschiedene Moleküle nachgewiesen werden, die

diese spezifische Adhäsion bewirken. Dabei vermittelt ein Molekül einer als Selektine bezeichneten Familie von integralen Membranproteinen die Bindung von Lymphozyten an das Kapillarendothel der peripheren Lymphknoten (L-Selektin) während die anderen Proteine (P-Selektin und E-Selektin) dieser Gruppe entscheidende Funktionen bei der Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an das Kapillarendothel und der Extravasation von neutrophilen Granulozyten bei Entzündungsreaktionen ausüben (Luscinskas et al., 1989; Hallman et al., 1991; Lawrence und Springer, 1991; Watson et al., 1991).

CD44 partizipiert, wie L-Selektin, an der Adhäsion von Lymphozyten an das hochprismatische Endothel von HEVs (Jalkanen et al., 1986 und 1987). Die Bindung von Lymphozyten an HEVs des Darm-assoziierten Lymphgewebes kann dabei mit einem Antikörper gegen CD44 (Hermes-3) nahezu vollständig blockiert werden (Jalkanen et al., 1987). Dieser mAk reagiert jedoch, im Gegensatz zu einem anderen CD44 spezifischen mAk (Hermes-1), nicht mit Lymphozyten, die an HEVs des peripheren Lymphgewebes binden (Jalkanen et al., 1986). Dies war einer der ersten Hinweise, daß strukturell und funktionell unterschiedliche Formen des "CD44 Lymphozyten Homing Rezeptors" existieren müssen.

CD44 - eine Proteinfamilie mit unterschiedlichen Modifikations- und Spleißformen

Die Klonierung der cDNA der sog. hämatopoetischen- oder Grundform des CD44 Membranglykoproteins gelang unabhängig voneinander verschiedenen Arbeitsgruppen (Goldstein et al., 1989; Idzerda et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989).

Als typisches Transmembranprotein besitzt CD44 N-terminal vom relativ umfangreichen extrazellulären Anteil ein Signalpeptid, das während der Reifung abgespalten wird. Das Protein wird durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und besitzt einen zytoplasmatischen Anteil (Stamenkovic et al., 1989; Goldstein et al., 1989). Der Konservierungsgrad zwischen CD44-Proteinen aus Mensch, Maus und Ratte beträgt 85% (Hofmann et al., 1991). Die 90 N-terminalen Aminosäuren zeigen starke Homologie zum "cartilage link protein" aus Huhn und Ratte sowie zum "cartilage link core protein" der Ratte (Goldstein et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989). Es ist bekannt, daß diese Proteine eine starke Affinität für Hyaluronsäure, einer der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix (ECM), besitzen (Doerge et al., 1986; Goetinck et al., 1987).

Das CD44-Protein wird hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen, Epithelzellen, sekretorischen Drüsen, glatten Muskelzellen und in der Haut exprimiert (Flanagan et al., 1989) und ist wie die meisten Membranproteine glykosyliert (Jalkanen et al., 1988; Flanagan et al., 1989; Brown et al., 1991). Durch chromatographische Karbohydratanalyse konnte ermittelt werden, daß ca. 30% des Molekulargewichts des humanen CD44 Moleküls auf N- bzw. O-

glykosidisch gebundene Oligosaccharidstrukturen zurückzuführen sind (Flanagan et al., 1989). In einigen Fällen konnte, zusätzlich zur Reaktion mit der charakteristischen 85-95 kD Form von CD44, eine Reaktion von CD44-spezifischen Antikörpern mit verschiedenen hochmolekularen Proteinen (Molekulargewicht zwischen 180 und 250 kD) festgestellt werden. Bei diesen, zur CD44-Grundform unterschiedlich modifizierten Molekülen, handelt es sich um CD44-Proteoglykane, die zusätzlich zu N- und O-glykosidisch gebundenen Zuckerketten Chondroitinsulfat bzw. Heparansulfat enthalten (Jalkanen et al., 1988; Brown et al., 1991). Die Grundform von CD44 und die verschiedenen "Modifikationsisoformen" dieses Membranglykoproteins bilden somit eine Proteinfamilie, die, aufgrund des gemeinsamen As-Grundgerüsts, unter der Bezeichnung CD44s (nach Standardform von CD44) zusammengefaßt wird.

Die Heterogenität der CD44-Proteine wird jedoch noch erhöht durch die Existenz von Isoformen, die zusätzlich zur Aminosäureprimärsequenz der CD44-Grundstruktur noch weitere Aminosäuren enthalten. Als biologischer Mechanismus für die Entstehung dieser Isoformen konnte alternatives Spleißen eines CD44-Primärtranskripts nachgewiesen werden (Brown et al., 1991; Dougherty et al., 1991; Günthert et al., 1991; Hofmann et al., 1991; Stamenkovic et al., 1991; Arch et al., 1992; He et al., 1992; Matsumura und Tarin, 1992; Rudy et al., 1993). Die verschiedenen CD44-Spleißformen wurden zur Abgrenzung von der CD44s-Proteinfamilie, aufgrund der Diversität ihres As-Grundgerüsts mit CD44v bezeichnet (nach Spleißvarianten von CD44)

Die Insertionsstelle der zusätzlichen As-Sequenzen bei CD44 befindet sich im extrazellulären, Membran-proximalen Anteil des Moleküls. Durch Analyse genomischer Klone von CD44 konnte festgestellt werden, daß die für die zusätzlichen Sequenzen von CD44 kodierende Region einen Bereich von ~ 25 kB des CD44-Genoms umfaßt und in zehn Exons, v1-v10, untergliedert ist (Screaton et al., 1992; Tölg et al., 1993).

Die von unserer Arbeitsgruppe aus einer cDNA-Expressionsbibliothek der metastasierenden Ratten-Pankreaskarzinom-Zelllinie BSp73ASML isolierte CD44-Variante Meta-1 enthält zusätzlich zur CD44s-Aminosäuresequenz 162 Aminosäuren im extrazellulären, Membran-proximalen Anteil, die von vier Exons (v4-v7) des CD44-Gens kodiert werden (Günthert et al., 1991; Tölg et al., 1993). Der für die Klonierung von Meta-1 verwendete mAk (1.1ASML) erkennt dabei ein Epitop, das von v6 kodiert wird. Im Vergleich zu CD44s sind darüberhinaus bei Meta-1, durch einen Spleißvorgang, 23 direkt an die Transmembrandomäne angrenzende Aminosäuren verloren gegangen.

Alternativ gespleißte CD44-Isoformen konnten jedoch nicht nur bei der Ratte identifiziert werden. Eine ganze Reihe dieser Isoformen wurde aus humanen Tumorzelllinien kloniert (Brown et al., 1991; Dougherty et al., 1991; Hofmann et al., 1991; Stamenkovic et al., 1991

Die bisher größte CD44-Spleißform stammt aus einem großzelligen Lungenkarzinom (sowie aus transformierten Keratinozyten) und enthält 338 Aminosäuren zusätzlich zu den Aminosäuren von CD44s im extrazellulären Bereich (Hofmann et al., 1991).

Physiologische Funktionen von CD44s

Der CD44s Rezeptor ist an mehreren physiologischen Prozessen beteiligt, die offensichtlich die Folge der strukturellen Heterogenität, aufgrund der differentiellen Modifikation dieses Membranproteins darstellen. Die Rolle des Kohlenhydratanteils dieser "Modifikationsisoformen" von CD44 an diesen Funktionen ist in den meisten Fällen bis jetzt noch unklar.

Oftmals konnte eine Beteiligung von CD44s-Proteinen an der Bindung von Zellen an Komponenten der ECM festgestellt werden (Gallatin et al., 1989; Culty et al., 1990; Miyake et al., 1990; Lesley et al., 1990; Arrufo et al., 1990; Culty et al., 1992; Jalkanen und Jalkanen, 1992). Die Subpopulation der Chondroitinsulfat-assoziierten CD44-Proteoglykane hat die Fähigkeit Fibronektin der ECM zu binden. Diese Bindung findet spezifisch über die Chondroitinsulfat-Seitenketten des CD44s-Moleküls mit dem C-Terminus des Fibronektin Moleküls statt (Jalkanen und Jalkanen, 1992). Eine Adhäsion an Kollagen konnte für CD44 bzw. für das CD44-Homolog ECMR III (Extrazellulärer Matrixrezeptor III) ebenfalls nachgewiesen werden (Gallatin et al., 1989).

Eine herausragende Eigenschaft von CD44s Proteinen ist die Bindung der ubiquitär verbreiteten ECM-Komponente Hyaluronsäure (Culty et al., 1990; Miyake et al., 1990; Lesley et al., 1990; Arrufo et al., 1990; Culty et al., 1992; Lesley et al., 1992). Hyaluronsäure besteht aus einer repetitiven Anordnung der Disaccharid-Einheit D-Glukuronsäure/N-Azetylglukosamin und ist z.B. an der Ausbildung einer lockeren, stark hydratisierten Form der ECM beteiligt (Iozzo, 1985, Knudson et al., 1989). Die Bindung von CD44 an dieses Polymer findet über die N-terminal lokalisierte Hyaluronsäure-Bindungsdomäne, vermutlich über positiv geladene As die zwischen einer charakteristischen, durch Disulfidbrücken stabilisierten "Loop-Struktur" lokalisiert sind, statt (Goldstein et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989).

Der Nachweis, daß eine spezifische Wechselwirkung von CD44s mit Hyaluronsäure erfolgt, wurde durch Blockierung der Bindung von CD44s-positiven Zellen an immobilisierte Hyaluronsäure mit CD44s-spezifischen mAbs bzw. durch Bindung einer löslichen Form von CD44s an Hyaluronsäure in Gewebeschnitten geliefert (Miyake et al., 1990; Arrufo et al., 1990). Die Hemmung durch die spezifischen Antikörper war dabei vergleichbar effizient wie die Kompetition der CD44-spezifischen Bindung durch Zugabe geringer Mengen exogener Hyaluronsäure oder die Hyaluronidase-Präinkubation der mit Hyaluronsäure beschichteten Kulturschalen (Miyake et al., 1990).

Analog zu der oftmals beobachteten Beteiligung von Transmembranrezeptoren an Signaltransduktionsvorgängen (Ushiro und Cohen, 1980; Elk et al., 1982; Cochran, 1985; Metcalf, 1985;), konnten auch bei CD44s, nach Aktivierung mit einem externen Stimulus, spezifische zelluläre Antworten nachgewiesen werden (Webb et al., 1990; Bazil und Horejsi, 1992; Gruber et al., 1992).

Dabei konnte z.B. mit CD44s-spezifischen Antikörpern die Sekretion der Zytokine Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β (Webb et al., 1990) und "macrophage colony stimulating factor" (Gruber et al., 1992) induziert werden. Offensichtlich imitieren die Antikörper die Bindung eines physiologischen Liganden an CD44s und setzen damit eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die letztendlich in der Sekretion der erwähnten Zytokine resultiert. Signaltransduktion via CD44s (in Verbindung mit anderen Membranproteinen) konnte ebenfalls bei der T-Zellaktivierung beobachtet werden (Huet et al., 1988; Shimizu et al., 1989; Denning et al., 1990; Rothman et al., 1991; Pieres et al., 1992). Mit einer Kombination von spezifischen mAbs gegen CD2, CD3 und CD44 wurde T-Zellproliferation, Induktion des Interleukin-2-Rezeptors auf T-Zellen und Sekretion von Interleukin-2 nachgewiesen. Die alleinige Inkubation mit einem dieser mAbs war nicht ausreichend um diese Prozesse in Gang zu setzen (Huet et al., 1988). Mit derselben Antikörperkombination konnte z.B. auch eine Stimulierung von peripheren Monocyten (Proliferation, Sekretion von Interleukin-1) beobachtet werden (Denning et al., 1990).

Spleißformen von CD44 induzieren Tumormetastasierung

Die unterschiedlichen Funktionen des CD44s-Proteins sind möglicherweise begründet in der differentiellen Modifikation des Aminosäuregrundgerüsts. Bei der CD44v-Proteinfamilie wird mit alternativem Spleißen ein anderer von Membranproteinen häufig genutzter Mechanismus gewählt um Diversität zu erzeugen. Von den bis zum heutigen Zeitpunkt gefundenen CD44v-Isoformen konnten einige auch funktionell charakterisiert werden (Günthert et al., 1991, Stamenkovic et al., 1991; Rudy et al., 1993). Dabei konnte als biologisch herausragende Eigenschaft bestimmter CD44v-Moleküle eine ursächliche Beteiligung am Prozeß der Tumormetastasierung festgestellt werden.

Die CD44v-Isoform Meta-1 wurde aus der metastasierenden Zelllinie BSp73ASML eines Rattenpankreaskarzinoms isoliert. Die Überexpression der CD44v-Isoform Meta-1 auf der nichtmetastasierenden BSp73AS-Zellen reicht aus um diesen Zellen Metastasierungsfähigkeit zu vermitteln, während die Überexpression des CD44s-Moleküls in derselben Zelllinie nicht in einer Erhöhung des Metastasierungspotentials resultiert (Günthert et al., 1991; Seiter et al., 1993). Die CD44v-induzierte Metastasierung ist keine Ausnahme des BSp73-Systems. Dies wurde durch zwei weitere Beobachtungen bestärkt:

--In einem zweiten Rattentumorsystem (Neri et al., 1982) wird CD44v, hauptsächlich auf Zelllinien stark exprimiert, die aus Metastasen isoliert wurden (Günthert et al., 1991).

--Transfektion der Meta-1-cDNA in eine nichtmetastasierende Fibrosarkomzelllinie der Ratte vermittelt auch diesen Zellen volle Metastasierungsfähigkeit (Hofmann et al., unveröffentlicht).

Die oben dargestellten Experimente zeigen, daß Meta-1 tatsächlich in der Lage ist, den metastatischen Phänotyp in nichtmetastasierenden Rezipientenzellen zu induzieren. Sie geben jedoch keinen Aufschluß darüber, ob Meta-1 die einzige CD44v-Isoform mit diesem biologischen Potential ist. Wie schon erwähnt wurde unterscheidet sich Meta-1 von CD44s durch die Insertion von 162 As, die von vier Exons kodiert werden. Es stellt sich die Frage nach der "Minimalinsertion" bzw. ob CD44v-Isoformen mit kürzeren Insertionen als Meta-1 existieren und noch in der Lage sind Metastasierung zu induzieren.

CD44v scheint jedoch nicht nur im Rattenmodellssystem, sondern auch während der Tumorprogression beim Menschen eine Rolle zu spielen. In Serienuntersuchungen von humanem Tumormaterial mit der PCR-Methode konnten bis zu neun verschiedene CD44v-Moleküle in malignem Gewebe identifiziert werden, jedoch keine in normalem Kontrollgewebe (Matsumura und Tarin, 1992). Im Prozeß der humanen Kolonkanzerogenese findet man eine Expression von CD44v ab dem Polypenstadium bis hin zu invasiven Karzinomen, während auf normalem Kolonepithel keine bzw. nur eine sehr schwache CD44v-Expression nachgewiesen werden kann (Heider et al., 1993).

Ungeklärt ist bis jetzt noch, welcher Mechanismus der "CD44v-induzierten Metastasierung" zugrunde liegt. Maligne Tumorzellen zeigen, im Vergleich zu nichtmetastasierenden, oftmals veränderte Adhäsionsfähigkeit zu Komponenten der ECM (Liotta, 1986). Möglicherweise besitzt die CD44v-Isoform Meta-1 geänderte Affinität zu Hyaluronsäure. Da bewiesen werden konnte, daß Hyaluronsäure das Wanderungsverhalten von Zellen beeinflussen kann (Turley, 1991; Turley et al., 1992), könnte die Aggressivität von CD44v-positiven Zellen auf eine Wechselwirkung mit dieser Matrixkomponente zurückzuführen sein. Ein Einfluß der zusätzlich inserierten Sequenzen ist ebenfalls nicht auszuschließen. So konnte die Metastasierung von BSp73ASML-Zellen und Meta-1-Transfektanten im Tierexperiment durch Koinjektion des CD44v-spezifischen mAbs 1.1ASML blockiert werden (Reber et al., 1990; Seiter et al., 1993). Es ist denkbar, daß der Antikörper eine Wechselwirkung des Meta-1-Proteins mit einem spezifischen (aktivierenden) Liganden über die zusätzliche Domäne des Meta-1-Moleküls verhindert. Sollte dies der Fall sein, dann müßte es möglich sein durch Injektion einer löslichen Version von Meta-1 die Metastasierung dieser CD44v-positiven Zellen durch Konkurrenz des Liganden *in vivo* zu blockieren. Einen weiteren Hinweis für die "Ligandentheorie" könnte die Tatsache darstellen, daß Lymphozyten und Makrophagen nach ihrer Aktivierung durch Antigenkontakt transient ebenfalls CD44v exprimieren. In dieser Phase verlassen die aktivierten Lymphozyten die Peripherie und wandern in die ableitenden Lymphknoten, um dort zu

proliferieren. BSp73ASML-Zellen und Meta-1-Transfektanten metastasieren über das Lymphsystem und beginnen mit der Proliferation ebenfalls in den ableitenden Lymphknoten (Arch et al., 1992; Seiter et al., 1993). Möglicherweise ist es das selbe externe Signal, das sowohl metastasierende Tumorzellen als auch Lymphozyten zur Proliferation anregt.

Zielsetzung der Arbeit

Die metastasierende Rattenzelllinie BSp73ASML exprimiert vier im Molekulargewicht unterschiedliche CD44v-Proteine (120, 150, 180 und 195 kD). Aus einer cDNA-Bibliothek dieser Zelllinie wurde die CD44v-Isoform Meta-1 isoliert, die Metastasierungsfähigkeit vermittelt.

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob es sich bei den vier Proteinen um unterschiedlich modifizierte Versionen einer gemeinsamen CD44v-Grundform, eventuell von Meta-1 handelt, oder ob die vier Proteine Produkte von vier verschiedenen Spleißvarianten des CD44-Primärtranskripts sind. Wenn der zweite Fall zutrifft, soll die Struktur und das Metastasierungspotential (nach Transfektion in eine nichtmetastasierende Rezipientenzelllinie) der verschiedenen CD44v-Isoformen aus BSp73ASML Zellen aufgeklärt werden.

Um die Funktion der CD44v Isoform Meta-1 bei der Tumormetastasierung zu untersuchen sollen lösliche Formen von Meta-1 und zur Kontrolle der Spezifität von Meta-1, von CD44s hergestellt werden. Mit diesen Molekülen soll ein möglicher Ligand von Meta-1 identifiziert bzw. die Wechselwirkung von Meta-1 mit Komponenten der ECM untersucht werden. Darüberhinaus soll mit dem löslichen Meta-1-Protein untersucht werden, ob es möglich ist die Metastasierung von Meta-1-Transfektanten im Tierversuch zu blockieren.

2. Material und Methoden

Material

1. Bezugsquellen

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AEC	Dako, Hamburg
Agarose (Typ II)	Appligene, Heidelberg
Agarose vom "low melting"-Typ	Appligene, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BCIP	Boehringer, Mannheim
BSA	Serva, Heidelberg
CHAPS	Boehringer, Mannheim
Chondroitinsulfat	Sigma, München
Coomassie Brilliant Blau R250	Bio Rad, Münchn
DIG Glycan Differentiation Kit	Boehringer, Mannheim
dNTP	Boehringer, Mannheim
ddNTP	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, München
DMEM	Gibco, Eggenstein
Eichproteine	Boehringer, Mannheim
Eichproteine, vorgefärbt	Bio Rad, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Eggenstein
Fibronektin	Sigma, München
G418	Gibco, Eggenstein
Glyzerin (doppelt dest.)	BRL, Neu-Isenburg

Glykogen	Boehringer, Mannheim
Hyaluronsäure	Sigma, München
Kollagen	Sigma, München
NBT	Boehringer, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio Rad, München
Nonidet P40	Bio Rad, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Protein G Agarose	Dianova, Hamburg
RPMI 1640	Gibco, Eggenstein
TEMED	Sigma, München
Tunicamycin	Boehringer, Mannheim
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
T3-RNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
AMV-Reverse Transkriptase	Stratagene, Heidelberg
Taq-Polymerase	Cetus, Frankfurt

Glykosidasen wurden ohne Ausnahme bei Boehringer (Mannheim) gekauft. Alle Radiochemikalien stammen von Amersham (Braunschweig).

2. Bakterienstämme

E.coli K12/DH5 α

F⁻; endA1; hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44; thi-1; λ ⁻; recA1; gyrA96; relA1

3. Eukaryontische Zellen: Verwendete Zelllinien und ihre Kulturbedingungen

BSp73AS (Matzku, 1983; Matzku et al., 1983)

Adhärenz wachsende Rattenzelllinie, isoliert aus dem Ascites eines spontanen Pankreasadenokarzinoms einer BDX-Ratte. Die Linie wurde adaptiert an die Bildung solider Tumoren in syngenen BDX-Ratten (AS: "ascites variant adapted to solid growth"). BSp73AS-Zellen wurden in RPMI-Medium, supplementiert mit 10 % FCS und Antibiotika, kultiviert.

BSp73ASML (Matzku, 1983; Matzku et al., 1983)

In Suspension wachsende Zelllinie, isoliert aus dem gleichen spontanen Pankreasadenokarzinom wie auch BSp73AS-Zellen. BSp73ASML-Zellen wurden durch wiederholte *in vivo*-Passagen der Ascites-Zellen und anschließende Reimplantation von Gewebe der so erhaltenen Lungenmetastasen gewonnen (ASML: "ascites variant adapted to solid growth metastasizing via the lymphatics"). BSp73ASML-Zellen wurden in RPMI-Medium, supplementiert mit 10 % FCS und Antibiotika, kultiviert.

BSp73AS-pSVMeta-1 (Günthert et al., 1991)

BSp73AS-Zelllinie, die stabil mit der cDNA der CD44v-Isoform Meta-1 transfiziert wurde. Die Meta-1-cDNA steht dabei unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors. PSVMeta-1-Transfektanten wachsen unter Zellkulturbedingungen adhärenz und metastasieren, vergleichbar mit BSp73ASML-Zellen, in die ableitenden Lymphknoten sowie in die Lunge nach subkutaner Injektion in syngene Ratten. BSp73AS-pSVMeta-1-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie BSp73AS-Zellen kultiviert, lediglich das Kulturmedium wurde mit 400 µg/ml G418 supplementiert.

BSp73AS-pSVMeta-2 (Rudy et al, 1993)

BSp73AS-Zellen, die stabil mit der cDNA der CD44v-Isoform Meta-2 unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors transfiziert wurden. PSVMeta-2-Transfektanten sind sowohl in ihrem Metastasierungsverhalten als auch in der Zellkultur vergleichbar mit der Zelllinie BSp73AS-pSVMeta-1.

Rat 2

Adhärenz wachsende, permanente Rattenfibroblastenlinie aus Fisher Ratten. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS und Antibiotika kultiviert.

Rat 2-pSV-Meta-1-rIgG2c

Rat 2-Zelllinie, die stabil mit der Meta-1-rIgG2c-cDNA unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors transfiziert wurde. Die Transfektanten unterscheiden sich morphologisch nicht von Rat 2 Zellen und sezernieren das Rezeptorglobulin (Meta-1-rIgG2c) in den Zellkulturüberstand. Die Zellen wurden in DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, Antibiotika und G418 (400 µg/ml), kultiviert. Rat 2-Zellen wurden ebenfalls mit den cDNAs der Rezeptorglobuline Meta-1-mIgG1, CD44s-rIgG2c und CD44s-mIgG1, jeweils unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors, stabil transfiziert. Alle Transfektanten wachsen in der Zellkultur unter den selben Bedingungen wie Rat 2-pSV-Meta-1-rIgG2c-Zellen, exprimieren das Rezeptorglobulin und sezernieren dieses Fusionsprotein in den Zellkulturüberstand.

MTPa; MTA; MTC; MTF7; MTLy; MTLn2; MTLn3

Die Zellen des Ratten-Mamma-Adenokarzinomsystems NF13762 (Neri et al., 1982) wurden in DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2mM L-Glutamin und Antibiotika, kultiviert. Die Zellen wachsen adhärent.

CREF; CREF-PH1; CREF-T24; CREF-59A; CREF-118S

Beim CREF-Zellsystem handelt es sich um klonierte, embryonale Rattenfibroblasten, die mit unterschiedlichen Versionen des aktivierten ras-Onkogen transformiert wurden (Boylan et al., 1990). Die Zelllinien dieses Systems wurden in DMEM, supplementiert mit 10 % FCS und Antibiotika, kultiviert. Die Zellen wachsen adhärent.

4.1 Oligonukleotide für die Klonierung von Rezeptorglobulinen**Meta-1-1313 (Ntd. 1313-1341 der Meta-1 Sequenz)**

- TGC AAG CTT CTC TGG AAT CTG AGG TCT CCT CGC AGG ACC - 3'
Hind III

Hinge sense-rIgG2c (Ntd. 290-324 der rIgG2c Sequenz)

- TGC AAG CTT GAG CCC AGA AGA CCC AAG CCC AGA CCC CCC ACA - 3'
Hind III

CH3 antisense-rIgG2c (Ntd. 1063-1092 der rIgG2c Sequenz)

- TGC GAA TTC AAT CTC ACA GGG TCC CAT CTC TGG GTG CTT - 3'
Eco R I

Rat CD44-5'ORF (Ntd. 103-131 der Meta-1 und CD44s Sequenz)

- GGA ATT CCT GCA CAT CAT GGA CAA GGT TTG GTG GC - 3'
Eco R I

Hinge sense-mIgG1 (Ntd. 738-769 der mIgG1 Sequenz)

- TAA GCT TGT GCC CAG GGA TTG TGC TTG TAA GCC TTG CA - 3'
Hind III

CH3 antisense-mIgG1 (Ntd. 1619-1649 der mIgG1 Sequenz)

- TCT CGA GTC ATT TAC CAG GAG AGT GGG AGA GGC TCT T - 3'
Xho I

4.2 Oligonukleotide für die Amplifikation von CD44v-cDNAs

Oligo A (Ntd. 362-385 der CD44s-Sequenz)

TTCATAGAAGGACACGTGGTAATC -3'

Oligo B (Ntd. 1132-1154 der CD44s-Sequenz)

CAGAGCTCCGGACCAGTTTAAGA -3

5. Plasmide

pBluescript SK (Stratagene)

Bei diesem Vektor handelt es sich um ein 2,95 kb großes Plasmid, in dem der Polylinker des Vektors pUC 19 durch einen synthetischen Polylinker mit 21 "unique" vorhandenen (nicht im Vektor vorkommenden) Restriktionsschnittstellen ersetzt wurde. Der Polylinker wurde in die N-terminale, codierende Region des β -Galaktosidasegens positioniert. Der Vektor besitzt beiderseits des Polylinkers Promotoren für Phagenpolymerasen (T3 und T7).

pBAT (Annweiler et al., 1991)

Hierbei handelt es sich um einen modifizierten pBlueskript KS Vektor mit einer zusätzlichen, zum 5'-Ende der β -Globin mRNA homologen Region (Kaninchen 3-Globin Leader ohne Initiationscodon), die in die KpnI Restriktionsschnittstelle (3' vom viralen T3-Promotor) des Polylinkers inseriert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die Insertion dieser Sequenz in die Polylinkerregion dieses Vektors die *in vitro* Expression klonierter Sequenzen steigern kann (Annweiler et al., 1991). Aus diesem Grund wurde dieses Plasmid auch für die Klonierung von DNA-Sequenzen verwendet, die *in vitro* synthetisiert werden sollten.

pSVT7

Eukaryontischer Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer-Region, β -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.

6. Plasmidkonstruktionen

6.1 Rezeptorglobulin-Konstrukte

pSVT7-Meta-1_{ex}-rIgG2c und pSVT7-CD44_{sex}-rIgG2c

Der extrazelluläre Anteil der Meta-1- (Ntd. 103-1341; Günthert et al., 1991) und der CD44s-cDNA (Ntd. 103-925; Hofmann, 1991) wurde durch PCR-Amplifikation unter der Verwendung der Oligonukleotide Rat CD44 5'-ORF und Meta-1-1313 amplifiziert. Mit der gleichen Methode wurde aus cDNA einer Rattenmilz die cDNA-Sequenz der schwere Kette eines Antikörpermoleküls der Ratte (Isotyp IgG2c; Brüggemann et al., 1987) zwischen den Positionen 290-1092, mit den Oligonukleotiden Hinge sense-rIgG2c und CH3 antisense-rIgG2c amplifiziert. Dies entspricht dem Bereich zwischen der Gelenk ("Hinge")-Region und dem konstanten Bereich-3 (CH3) der schweren Kette. Die überhängenden Enden der Amplifikationsprodukte wurden aufgefüllt, mit den Restriktionsenzymen geschnitten, deren Erkennungssequenzen in den "Amplifikationsprimern" enthalten sind (Rat CD44 5'-ORF-Oligo: EcoR I; Meta-1-1313-Oligo: Hind III; Hinge sense-Oligo-rIgG2c: Hind III; CH3 antisense-Oligo-rIgG2c: EcoR I) und in einen pBluescript-SK-Vektor, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde, inseriert. In den so erhaltenen Vektor pBluescript-SK-rIgG2c wurden anschließend die Meta-1- bzw. CD44s-Fragmente inseriert. Dazu wurde pBluescript-SK-rIgG2 mit Xho I verdaut und die überhängenden Enden des entstehenden linearisierten Plasmids wurden aufgefüllt ("blunting"). Nachfolgend wurde der Vektor mit Hind III nachgeschnitten. Die ebenfalls im pBluescript-SK-Vektor enthaltenen extrazellulären Sequenzen von CD44s (pBluescript-SK-CD44_{sex}) und Meta-1 (pBluescript-SK-Meta-1_{ex}) wurden mit Sma I (5' von der EcoRI Schnittstelle) und nachfolgend mit Hind III ausgeschnitten, über ein Agarosegel isoliert und in den Vektor pBluescript-SK-rIgG2c kloniert. Aus den so erhaltenen Vektoren pBluescript-SK-Meta-1_{ex}-rIgG2c und CD44_{sex}-rIgG2c wurde der Rezeptorglobulin-Anteil als EcoRI-Fragment isoliert und in einem mit EcoR I geschnittenen pSVT7-Vektor kloniert. pSVT7-CD44_{sex}-rIgG2c und pSVT7-Meta-1_{ex}-rIgG2c stellen die fertigen Rezeptorglobulin-Expressionsvektoren dar und wurden zur Expression der Rezeptorglobuline in eukaryontischen Zellen verwendet.

PSV-T7-Meta-1_{ex}-mIgG und pSVT7-CD44_{sex}-mIgG

Aus Maus Milz-cDNA wurden mit Hilfe der PCR die Sequenzen zwischen Pos. 738-1649 der schweren Kette eines murinen IgG1-Moleküls (Honjo et al., 1979), unter Verwendung der Oligonukleotide Hinge sense-mIgG1 und CH3 antisense-mIgG1, amplifiziert. Die überhängenden Enden des Amplifikationsprodukts wurden aufgefüllt und mit den Restriktionsenzymen geschnitten, deren Sequenzen in den Amplifikationsprimern enthalten sind (Hinge sense-Oligo-mIgG1: Hind III; CH3 antisense-Oligo-mIgG1: Xho I). Das so erhaltene Produkt wurde in den Vektor pBluescript-SK-Meta-1_{ex} bzw. pBluescript-SK-CD44_{sex} (Hind III, Xho I geschnitten) kloniert. Aus den so erhaltenen Plasmiden pBluescript-SK-Meta-1_{ex}-mIgG1 und pBluescript-SK-CD44_{sex}-mIgG1 wurde der Rezeptoglobulin-Anteil als EcoR I-Kpn I-Fragment isoliert. Die Kpn I-Schnittstelle wurde aufgefüllt und die Rezeptoglobulin-cDNA-Fragmente wurden in einen EcoR I und BamH I geschnittenen (die BamH I-Schnittstelle wurde ebenfalls aufgefüllt) pSVT7-Vektor kloniert. Die Plasmide pSVT7-Meta-1_{ex}-mIgG und pSVT7-CD44_{sex}-mIgG wurden ebenfalls zur Expression in eukaryontischen Zellen verwendet.

6.2 Konstrukte für *in vitro* Protein-Expression

pBAT-Meta-1 und pBAT-Meta-2

Die im pBluescript-SK-Vektor subklonierten cDNAs der CD44v-Isoformen Meta-1 (freundlicherweise von Dr. M. Hofmann zur Verfügung gestellt) und Meta-2 wurden als EcoR I-Fragmente isoliert. Die überhängenden Enden wurden aufgefüllt und die cDNA-Fragmente in die Sma I-Schnittstelle des pBAT-Vektors in "sense Orientierung" zum viralen T3-Promotor kloniert. Die so erhaltenen Plasmide pBAT-Meta-1 und pBAT-Meta-2 eignen sich zur *in vitro* Expression dieser cDNA-Sequenzen.

7. Antikörper und Rezeptorglobuline

7.1 Antikörper

1.1ASML (Matzku et al., 1989)

Der monoklonale Antikörper (mAk) 1.1ASML (Isotyp Maus IgG1) ist spezifisch für das Exon v6 der CD44v-Isoformen der Ratte. Durch Kompetitionsanalysen mit synthetischen Peptiden konnte das Epitop dieses Antikörpers relativ genau bestimmt werden (Fa. Bender, Wien). Es befindet sich in der extrazellulären, membranproximalen Region des Meta-1 Proteins zwischen Aminosäure 317 und 331. Isolierung und Charakterisierung des Antikörpers wurden beschrieben (Matzku et al., 1989).

Ox50

Dieser mAk (Isotyp Maus IgG1) ist spezifisch für die CD44-Standardform (CD44s) und für alle CD44v-Isoformen der Ratte. Der Antikörper erkennt ein Epitop in der extrazellulären, membrandistalen Region dieser Moleküle, das sich vor dem Insertionspunkt der varianten Aminosäuresequenzen befindet. Demnach ist es nicht möglich, mit diesem Antikörper zwischen CD44s- und CD44v-Proteinen zu unterscheiden.

3-9 (anti-TNP)

MAk (Isotyp: Maus IgG1), der gegen das Hapten Trinitrophenol (TNP), gekoppelt an ein Trägermolekül (Carrier) hergestellt wurde. TNP kommt nicht als immunogene Determinante in lebendem Gewebe vor. Dieser Antikörper wurde in einer Reihe von Experimenten als sog. Isotypkontrolle verwendet, d.h. es wurde kontrolliert, ob die Bindung eines bestimmten mAks (z.B. 1.1ASML, Ox50) spezifisch, oder lediglich auf eine Affinität des konstanten Fc-Anteils des gleichen Isotyps (Maus IgG1) zurückzuführen ist.

7.2 Rezeptorglobuline

Meta-1-mIgG1

Bei diesem Fusionsprotein wurde der extrazelluläre Anteil der CD44v Isoform Meta-1 an die schwere Kette eines Immunglobulins aus der Maus (Isotyp IgG1) gekoppelt. Solche Fusionsproteine werden auch als Rezeptorglobuline oder Immunoadhäsine bezeichnet (Capon et al., 1989; Arrufo et al., 1990). Nach stabiler Transfektion der Rezeptorglobulin cDNA in Rat 2-Zellen wurde diese unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors transkribiert und das

exprimierte Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert. Das sezernierte, chimäre Protein wurde, entweder als eingengt (1:10-1:20 durch Ammoniumsulfatfällung) Zellkulturüberstand, oder nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung über Protein G-Agarose verwendet.

CD44s-mIgG1

Bei diesem Rezeptorglobulin wurde die cDNA des CD44s-Moleküls an die cDNA der schweren Kette des Maus IgG1-Moleküls fusioniert (s.o.). Klonierung, Transfektion und Reinigung erfolgte wie unter 6.1 bzw. im Methodenteil (6.11.2) beschrieben wurde.

Meta-1-rIgG2c

Rezeptorglobulin aus dem extrazellulären Bereich des Meta-1 Moleküls und der schweren Kette eines Rattenantikörpermoleküls des Isotyps IgG2c (s.6.1.). Transfektion und Reinigung erfolgte wie unter 6.1 bzw. im Methodenteil (6.11.2) beschrieben wurde.

CD44s-rIgG2c

Rezeptorglobulin mit dem extrazellulären Bereich von CD44s, fusioniert an die schwere Kette eines Rattenantikörpers des Isotyps IgG2c. Konstruktion, Transfektion und Reinigung dieses IgG-Fusionsproteins erfolgte wie unter 6.1 bzw. im Methodenteil (6.11.2) beschrieben wurde.

7.3 Sekundärantikörper

TRITC (Rhodamin)-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-IgG

Polyklonales Kaninchen Antiserum, das gegen die schwere Kette von Maus-IgG und die leichte Kette von allen Maus-Immunglobulinen gerichtet ist. Das Antiserum ist mit dem Fluorochrom Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugiert. Das Antiserum wurde von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

Meerrettichperoxidase-konjugiertes Schaf-anti-Maus-IgG

Polyklonales Schafs Antiserum gegen Maus Immunglobulin. Die Schafe wurden mit gereinigten Immunglobulin Fraktionen aus Maus-Serum hyperimmunisiert. Das Antiserum wurde gegen humanes-, Ratten- und Kaninchen-Immunglobulin affinitätsadsorbiert, über eine anti Maus-IgG Säule gereinigt und mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Das Antiserum wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und für die ECL-Detektionsmethode in Westen Blot Experimenten verwendet.

Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG

Polyklonales Ziegen Antiserum, das mit der schweren Kette von Maus-IgG und der leichten Kette der meisten Maus-Immunglobuline reagiert. Das Antiserum wurde gegen humanes-, Ratten-, Rind- und Pferde- Immunglobulin affinitätsadsorbiert. Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG wurde von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

Methoden

1. 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.

1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht $50\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder $40\mu\text{g/ml}$ RNA. 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.

1.2 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 5 min. bei $5000 \times g$ sedimentiert und der Überstand bis auf einen Rest von 100 μl verworfen. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200 μl alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH, 1 % SDS). Nach vorsichtigem Mischen wurden 150 μl 3 M Natriumacetat zugegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die wässrige Oberphase (welche die DNA enthält) wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA wurde durch Zugabe des 2 1/2 fachen Volumens Ethanol ausgefällt (15 min. Inkubation auf Eis). Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (10 min. bei 4°C und $10000 \times g$) pelletiert, in 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 μl TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und 1/10 davon der Analyse durch Restriktionsenzym-Verdau unterzogen.

1.3 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 $5000 \times g$). Nachfolgend wurden die Bakterien in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, $10\mu\text{g/ml}$ 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 $20000 \times g$ 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 in TE gelöst. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt, die DNA nochmals gefällt und mit 70 % EtOH gewaschen. Abschließend wurde die DNA getrocknet und in sterilem TE aufgenommen.

1.4 Fragmentierung der 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.

1.5 Präparation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden in "low melting" Agarose Gelen aufgetrennt und die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde bei 65°C geschmolzen und für weitere 30 min. in 5 ml Elutip "low salt"-Puffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA) bei 65°C inkubiert. Eine Elutip DNA Säule wurde zwischenzeitlich mit 1 ml Elutip "high salt"-Puffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA) hydriert und nachfolgend mit 5 ml "low salt"-Puffer äquilibriert. Die Agarose-Lösung wurde dann über die Säule gegeben und die absorbierte DNA mit 3 ml "low salt"-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 400 µl "high salt"-Puffer eluiert und mit EtOH präzipitiert.

2. Klonierungstechniken

2.1 Auffüllen überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase ("blunting")

Um überhängende 3'-Enden aufzufüllen wurde T4-DNA-Polymerase eingesetzt. 1-5 µg DNA wurden in 1 x konzentriertem T4-Puffer (50 mM Tris pH 8, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM DTT) und in Anwesenheit von 250 µmol dNTPs mit 1U T4-Polymerase für 15 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine 5 min. Inkubation bei 65°C inaktiviert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde mit EtOH ausgefällt, einmal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in sterilem TE aufgenommen.

2.2 Dephosphorylierung von DNA

Für die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von linearisierter DNA wurde eine Phosphatasebehandlung durchgeführt. Dabei wurden ca. 3 pmol DNA in 1 x CIP-Puffer (100 mM Glyzin pH 10,5, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂) mit 10 U CIP (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm) für 60 min. bei 37°C inkubiert. Um die DNA anschließend von der Phosphatase zu reinigen, wurde die DNA auf einem "low melting"-Agarose-Gel elektrophoretisch von den Proteinen abgetrennt.

2.3 Phosphorylierung von 5'-OH-Enden

Freie 5'-OH-Enden wurden folgendermaßen phosphoryliert:
20 bis 100 pmol freie Enden wurden in einem Endvolumen von 20 µl in 1 x PNK-Puffer (70 mM Tris pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) in Anwesenheit von ATP (1 mM) mit 10-30 Enzymeinheiten PNK bei 37°C für 30 min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und anschließender Phenol-Chloroform Extraktion beendet.

2.4 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 1 x Ligasepuffer (20 mM Tris pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT) in Anwesenheit von 1 U T4-DNA-Ligase bei 15°C ü. N. inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Ligationsansatz teilweise transformiert (typischerweise 5 µl) und der verbleibende Rest bei -20°C eingefroren.

3. 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 genau nach den Angaben des Herstellers:

10 µg DNA wurden eingetrocknet, in 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA) gelöst und 5 min bei RT denaturiert. Die DNA wurde nach Neutralisation mit 4 µl 2 M NH₄Ac pH 4,5 mit 100 µl Ethanol bei -80°C gefällt (15 min), mit maximaler Drehzahl bei 4°C in der EPPENDORF-Zentrifuge abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die denaturierte DNA wurde in 8 µl Wasser gelöst, mit 2,5 µl 5 x 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 DTT, 2 µl 1:5 verdünnter "Labeling Mix" (1,5 mM dGTP, 1,5 mM dTTP, 1,5 mM dCTP), 1 µl α³⁵S-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 erwärmt. Je 3,5 µl aus der "Labeling Reaktion" wurden im zeitlichen Abstand von 1 min mit den "Terminationsmix" gemischt und weitere 5 min bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktionen mit je 4 µl 1 x Formamid-Ladepuffer ("SSB") abgestoppt wurden.

Vor dem Auftragen auf ein denaturierendes 8 % PA-Harnstoff-Sequenziergel wurden die Produkte 3 min auf 95°C erhitzt und auf Eiswasser abgeschreckt. Fixierung und Autoradiographie erfolgte wie unter "Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese" beschrieben.

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

4. DNA-Gelelektrophorese

4.1 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 1 x TAE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3) durch Kochen gelöst, verdampftes Wasser ersetzt und das Gel anschließend mit Ethidiumbromid (1 µg/ml, f.c.) versetzt. Die Agaroselösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt und dann in die Kammer gegossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

4.2 "Low-melting"-Agarose-Gelelektrophorese

Für die Präparation von DNA-Fragmenten wurden "low-melting"-Gele verwendet. Bei diesen Gelen wurde die herkömmliche Agarose durch eine niederschmelzende ("low-melting") Agarose ersetzt. Low-melting-Agarose kann bei 65°C vollständig verflüssigt und darin enthaltene DNA über Elutip-DNA-Minisäulen (s.1.5) aufgereinigt werden. Low-melting-Agarose-Gelelektrophorese wurde bei niedrigem Stromfluß (80 mA) durchgeführt um die Joule'sche Wärme zu begrenzen. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde die spezifische Bande aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 1.5 beschrieben aufgereinigt.

4.3 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 Gellmix (6 M Harnstoff, 7,75 % Acrylamid, 0,25 % Bisacrylamid in 1 x TBE: 90 mM Tris, 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 Glasplatten mit Repel-Silan (4 % Dichlordimethylsilan in Tetrachlorkohlenstoff) bzw. Haftsilan (0,3 % Silan GF 31, 0,3 % Essigsäure in Ethanol) ermöglicht es, die Gelplatten nach der Elektrophorese zu trennen und das Gel auf einer Seite zu fixieren. 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 durchgeführt, bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 Volt und ca. 20 mA. Nach dem Lauf wurde die mit Repel-Silan behandelte Glasplatte abgehoben und das auf der anderen Glasplatte haftende Gel durch Behandlung mit 10 % Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel gewaschen (um den Harnstoff zu entfernen) und eine Stunde bei 60°C getrocknet. Nach Abkühlen des Gels wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgte bei Raumtemperatur.

5. cDNA-Synthese mit nachfolgender PCR

5.1 cDNA-Synthese (Erststrangreaktion)

1 bis 3 µg poly A⁺-RNA, bzw. 10 µg Gesamt-RNA oder 0,1 µg linearisierte Plasmid-DNA wurden in 13 µl sterilem Wasser für 5 min. auf 65°C erhitzt und in Eiswasser abgeschreckt. Die denaturierte RNA wurde mit 2 µl 10 x reversem Transkriptase-Puffer (500 mM Tris pH 8,0, 60 mM MgCl₂, 400 mM KCl, 10 mM DTT), 2 µl 10 x dNTPs (15 mM), 1 µl RNasin und 1 µl (20 pmol) spezifischem Oligo versetzt. Die cDNA-Synthese wurde dann durch Zugabe von 1 µl AMV-Reverser Transkriptase (20-30 U) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Std. bei 41°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Reverse Transkriptase thermisch inaktiviert (3 min. bei 65°C) und der Reaktionsansatz mit sterilem TE auf 300 µl aufgefüllt.

5.2 PCR-Amplifikation

5 µl einer Erststrangreaktion (s. cDNA-Synthese) wurden mit je 250 ng 3'- und 5'-Amplifikationsprimern in 1 x PCR-Puffer in Gegenwart von 250 µM dNTPs gemischt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 100 µl erhöht und die Amplifikation durch Zugabe von 5 U Taq-Polymerase gestartet. Dabei wurden meist 35 Zyklen mit den folgenden Grenzwerten durchgeführt:

Denaturierung:	1 min.	bei 94,5°C
Annealing:	1-2 min.	bei 60-65°C
Extension:	3 min.	bei 72°C

Nach dem Ende der programmierten Zyklen wurden 10 µl der Reaktion auf einem Agarosegel analysiert.

6. Analyse von Proteinen

6.1 Präparation von Proteinextrakten

6.1.1 Extraktpräparation aus Zellen

Proteinextrakte aus Zellen wurden durch Lyse von ca. 1×10^7 Zellen in 500 µl Laemmli-Proteinprobenpuffer (2 % SDS, 0,1 M DTT, 620 mM Tris pH 6,8, 65 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau) hergestellt. Zur Herabsetzung der Viskosität und zur vollständigen Desintegration der Zellbestandteile wurde der Extrakt mit einem Ultraschall-Generator ("Branson-Sonifier") für 30 sek. bei voller Leistung sonifiziert. Durch Aufkochen des Extrakts (5 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 durch 15 minütige Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue (0,2 % CBB R250, 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) und anschließendem Entfärben (50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure; bis zur Sichtbarkeit der Banden) durch einen Vergleich mit einem Proteinlysat bekannter Konzentration bestimmt. Proteinproben wurden bei -20°C aufbewahrt und waren dort für Monate stabil.

6.1.2 Extraktpräparation aus Gewebe

Frisch präparierte, ca. 0,5 cm² große Gewebestücke wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Gewebestücke wurden in einem Mörser mechanisch zerkleinert, in 2 ml heißen (95°C) Laemmli-Proteinprobenpuffer überführt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator behandelt (~ 30 sek.). Die Proben wurden zentrifugiert (10 min., 12000 x g), der Überstand 5 min. bei 95°C aufgekocht und erneut zentrifugiert (10 min., 12000 x g). Das Sediment wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand (des fertigen Proteinlysats) wie unter 6.1.1 beschrieben bestimmt. Die Extrakte wurden bei -20°C aufbewahrt.

6.2 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 pH 8,8, 0,1 % SDS verwendet. Zum Start der Polymerisation wurde der Gellösung 8 µl TEMED/10 ml Gellösung und 0,1 % APS zugegeben. Nachfolgend wurde diese Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde mit ca. 200 µl 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 pH 6,8, 1 % SDS, 0,2 % TEMED, 0,1 % APS) auf das Trenngel gegossen. Anschließend an die Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoresekammer montiert und die Proteinproben wurden nach 5 min. erwärmen bei 37°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 30 mA und dann für weitere ca. 90 min. bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder mit CBB R250 gefärbt oder für den Western-Transfer montiert. Zur Analyse radioaktiv markierter Proteine wurde das Gel anschließend an die Elektrophorese fixiert, aktiviert und getrocknet wie unter 6.2.2 beschrieben.

6.2.1 2-D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE) aufgetrennt.

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (O'Farrell, 1975)

Die IEF erfolgte in 130 mm langen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 2,6 mm. Die Gellösung setzt sich zusammen aus 9M Harnstoff, 4 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid 28,38 % : 1,92 %), 2 % NP40, 3 % Ampholyte pH 3,5-6,0, 0,15 % TEMED und 0,1 % APS. Nach der Polymerisation wurde die Probe aufgetragen und mit einer Lösung aus Harnstoff (8M), NP40 (5 %) und Ampholyten pH 3,5-6 (1 %) überschichtet. Als Laufpuffer für die Anode wurde entgaste 10 mM Iminodiessigsäure, als Kathodenlaufpuffer 10 mM Ethylendiamin verwendet. Die Elektrophorese wurde so durchgeführt, daß das Produkt aus Laufzeit und angelegter Spannung 5000-10000 V/Std. betrug. Die angelegte Endspannung betrug 600 Volt. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele mit einer Spritze aus den Glasröhrchen gedrückt, 30 min. in 1x Laemmli-Proteinprobenpuffer äquilibriert und sofort in der 2. Dimension aufgetrennt.

2. Dimension: SDS-PAGE

In der zweiten Dimension wurde eine konventionelle SDS-Polyacrylamidelektrophorese durchgeführt (s. 6.2). Die SDS-PA-Gele wurden zwischen speziell abgeschrägt zugeschnittene Glasplatten gegossen und die Gele der 1. Dimension mit Hilfe von 1 % Agaroselösung auf das Sammelgel gebettet. Die Elektrophorese wurde mit Proteinlaufpuffer nach Laemmli bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Abschließend wurden die Gele fixiert, getrocknet und autoradiographiert.

6.2.2 Fixierung, Aktivierung und Trocknen von Gelen

Nach Ende der Elektrophorese wurde das SDS-Gel für 20 min. in 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure fixiert. Zur Verstärkung des Signals ³⁵S-markierter Proteine wurde das Gel nach der Fixierung durch eine 25 minütige Behandlung mit 1 M Na-Salicylat in 30 % Methanol aktiviert. Anschließend wurden die SDS-Gele auf einem Geltrockner der Firma Bio Rad unter Vakuum bei 80°C getrocknet (20-90 min. je nach Dicke und Größe des Gels).

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

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele für ca. 20 min. in HMW (high molecular weight)-Western Blot-Transferpuffer (50 mM Tris Base, 380 mM Glyzin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert, in H₂O_d gewaschen und auf ein in Transferpuffer äquilibriertes 3MM-Filterpapier überführt. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und mit einem weiteren, in Transferpuffer angefeuchteten, 3MM-Papier bedeckt. Nachdem Entfernen von Luftblasen wurde dieser "Sandwich-Aufbau" zwischen zwei Nylonschwämmen in die Halterung der Transferkammer montiert und der gesamte Aufbau in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingepaßt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei ca. 320 mA (ca. 25 Volt mit der Trans-Blot-Kammer der Firma Bio Rad) mit HMW-Transferpuffer. Nach Beendigung des Transfers wurde die Lage des Gels auf der PVDF-Membran genau indiziert und die Membran in PBS (2 x 1 min.) gewaschen. Die Membran wurde dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde mit 10 %iger, fettfreier Milch (in PBS) bei 37°C inkubiert. Vor Zugabe des Primäantikörpers wurde die Membran erneut in PBS gewaschen (2 x 1 min.). Die Inkubation der Membran mit dem Primäantikörper erfolgte typischerweise in einer Konzentration von 5 µg/ml Hybridisierungslösung (5 % fettfreie Milch in PBS, 0,3 % Tween 20) für 1 Stunde bei RT. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min. gewaschen (PBS, 0,3 % Tween 20) und mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten-Sekundär-Antikörper (1:5000 verdünnt in Hybridisierungslösung) für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen (4 x 10 min. in PBS, 0,3 % Tween 20) wurden die vom Primäantikörper spezifisch erkannten Proteine mittels der "ECL-Detektion" der Fa. Amersham visualisiert. Bei dieser Detektionsmethode wird ein zyklisches Diazylhydrazid (Luminol, Lösung 1) durch O₂²⁻-Ionen, welche bei dem Meerrettichperoxidase (gebunden an den Sekundäantikörper)-katalysierten Umsatz von H₂O₂ (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 1 min. aufgelegt. Die Signalstärke nach einer Minute war ein Maß für eine längere oder kürzere Exposition eines Röntgenfilms auf die Membran.

6.4 Detektion unterschiedlicher Oligosaccharidstrukturen glykosylierter Proteine durch Lektine

Für diese Methode wurde der "DIG Glycan Differentiation Kit" von Boehringer verwendet. Dabei wurden affinitätschromatographisch gereinigte Glykoproteine wie unter 6.3 beschrieben von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 1 min. in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen und dann zur Blockierung unspezifischer Bindung für 1 Stunde in 0,5 g BSA/100 ml TBS (pH 7,5) inkubiert. Nach Waschen der Membran in TBS (2 x jeweils 10 min.) und 1 x 10 min. in Puffer 1 (jeweils 1 mM MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂ in TBS) erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden DIG-(Digoxigenin) markierten Lektinen für 1 Stunde bei RT. Dabei wurden jeweils 2 µg/ml Puffer 1 der Lektine GNA, SNA und DSA, sowie 10 µg/ml- bzw. 20 µg/ml Puffer 1 der Lektine MAA und PNA eingesetzt. Nach erneuten Waschen der Membran (3 x 10 min. in TBS)

erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Digoxigenin konjugiert mit alkalischer Phosphatase; 1:1000 verdünnt in Puffer 1) für 1 Std. bei RT. Anschließend wurde die Membran ein letztes Mal in TBS gewaschen (3 x 10 min.). Die spezifischen Glykoproteine wurden mit der NBT/BCIP-Detektion visualisiert. Dabei wurden 50 ml NBT (4-Nitroblau-tetrazolium-chlorid und 37,5 ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) in 10 ml Puffer 2 verdünnt und die Membran bis zum sichtbar werden der spezifischen Banden in dieser Färbelösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran in H₂O gestoppt. Abschließend wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet und fotografiert.

6.5 Enzymatische Iodinierung von Membranproteinen *in vivo* (modifiziert nach Goding, 1980)

Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, vorsichtig mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgeschabt und nachfolgend gezählt. Für eine Iodinierungsreaktion wurden 1 x 10⁷ Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und 0,5 mCi Na¹²⁵I sowie 10 µl Lactoperoxidase (1 µg/ml) zugegeben. Die enzymatische Iodinierung wurde durch Zugabe von 10 µl H₂O₂ (1:10000, verdünnt in PBS) und vorsichtigem Mischen gestartet. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT wurde dieser Schritt noch zweimal wiederholt (H₂O₂ 1:3000 und 1:1000 verdünnt). Die Reaktion wurde durch 3 maliges Waschen der Zellen mit 500 µl eiskalter Stopplösung (PBS, 5 mM NaI) beendet.

6.5.1 Immunpräzipitation enzymatisch iodinierter Membranproteine

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 500 µl eiskaltem Lysispuffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, pH 7,0) resuspendiert und durch eine 30 minütige Inkubation auf Eis lysiert. Zellkerne und unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (12000 x g, 15 min.) und der Überstand (der die radioaktiv markierten Membranproteine enthält) durch Inkubation mit 50 µl Protein G-Agarose (1:1-Suspension in Lysispuffer) vorgereinigt (30 min., 4°C, auf einer rotierenden Plattform). Die Protein G-Agarose wurde abzentrifugiert und der Primärantikörper (5 µg/ml Zellysat) zum Überstand zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden 30 µl Protein G-Agarose (1:1-Suspension in Lysispuffer) zum Zellysat zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert (auf einer rotierenden Plattform). Im nächsten Schritt wurde der Protein G-Agarose-Komplex (Protein G-Agarose mit gebundenem Antikörper und Antigen) abzentrifugiert (ca. 10 sek. in einer Eppendorf Zentrifuge bei 12000 x g) und der Überstand (das Zellysat) verworfen. Der Protein G-Agarose-Komplex wurde 4 x mit Lysispuffer gewaschen (ca. 30 sek.), zur Abtrennung der Protein G-Agarose und zur Denaturierung der gereinigten Membranproteine, mit Laemmli Proteinprobenpuffer aufgekocht (5 min. 95°C), abzentrifugiert (10 sek. in einer Eppendorf Zentrifuge bei 12000 x g) und der Überstand (die radioaktiv markierten Proteine) auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Nach der Auftrennung des Immunpräzipitats auf dem Gel wurde das SDS-Gel für 20 min. fixiert, getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt.

6.5.2 Glykosidase-Behandlung enzymatisch iodinierter Membranglykoproteine

Um Aufschluß über die Glykosylierung der Membranproteine zu gewinnen wurden immunpräzipitierte, iodinierte Membranproteine noch gebunden an Protein G-Agarose mit verschiedenen Glykosidasen, entsprechend den Vorschriften des Herstellers, inkubiert.

Verdau mit N-Glykosidase F

Das Protein G-Agarose-Sediment wurde zunächst für 5 min. bei 95°C in 41 µl Inkubationspuffer (Natriumacetat 50 mM pH 5,0, EDTA 10 mM, Triton X 100 1 %; SDS 0,1 %; 2-Mercaptoethanol 1 %) aufgekocht, dann abzentrifugiert und der Überstand (mit den radioaktiv markierten Proteinen) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf 4°C abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden zu diesem Ansatz nachfolgend 2 µl einer 25 %igen Stocklösung CHAPS (1 % f.c.), 1 µl NP40 (2 % f.c.) und 6 µl (0,3U) N-Glykosidase F zugegeben und für 2 Std. bei 37°C inkubiert.

Verdau mit Neuraminidase

Das Protein G-Agarose-Sediment wurde in 40 µl PBS resuspendiert, 10 µl Neuraminidase (5mU) wurden zugegeben und der Ansatz für 2 Std. bei 37°C inkubiert.

Verdau mit O-Glykosidase

Der Verdau wurde zunächst wie unter b.) beschrieben durchgeführt (endständige Neuraminsäurereste hemmen die O-Glykosidase), dann wurden für weitere 2 Std bei 37°C 10 µl (5mU) O-Glykosidase zugegeben.

Chondroitinase ABC

Das Protein G-Agarose Sediment wurde in 40 µl Inkubationspuffer (40 mM Tris, 40 mM Natriumacetat pH 8,0) resuspendiert, dann wurden 10 µl (0,1U) Enzym zugegeben. Der Verdau wurde für 2 Std. bei 37°C durchgeführt.

Um eine Komplexbildung (z.B. Dimerisierung) eines immunpräzipitierten Proteins nachzuweisen wurde das Protein G-Agarose-Sediment zunächst in 50 µl Proteinprobenpuffer aufgekocht (5 min. 95°C) und dann 2 Std. mit dem stark denaturierenden Agens Guanidin-Hydrochlorid (4 M f.c.) bei 37°C inkubiert.

Die enzymatischen Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 µl 2 x Proteinprobenpuffer gestoppt. Die Proben wurden für 5 min. bei 95°C aufgekocht und nachfolgend auf einem SDS - Gel aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, getrocknet und autoradiographiert.

6.6 Metabolische Markierung von Proteinen *in vivo* durch Einbau von ³⁵S-Methionin.

Für eine *in vivo* Proteinmarkierung wurden 5 x 10⁶ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale 2 x mit PBS gewaschen und nachfolgend für 90 min. in 2 ml Methionin-freiem Medium (mit 10 % dialysiertem FCS) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen erneut 2 x mit PBS (ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺) gewaschen und für 20 min. trypsiniert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Methionin-freiem Medium resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. ³⁵S-Methionin (1mCi/ml Medium) wurde zugegeben und die Zellen für 6 Stunden bei 37°C in einem Schüttler, in Gegenwart von CO₂ um eine Alkalisierung des Mediums zu vermeiden, inkubiert. Nach der radioaktiven Markierung wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min., 2000 x g), der Überstand verworfen und nicht eingebautes Methionin durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS entfernt.

6.6.1 Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung mit ^{35}S -Methionin

Die Immunpräzipitation wurde mit Ausnahme des letzten Waschschrittes (nach der Inkubation mit Protein G-Agarose) analog zu der unter 6.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Da bei der metabolischen Markierung mit ^{35}S -Methionin nicht nur Membranproteine sondern alle zellulären Proteine, die die Aminosäure Methionin enthalten, radioaktiv markiert werden, wurde dieser letzte Waschschritt mit höherer Stringenz durchgeführt. Das Protein G-Agarose-Sediment wurde 5 x für 3 min. auf einem Eppendorf Schüttler mit Lysispuffer gewaschen, in Proteinprobenpuffer aufgekocht (5 min., 95°C) und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese fixiert, zur Signalverstärkung aktiviert, getrocknet und fluorographiert (bei -80°C).

6.7 *In vitro* Transkription mit nachfolgender Translation

DNA der pBAT Plasmid-Konstrukte (Annweiler et al., 1991) wurden 3' von der Insertionsstelle der cDNA linearisiert, auf einem "low melting Agarose" DNA Gel aufgetrennt und über eine Elutip-DNA Säule gereinigt (s. 1.5) Die *in vitro* Transkription dieser Sequenz wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

H ₂ O	65,9 μl
HEPES - KOH (1M, pH 7,4)	4,0 μl
Mg(OAc) ₂	0,6 μl
Spermidin (200 mM)	1,0 μl
DTT (1M)	1,0 μl
rNTPs (25 mM)	2,0 μl
7mG(5')G (10 mM)	2,5 μl
RNasin (20U/ μl)	1,0 μl
T3-RNA-Polymerase (10U/ μl)	2,0 μl
Linearisierte Plasmid-DNA (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	20,0 μl

Die Reagentien wurden auf Eis zusammenpipettiert und der Ansatz für 1 Stunde bei 40°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 8 μl der Reaktion für die Translation abgenommen, die restlichen 92 μl aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die *in vitro* Translation wurde direkt nach der Transkription nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

H ₂ O	14,2 μl
HEPES - KOH (1 M, pH 7,9)	2,0 μl
Mg(OAc) ₂ (0,2 M)	0,8 μl
Aminosäuren (1mM, nicht radioaktiv)	2,0 μl
ATP (50 mM)	2,0 μl
GTP (1mM)	2,0 μl
S-Adenosylmethionin (0,5 mM)	1,0 μl
Kreatinphosphat (0,5 M)	2,0 μl
Kreatinphosphatkinase (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1,0 μl
Weizenkeimlysat	40,0 μl
^{35}S -Methionin (10 mCi/ml)	8,0 μl
<i>In vitro</i> transkribierte RNA	8,0 μl
RM-KN-Puffer	1,0 μl
EGTA (10 mM)	1,0 μl
SRP	2,0 μl

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Std. bei 25°C inkubiert. Die Translation wurde durch Zugabe desselben Volumens (100 μl) 2 x Laemmli-Proteinprobenpuffer beendet, zur Denaturierung des *in vitro* synthetisierten Proteins 5 min. bei 95°C erhitzt und nachfolgend auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel fixiert, aktiviert, getrocknet und bei -80°C fluorographiert.

6.8 Vergleich des Peptidmusters von Proteinen nach proteolytischem Verdau ("Peptide mapping"; mod. Version der Methode von Cleveland et al., 1977)

Radioaktiv markierte Proteine (nach Immunpräzipitation oder *in vitro* Translation) wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese fixiert, aktiviert und getrocknet. Nachdem Trocknen wurde das Gel an 3 Punkten mit fluoreszierenden Aufklebern markiert, und ein Röntgenfilm wurde exponiert. Nach erfolgter Fluorographie wurden die den spezifischen Proteinen entsprechenden geschwärzten Banden auf dem Röntgenfilm ausgeschnitten und der Röntgenfilm (als Schablone) anhand der Fluoreszenzmarkierung exakt über das Gel justiert. Die spezifischen Banden konnten nun mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert, und in die Taschen eines neuen SDS-Gels, dessen Trenngel zusätzlich 1 mM EDTA enthielt, transferiert werden. Die so isolierten Proteine wurden nun mit verschiedenen Konzentrationen der sequenzspezifisch spaltenden Endoprotease Glu-C (V8 Protease aus *Staphylococcus aureus*) behandelt (typischerweise mit 2 µg/ml und 50 µg/ml für 20 min. in den Taschen und für weitere 30 min. im Sammelgel). Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, aktiviert und fluorographiert.

6.9 Immunfluoreszenzanalyse von Membranproteinen intakter Zellen

6.9.1 Analyse adhärent wachsender Zellen

Die Zellen wurden in speziell beschichteten Zellkulturkammern für die Immunfluoreszenzanalyse der Firma NUNC ("chamber slides") kultiviert, in denen auch alle Schritte des Experiments durchgeführt wurden. Für die Fluoreszenzanalyse wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und 10 min. mit 1 % Paraformaldehyd in TBS fixiert. Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Inkubation mit dem Primärantikörper (5 µg/ml in Zellkulturmedium mit 10 % FCS) für 30 min. bei RT durchgeführt. Der Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und der Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG konjugiert mit TRITC oder AMCA; 1:200 verdünnt in Zellkulturmedium mit 10 % FCS) für 30 min. bei RT auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen (3 x mit PBS) wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier und durch nachfolgende Inkubation bei 37°C (~10 min.) entfernt. Die Zellen wurden 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, für AMCA wurde ein 450 -490 nm-Filter verwendet.

6.9.2 Analyse von Suspensionszellen

Die Methode wurde analog zu der unter 6.9.1 beschriebenen durchgeführt, wobei alle Inkubations- und Waschschrte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden. Die Zentrifugation der Zellen bei den Waschschrten erfolgte dabei bei 2000 x g für 2 min. Nach dem letzten Waschrte wurden die Zellen in 30 µl PBS resuspendiert, auf einen Objektträger pipettiert, bei 37°C angetrocknet, mit Glyzergel eingebettet und wie unter 6.9.1 beschrieben analysiert.

6.10 Immunhistochemie

Die Gewebe wurden nach Entnahme aus dem Tier sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt. 5 µm Serienschritte wurden mit einem Reichert-Jung "cryocut"-Gefriermikrotom bei -25°C angefertigt, auf silanisierte Objektträger (10 sek. 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilan gelöst in wasserfreiem Aceton, 10 sek. Aceton, 10 sek. H₂O, 2 Stunden bei 80°C trocknen) aufgebracht, luftgetrocknet und mit eiskaltem Aceton (-20°C, 10

min.) fixiert. Das Aceton wurde durch eine zehnmünütige Inkubation in PBS ausgewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidase wurden die Gefrierschnitte nachfolgend für 15 min. bei RT mit 0,3 % H_2O_2 in Methanol inkubiert und nachfolgend 3 x für 2 min. mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindung von Antikörpern bzw. Rezeptorglobulinen zu vermeiden, wurden die Gefrierschnitte für 20 min. mit Zellkulturmedium (+ 10 % FCS bzw. 10 % Rattenserum) vorbehandelt. Das Medium wurde abgeschüttet und die Schnitte für 1 Std. mit Primärantikörper bzw. Rezeptorglobulin (jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssiger Antikörper (bzw. überschüssiges Rezeptorglobulin) durch dreimaliges Waschen mit PBS (jeweils 2 min.) entfernt. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 30 min. bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Hierfür wurde ein gegen Ratten-Serumproteine voradsorbierter, polyklonaler, Biotin-konjugierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper wurde 1:500 verdünnt in Zellkulturmedium (mit 10 % FCS) eingesetzt. Während der Inkubationszeit wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 25-30 min. bei RT präpariert: 10 μl Biotin, 10 μl Streptavidin-Peroxidase sowie 20 μl normales Ziegenserum wurden in 2 ml PBS resuspendiert. Die Gefrierschnitte wurden gewaschen (mit PBS, 3 x 2 min.) und der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30 min. auf die Schnitte gegeben. 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. Die Lösung wurde im Dunkeln durch einen Faltenfilter filtriert und nach einem erneuten Waschschrift (3 x 2 min. mit PBS) auf die Gefrierschnitte gegeben. Die Schnitte wurden so lange mit dem Substrat inkubiert, bis eine deutliche Rotfärbung mit dem Auge zu erkennen war (2-30 min.). Die Reaktion wurde durch eine einmünütige Inkubation in H_2O_d abgestoppt. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurden durch eine fünfminütige Inkubation mit Hämatoxylin und anschließenden 10 min. in Leitungswasser durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte getrocknet, mit Glyzergel eingebettet und mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop (im Hellfeld) analysiert.

6.11 Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie

6.11.1 Reinigung eines spezifischen Zellmembranproteins eukaryontischer Zellen

Die Zellen (ca. 1×10^8) wurden auf den Zellkulturschalen mit PBS gewaschen, vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 5 ml Lysispuffer (20 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, pH 7,0) resuspendiert und für 30 min. unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zunächst für 5 min. bei 10000 x g (um die Zellkerne zu sedimentieren) und dann der Überstand für weitere 20 min. bei 15000 x g (um schwerlösliche Zellbestandteile zu pelletieren) zentrifugiert. Zum Überstand des letzten Schrittes wurde ein Überschuß von spezifischem mAk (ca. 100 μg) zugegeben und für 2 Std. bei 4°C auf einer rotierenden Plattform inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500 μl einer 1:1 Suspension von Protein G-Agarose in Lysispuffer zum Zellysat gegeben und für weitere 60 min. bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde der Protein G-Agarose-Komplex 3 x für 2 min. mit 10 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen, in 5 ml eiskaltem Lysispuffer resuspendiert und auf eine 10 ml Econo Pac-Säule der Firma Bio Rad appliziert. Auf dieser Säule wurde der Protein G-Agarose-Komplex erneut mit 10 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen und spezifisch gebundenes Protein wurde mit eiskaltem Elutionspuffer (Glyzin 100 mM, pH 2,5;) in typischerweise 8 Fraktionen zu je 500 μl eluiert. Zur Neutralisation des Eluats wurde 50 μl Neutralisationspuffer (Tris 1M, pH 8,0) in die Reaktionsgefäße vorgelegt. Die Effizienz der Affinitätschromatographie wurde durch Western-Analyse der Elution (1/50 Vol. der Aliquots) mit einem für das gereinigte Protein spezifischen Antikörper getestet (s. 6.3). Gereinigtes Protein wurde bei -80°C aufbewahrt.

6.11.2 Reinigung von IgG-Fusionsproteinen (Rezeptorglobulinen, mod. nach Arrufo et al., 1990)

a) Kultivierung der Transfektanten und Ammoniumsulfatpräzipitation des Zellkulturüberstandes

Stabil mit Rezeptorglobulin-cDNA transfizierte Rattenfibroblasten wurden über den Konfluenzpunkt hinaus in DMEM (10 % FCS, 400 µg/ml G418, Antibiotika) kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und tote Zellen abzentrifugiert (4000 x g, 5 min.). Zum Überstand wurde binnen einer Std. dasselbe Volumen gesättigte Ammoniumsulfatlösung (800g/l) zugetropft. Das Gemisch wurde 1 Std. bei 4°C auf einem Magnetrührer gerührt und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (20000 x g, 20 min., 4°C).

b) Dialyse und Reinigung

Das Sediment wurde in 1/20 Vol. Phosphatpuffer (20 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0) resuspendiert, dialysiert (3 x 2 Std. gegen 1 l Phosphatpuffer) und erneut scharf abzentrifugiert (20000 x g, 20 min., 4°C). Der Überstand wurde mit 500 µl einer 1:1 Suspension von Protein G-Agarose in Phosphatpuffer versetzt und 2 Std. auf einer rotierenden Plattform bei 4°C inkubiert. Der Protein G-Agarose-Komplex wurde 3 x mit 10 ml eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen, in 5 ml Phosphatpuffer resuspendiert und auf eine Econo Pac-Säule gegeben. Der Protein G-Agarose-Komplex wurde auf der Säule ein weiteres mal mit 10 ml Phosphatpuffer gewaschen. Das gebundene Rezeptorglobulin wurde mit Elutionspuffer (Glyzin 100 mM, pH 2,5) von der Säule abgelöst (typischerweise 8 Fraktionen zu 500 µl) und durch Vorlage von 50 µl Tris (1 M, pH 8,0) in die Reaktionsgefäße neutralisiert. Die Effizienz der Reinigung wurde durch Western-Analyse mit einem polyklonalen, gegen den IgG-Anteil des Rezeptorglobulins gerichteten, Antikörper getestet. Positive Fraktionen wurden gesammelt, 3 x 2 Stunden gegen 1 l TBS dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

c) Alternatives Reinigungsverfahren

Für eine Reihe von Experimenten (z.B. Immunhistochemie) war es nicht notwendig, die Rezeptorglobuline durch Affinitätschromatographie aufzureinigen. Für diese Zwecke wurde das Sediment nach der Ammoniumsulfatpräzipitation in 1/20 Vol. TBS resuspendiert, 3 x 2 Std. gegen 1 l TBS dialysiert und scharf abzentrifugiert (12000 x g, 20 min.). 25 µl des Überstands wurden durch Western-Analyse auf Vorhandensein des spezifischen Proteins getestet, der Rest aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

7. Zellkultur

7.1 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Eukaryontische, adhärent wachsende Zellen wurden trypsiniert, mit PBS gewaschen und in Einfriermedium (Kulturmedium + 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden 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 und die Zellen in Kulturschalen ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen wurde das Medium gewechselt, und damit das DMSO entfernt.

7.2 Passagieren von eukaryontischen Zellen

Adhärente 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. Suspensionszellen wurden mit Medium verdünnt und in neue Kulturschalen eingesät.

7.3 Stabile Transfektionen von DNA in eukaryontische Zellen. (Calcium-Phosphat-Methode, Graham und van der Eb, 1973)

a) Transfektion

1×10^6 Zellen wurden pro 10 cm Petrischale ausgesät und 24 h später für die Transfektion verwendet. 6 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Zu 10 µg DNA in 500 µl 250 mM CaCl₂ wurde unter ständigem Schütteln 500 µl 2 x BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1 M Na₂HPO₄, pH 6,95) pipettiert. Der Transfektionsmix wurde 20 min. bei RT inkubiert und danach in die Petrischalen gegeben. Nach 12 bis 16 Std. Inkubation bei 35°C und 3 % CO₂ - Gehalt wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben. Nachfolgend wurden die Zellen wieder bei 37°C inkubiert.

b) Selektion

Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch Selektionsmedium (Kulturmedium + 500-800 µg/ml G418) ersetzt. In der Folgezeit wurde alle zwei, Tage bis zur makroskopischen Sichtbarkeit von Kolonien, das Selektionsmedium erneuert.

c) Isolieren von Klonen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Einzelne, mit dem Auge sichtbare Kolonien wurden mit sterilen, mediumbefeuchteten Wattestäbchen abgenommen und in Makroplatten der Firma Greiner überführt.

7.4 Tunicamycin-Behandlung von Zellen

Eukaryontische Zellen wurden bei 50-70 % Konfluenz mit Tunicamycin, einem Hemmstoff der N-Glykosylierung, behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und Tunicamycin (Stammlösung 5-10mg/ml gelöst in DMSO) in einer Endkonzentration von 5µg/ml zum frischen, vorgewärmten Zellkulturmedium zugegeben. In diesem Medium wurden die Zellen typischerweise für 8 Std. kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und geerntet. Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Trypanblau bestimmt. Sie betrug normalerweise > 90 %. Zellextrakte wurden präpariert wie unter 6.1.1 beschrieben. Die Tunicamycin-Stammlösung wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt.

8. Kultivierung von Bakterien

8.1 Einfrieren von Bakterien

Bakterien wurden in 2 x TY (1 % Hefeextrakt, 2 % Bacto Trypton, 5g/l NaCl, mit 10 % DMSO in einem Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zum Animpfen einer Kultur wurde eine Spatelspitze tiefgefrorener Bakterienkultur in frisches Medium überführt.

8.2 Präparation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Bakterien aus einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α wurden in 200 ml SOB (20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben beimpft und bei 37°C kräftig geschüttelt. Bei einer OD₅₈₀ 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°C abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Bakterien in eiskaltem STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂ x 4 H₂O, 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 3 mM Hexa-Amino-Kobalt-Chlorid, 10 mM K-MES pH 6,5, 15 % Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine 30 min. Inkubation der resuspendierten Bakterien auf Eis. Anschließend wurden sie wiederum 10 min. bei 3500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die nun für die DNA-Aufnahme kompetenten Bakterien vorsichtig, auf Eis, in 4 ml STB resuspendiert, in 200 μ l Aliquots abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

8.3 Transformation von Bakterien

5 μ l eines 20 μ l Ligationsansatzes oder 1 ng ungeschnittene Plasmid-DNA wurden mit 100 μ l kompetenter Bakterien eine Std. auf Eis (0°C) inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 3 min. bei 37°C wärmebehandelt (Hitzeschock) und wiederum in Eis abgekühlt. Dann wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 x g bei RT sedimentiert und in SOC-Medium (SOB + 20 mM Glukose) resuspendiert. Für die phänotypische Expression des Resistenzgens auf dem Plasmid wurden die Bakterien 60 min. bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Platten (+ 100 μ g/ml Ampicillin) plattiert.

3. Ergebnisse

3.1 Der mAk 1.1ASML reagiert spezifisch mit vier CD44v-Proteinen der metastasierenden Zelllinie BSp73ASML

Um Unterschiede hinsichtlich der Expression von Zelloberflächenproteinen zwischen den metastasierenden BSp73ASML- und den nichtmetastasierenden BSp73AS-Zellen des BSp73-Pankreaskarzinoms zu definieren wurden mAks gegen Membranproteine dieser Zelllinien hergestellt (Wenzel, 1986; Matzku et al., 1989). Mit einem der so erhaltenen mAks (1.1ASML), der spezifisch mit Zelloberflächen-Proteinen der BSp73ASML-Zellen reagiert, gelang es aus einer cDNA-Expressionsbibliothek dieser Zellen eine cDNA zu isolieren, die für eine Variante des CD44-Membranproteins (CD44v) kodiert (Günthert et al., 1991). Diese cDNA wurde fortan mit Meta-1 bezeichnet. Dieser CD44v-spezifische mAk identifiziert in einem Proteinlysate der metastasierenden BSp73ASML-Zelllinie jedoch vier im Molekulargewicht unterschiedliche Proteine (Abb. 1, 120, 150, 180 und 195 kD). Offensichtlich exprimieren diese Zellen verschiedene Isoformen von CD44v. Dabei ist auffallend, daß die beiden Proteine mit dem Mw von 120 (p120) bzw. 150 kD (p150) wesentlich prominenter sind als die anderen beiden CD44v-Isoformen (p180 bzw. p195, Abb. 1).

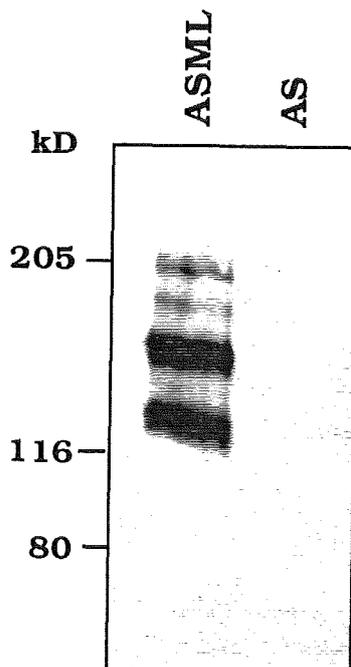


Abb. 1 Spezifische Reaktion des mAks 1.1ASML mit CD44v-Proteinen der BSp73ASML-Zellen

Proteinextrakte von BSp73AS- und BSp73ASML-Zellen (jeweils 100 µg) wurden auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine Immobilon Membran transferiert ("Western blotting"). Die Membran wurde, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, für 60 min. bei 37°C in PBS mit 10% fettfreier Milch und nachfolgend, zur spezifischen Färbung, für jeweils 60 min. bei RT zunächst mit 1.1ASML (5 µg/ml) und dann mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG in Hybridisierungslösung (1:5000 verdünnt) inkubiert. Die spezifisch erkannten Proteine wurde mit dem ECL-System nachgewiesen (s. Methodenteil 6.3), ihr Molekulargewicht mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt.

3.2 Alle CD44v-Moleküle der BSp73ASML-Zelllinie sind auf der Zellmembran lokalisiert

Durch Western-Analyse konnte nicht entschieden werden ob alle vom mAk 1.1ASML identifizierten CD44v-Isoformen der BSp73ASML-Zellen auch auf die Zelloberfläche transportiert werden. Es mußte z.B. die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß nur eines dieser Moleküle die "reife", membranständige Form darstellt, während es sich bei den anderen evtl. um Vorläufermoleküle der CD44v-Biosynthese handelt. Um dies zu untersuchen wurden Membranproteine von BSp73AS- und BSp73ASML-Zellen enzymatisch mit radioaktivem Iod markiert und CD44v-Moleküle mit dem mAk 1.1ASML isoliert (Abb. 2).

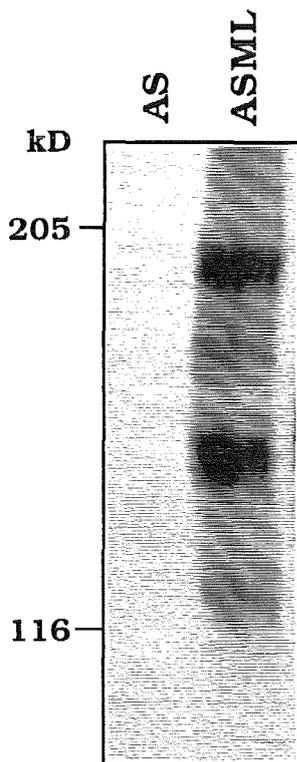


Abb. 2 Immunpräzipitation iodierter CD44v-Proteine mit 1.1ASML

Jeweils 10^7 vitale BSp73AS- und BSp73ASML-Zellen wurden enzymatisch (mit Lactoperoxidase in Gegenwart von Na^{125}J und H_2O_2) iodiert. Die radioaktiv markierten Zellen wurden lysiert. Nach Abtrennung der Zellkerne wurde der Überstand zunächst mit Protein G-Agarose vorgereinigt, dann mit dem mAk 1.1ASML ($5\mu\text{g/ml}$ Überstand; 60 min. bei 4°C) und nachfolgend für weitere 60 min. bei 4°C mit Protein G-Agarose inkubiert. Komplexe aus Protein G-Agarose, mAk 1.1ASML und gebundenen CD44v-Proteinen wurden abzentrifugiert, gewaschen, in Proteinprobenpuffer aufgeköcht und auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Das Molekulargewicht der präzipitierten CD44v-Proteine wurde durch Vergleich mit radioaktiv markierten Eichproteinen bestimmt.

Alle ASML-spezifischen CD44v-Proteine, die durch Western-Analyse (s. Abb.1) spezifisch identifiziert wurden, sind auch auf der Zelloberfläche der BSp73ASML-Zelllinie vorhanden (Abb. 2). Im Vergleich zur Western-Analyse sind jedoch deutliche Unterschiede in der Signalstärke der einzelnen Proteine zu erkennen (vgl. Abb. 1 mit Abb. 2). Bei der radioaktiven

Markierung von Membranproteinen zeigen p195 und p150 deutliche Signale, wogegen bei der Western-Analyse p120 und p150 am stärksten mit dem mAk 1.1ASML reagieren. Da bei der enzymatischen Radioiodinierung von Membranproteinen mit Lactoperoxidase spezifisch nur Tyrosinreste des Proteingerüsts radioaktiv markiert werden, ist natürlich die Anzahl und Zugängigkeit dieser Aminosäure entscheidend für die Markierungseffizienz (und damit für die Signalstärke). Eine solche Restriktion besteht bei der Western-Analyse nicht. Die Signalstärke hängt alleine von der Konzentration des spezifischen Proteins (hier CD44v) im Proteinlysate ab. Demnach kann mit der enzymatischen Radioiodinierung von Membranproteinen zwar die Präsenz der CD44v Proteine auf der Zellmembran nachgewiesen jedoch, im Gegensatz zur Western-Analyse, keine quantitative Aussage über die identifizierten CD44v-Isoformen gemacht werden.

3.3 Die Expression von CD44v korreliert mit dem metastatischen Phänotyp

Um herauszufinden, ob die Expression von 1.1ASML-spezifischen CD44v-Proteinen eine generelle Eigenschaft maligner Tumorzellen darstellt und damit vielleicht von funktioneller Relevanz für diesen Prozeß ist, oder ob diese Beobachtung auf die metastasierende BSp73ASML-Zelllinie des BSp73-Pankreaskarzinoms beschränkt bleibt, wurde die CD44v-Expression in zwei weiteren, gut charakterisierten Tumormodellen der Ratte, dem NF13762-System und dem CREF-System, getestet. Das NF13762-System (Neri et al., 1982) besteht aus verschiedenen Zelllinien die entweder aus dem Primärtumor eines Mamma-Adenokarzinoms (MTPa, MTA, MTC und MTF7) oder aus Metastasen desselben Tumors (MTLy, MTLn2 und MTLn3) isoliert wurden (Neri et al, 1981; Neri und Nicholson, 1981; Neri et al., 1982; Welch et al., 1983; Welch et al., 1985; North und Nicholson, 1985).

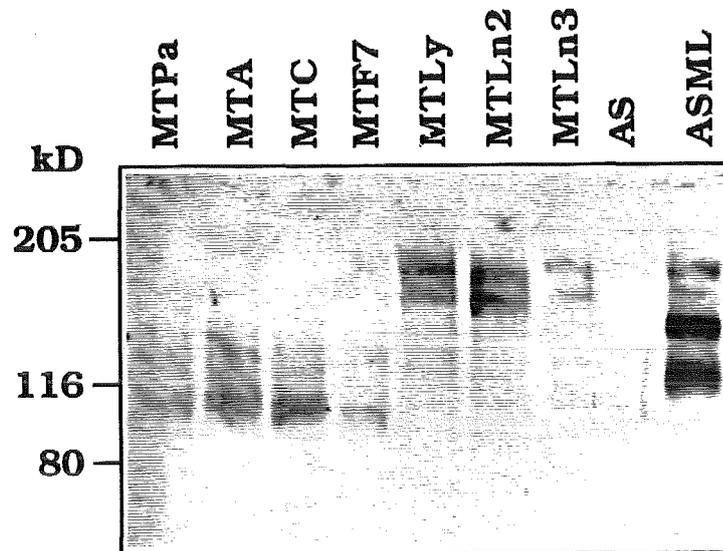


Abb. 3 CD44v wird von den Zellen des NF13762-Tumorsystems exprimiert

Jeweils 100 µg Proteinextrakt der induzierten Zelllinien mit Ausnahme von MTLn3 (~ 40 µg) wurden auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt. Die Western-Analyse wurde, wie unter Abb. 1 bzw. wie im Methodenteil (6.3) beschrieben, durchgeführt.

Beim NF13762-System ist CD44v schon in den Primärtumorisolaten (MTPa, MTA, MTC und MTF7) nachweisbar (Abb. 3). In Extrakten dieser Zellen reagiert der mAk 1.1ASML spezifisch mit zwei eng beieinander laufenden Proteinen (100 bzw. 105 kD). Eine schwache, diffuse Färbung ist auch mit einer im Mw höher migrierenden Gruppe von Proteinen (120-140 kD) in Extrakten dieser Zellen zu beobachten. Die Zelllinien MTA und MTC zeigen dabei ein deutlich stärkeres Signal als MTPa und MTF7. Offensichtlich wird in MTA und MTC CD44v stärker exprimiert. Die Metastasenisolat (MTly, MTLn2 und MTLn3) synthetisieren höhermolekulare CD44v-Proteine als die Primärtumorisolate. Auffallend dabei ist, daß eine Komigration zwischen den CD44v-Proteinen der Metastasenisolat und den beiden "größten" CD44v-Isoformen der BSp73ASML-Zelllinie (180 bzw. 195 kD) festgestellt werden kann. Die schwächere Reaktion bei MTLn3 ist auf eine geringere Menge aufgetrennten Zellextrakts zurückzuführen (s. Bildunterschrift Abb. 3).

Die Expression von CD44v-Proteinen wurde noch in einem weiteren Tumormodell der Ratte untersucht, dem sog. CREF-Syste (Boylan et al., 1990). In diesem Modell wurden klonierte, embryonale Rattenfibroblasten (CREF-Zellen: cloned rat embryo fibroblasts) aufgrund der zentralen Rolle des aktivierten ras-Onkogens bei Tumorentstehung und -progression (Greig et al., 1985; McGrath et al., 1984; Marshall, 1991), mit verschiedenen Versionen des aktivierten Ha-ras-Onkogens transformiert. Im Speziellen wurden CREF-Zellen mit dem viralen Ha-ras Onkogen PH1 (Shih et al., 1979), dem aktivierten humanen c-Ha-ras Onkogen T24 (Reddy et al., 1982; Capon et al., 1983) und den c-Ha-ras-Mutanten 59A (Alanin anstatt Threonin an Pos. 59) sowie 118S (Serin anstatt Cystein an Pos.118) transfiziert. Nach dem spontanen Metastasierungsprotokoll konnte bei diesen ras-Transfektanten moderates Metastasierungspotential nachgewiesen werden (Boylan et al., 1990; Hofmann et al. 1993). Es stellt sich die Frage, ob in diesem Tumormodell ein Zusammenhang zwischen metastatischem Phänotyp der Transfektanten, Expression des aktivierten ras-Onkogens und Expression von CD44v besteht.

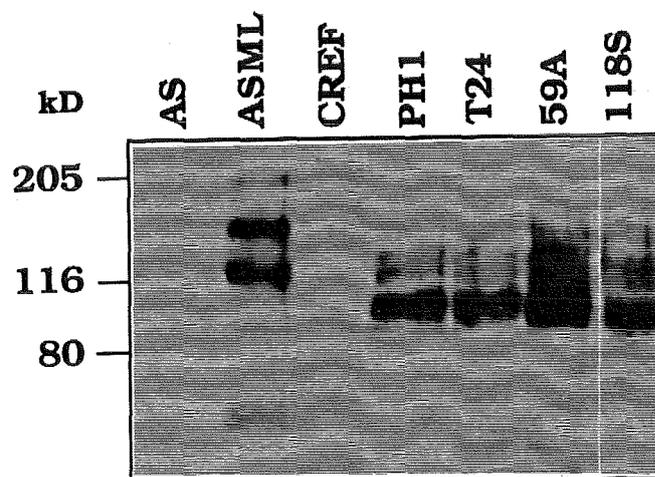


Abb. 4 Induktion von CD44v durch Expression verschiedener Versionen des aktivierten Ha-ras-Onkogens in CREF-Zellen

Jeweils 100µg Zellextrakt der angegebenen Zellen wurden auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt. Die Western-Analyse wurde wie im Methodenteil (und unter Abb.1) beschrieben, durchgeführt.

Alle Transfektanten (PH1; T24; 59A; 118S) exprimieren CD44v, während in der nichttransfizierten Ausgangszelllinie ebenso wie in BSp73AS-Zellen CD44v nicht nachgewiesen werden kann (Abb. 4). Die Intensität der Reaktion mit dem mAk 1.1ASML zwischen den einzelnen Zelllinien ist dabei vergleichbar (CREF-59A reagiert etwas stärker). Der Antikörper identifiziert spezifisch eine Hauptbande von 100 kD und, wesentlich schwächer, zwei Nebenbanden (110 und 130 kD) in den Extrakten der getesteten Ha-ras-Transfektanten. Offenbar sind die beiden größeren CD44v-Proteine nur in geringer Konzentration in den Zellextrakten vorhanden. Das 100 kD Protein der Ha-ras-Transfektanten wird stärker exprimiert als die prominenten CD44v-Proteine der BSp73ASML-Zellen (p120, p150). Da in diesen Experimenten nichtfraktionierte Zellextrakte verwendet wurden, kann keine Aussage über die Lokalisation (Zellmembran oder Zytoplasma) des prominenten 100 kD Proteins der Ha-ras-Transfektanten gemacht werden. Tatsächlich zeigen die Ha-ras-Transfektanten PH1 und T24 bei einer quantitativen Bestimmung der Oberflächenfluoreszenz (FACS-Analyse) mit dem mAk 1.1ASML eine deutlich schwächere Fluoreszenz als BSp73ASML-Zellen (Hofmann et al., 1993). Demnach ist es möglich, daß die beiden schwach "angefärbten" Banden (110 und 130 kD) der Ha-ras-Transfektanten die membranständigen CD44v-Proteine repräsentieren, während die 100 kD Form ein Vorläufermolekül darstellt.

Zusammenfassend kann festgesellt werden, daß CD44v in den Zellisolaten des NF13762-Mammakarzinoms und in ras-transformierten, embryonalen Fibroblasten (CREF-Zellen) exprimiert wird. Im Gegensatz zur BSp73AS-Zelllinie des BSp73-Tumors wird CD44v schon auf den Primärtumorisolaten des NF13762-Systems exprimiert. Diese Zelllinien exprimieren, vergleichbar mit den ras-transformierten Zelllinien des CREF-Systems, CD44v Isoformen mit einem Mw zwischen 110 und 140 kD und zeigen, wie diese, lediglich moderates Metastasierungspotential. Hochmolekulare CD44v-Isoformen, wie sie für die stark metastasierenden BSp73ASML-Zellen charakteristisch sind, werden im NF13762-System nur von den Metastasenisolaten exprimiert.

Im CREF-System konnte eine Korrelation zwischen Ras- und CD44v-Expression beobachtet werden. Ein direkter Einfluß von Ras auf den Promotor von CD44 konnte in Experimenten mit CREF-Zellen bewiesen werden, die mit einem induzierbaren c-Ha-ras(T24)-Konstrukt transfiziert wurden (Hofmann et al., 1993). Zwölf Stunden nach Ras-Induktion war CD44v-Expression nachweisbar. Offensichtlich besteht eine Signalkaskade bei der CD44v via Ras induziert wird.

3.4 Die CD44v-Proteine der BSp73ASML-Zellen sind glykosyliert

Der Antikörper 1.1ASML identifiziert spezifisch vier hochmolekulare CD44v-Proteine (120 kD - 195 kD) auf der Zellmembran der BSp73ASML Zelllinie (s. 3.1 und 3.2). Da mit demselben Antikörper aus einer cDNA-Bibliothek dieser Zelllinie der CD44v-cDNA-Klon pMeta-1, der für ein Protein mit dem theoretischen Molekulargewicht von 56 kD kodiert, isoliert wurde, muß das Produkt dieser cDNA unter den vier CD44v Proteinen der BSp73ASML-Zelllinie repräsentiert sein. Die Diskrepanz zwischen dem aus der Meta-1-cDNA-Sequenz abgeleiteten, theoretischen Molekulargewicht und dem Laufverhalten der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Proteine in der SDS-Elektrophorese ist dabei möglicherweise auf posttranslationelle Modifikation, oder eine ausgeprägte, SDS-resistente Tertiärstruktur des Meta-1-Proteins in diesen Zellen zurückzuführen .

Für die Präsenz von vier, im Molekulargewicht unterschiedlichen, CD44v-Isoformen im Extrakt der BSp73ASML-Zelllinie gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1.) Differentielle Modifikation (Glykosylierung) des Proteingerüsts einer Isoform (evtl. des Meta-1-Proteins)

2.) Unterschiede in der Aminosäureprimärsequenz dieser CD44v-Moleküle, die eventuell auf alternatives Spleißen eines CD44-Primärtranskripts zurückzuführen sind. Eine der so synthetisierten "reifen" mRNAs könnte dann z.B. für das Meta-1-Protein kodieren.

Um zu untersuchen ob die BSp73ASML-spezifischen CD44v-Isoformen (unterschiedlich) glykosyliert sind, wurden Membranproteine dieser Zellen radioaktiv markiert, die CD44v-Proteine mit dem mAk 1.1ASML isoliert und nachfolgend mit verschiedenen Glykosidasen behandelt. Die Analyse erfolgte auf einem SDS-Gel (Abb. 5).

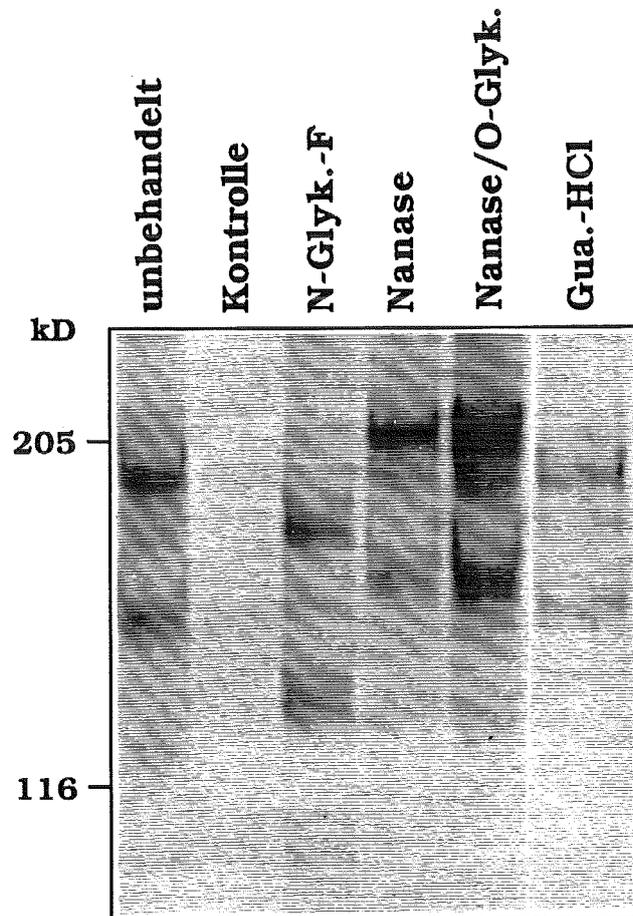


Abb. 5 Glykosylierung der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Moleküle

1×10^7 BSp73ASML Zellen/Ansatz wurden mit PBS gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die radioaktive Markierung wurde mit dem Enzym Lactoperoxidase in Gegenwart von Na^{125}J und H_2O_2 durchgeführt. Nach der Iodierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und lysiert. Zellkerne wurden durch Zentrifugation vom Zellysat abgetrennt und der Überstand mit 5 μ g mAk 1.1ASML (bzw. einer Maus IgG1 Isotypkontrolle: Kontrolle) und Protein G-Agarose inkubiert. Die an Protein G-Agarose gebundenen Immunkomplexe wurden mit N-Glykosidase-F (N-Glyk.-F), Neuraminidase (Nanase), Neuraminidase und O-Glykosidase (Nanase/O-Glyk.) sowie mit Guanidin-HCl (Gua.-HCl) in den vom Hersteller angegebenen Lösungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit Proteinprobenpuffer aufgeköcht und auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt. Als Kontrolle für ein geändertes Laufverhalten der CD44v-Proteine nach Abspaltung von Zuckerresten wurden unbehandelte CD44v-Proteine (unbehandelt) ebenfalls auf diesem Gel analysiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel fixiert, getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt. Die genauen Konzentrationen der verwendeten Lösungen sind im Methodenteil (6.5) angegeben. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit radioaktiv markierten Eichproteinen bekannten Molekulargewichts.

Inkubation der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Proteine mit N-Glykosidase F reduziert das Molekulargewicht jeder einzelnen Isoform um einen ähnlichen Betrag von ca. 20-30 kD (Abb. 5, N-Glyk. F) auf das scheinbare Mw von 90, 130, 155 und 175 kD. Offensichtlich sind alle Isoformen vergleichbar durch N-glykosidisch (über Asparagin) gebundene Oligosaccharid-Strukturen modifiziert. Eine Reduktion (zumindest einer Isoform) auf das theoretisch berechnete Molekulargewicht des Meta-1-Proteingerüsts konnte nach Behandlung mit N-Glykosidase F im SDS-Gel nicht beobachtet werden. Inkubation mit der für O-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharid-Strukturen spezifischen O-Glykosidase (Abb. 5, Nanase/O-Glyk.; vgl. mit Abb. 5, Nanase) hat nur einen minimalen Einfluß auf das Molekulargewicht der CD44v-Isoformen (eine Reduktion um ca. 5 kD aller Isoformen). Dabei mußten die CD44v-Proteine mit Neuraminidase (Abb. 5, Nanase) vorbehandelt werden, da Neuraminsäurereste die Wirkung der O-Glykosidase hemmen können. Nach alleiniger Neuraminidase-Behandlung kann man eine interessante Änderung im elektrophoretischen Migrationsverhalten der CD44v-Isoformen beobachten, nämlich eine Verschiebung zu Positionen die scheinbar höheren Molekulargewichten entsprechen (140, 170, 200 und 220 kD; Abb. 5, Nanase; vgl. mit Abb. 5, unbehandelt). Dabei könnte der Verlust negativ geladener Neuraminsäurereste zu einer Änderung der Gesamtladung der ohnehin durch SDS denaturierten und negativ geladenen CD44v-Moleküle, mit der Konsequenz einer geänderten Mobilität während der SDS-Elektrophorese, führen. Um zu untersuchen ob tatsächlich eine Ladungsänderung dieser Proteine nach Neuraminidase-Behandlung stattfindet wurden die radioaktiv markierten CD44v-Isoformen mit Neuraminidase inkubiert und zweidimensional aufgetrennt (Abb. 6).

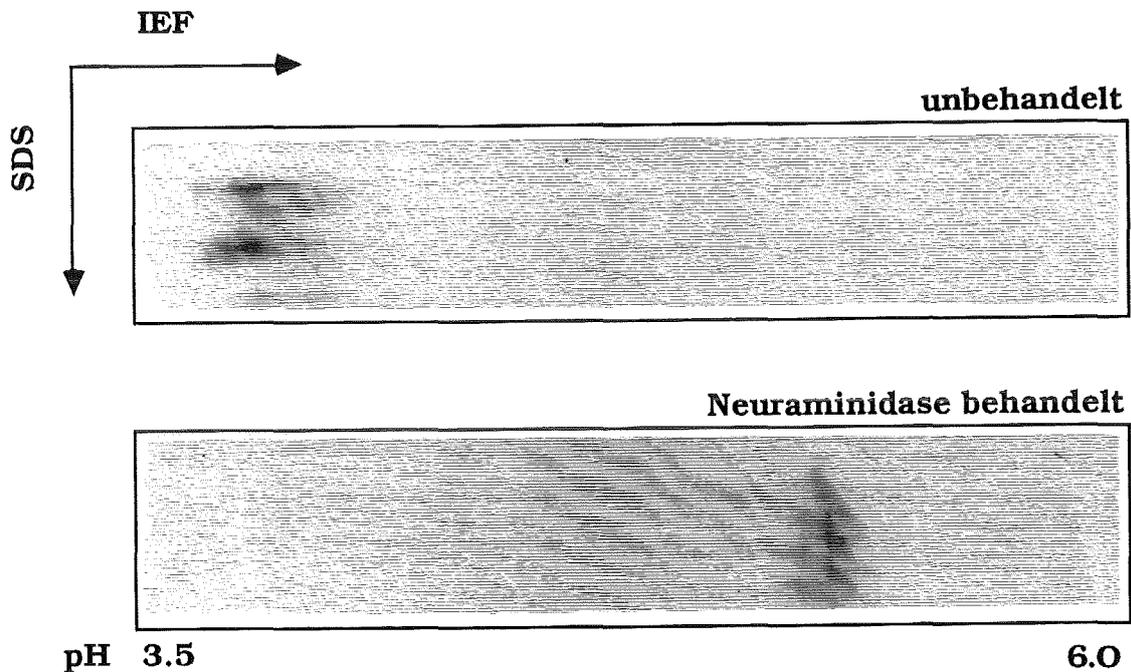


Abb. 6 Neuraminsäure trägt erheblich zur Azidität der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Isoformen bei

Radioiodinierte CD44v-Moleküle wurden entweder mit PBS alleine (unbehandelt) oder mit PBS/Neuraminidase (Neuraminidase behandelt) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteine in Laemmli-Proteinprobenpuffer aufgekocht und eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. In der ersten Dimension wurden die Moleküle in einem pH-Gradienten zwischen pH 3,5 -pH 6 gemäß ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurde eine SDS-Elektrophorese (7,5% Acrylamid) durchgeführt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Gel fixiert, getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt. Genaue Angaben zu den verwendeten Lösungen können dem Methodenteil (6.2.1) entnommen werden.

Die Behandlung der CD44v-Isoformen mit Neuraminidase resultiert in einer drastischen Änderung des isoelektrischen Punktes (IEP) dieser Moleküle (Abb. 6). Den unbehandelten Isoformen kann ein relativ saurer IEP von ca. 3,7 zugeordnet werden (Abb. 6, unbehandelt), während der IEP der Neuraminidase-behandelten Isoformen auf ca. 5,2 in Richtung Neutralpunkt verschoben ist (Abb. 6, Neuraminidase behandelt). Offensichtlich ist die Azidität dieser Proteine zu einem Großteil auf Neuraminsäure zurückzuführen.

CD44 kommt auch in einer Chondroitinsulfat-assoziierten, hochmolekularen Form vor (Jalkanen et al., 1988). Radioiodinierung der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Moleküle mit einer nachfolgenden Chondroitinase ABC-Inkubation hatte jedoch keinerlei Einfluß auf das

Laufverhalten dieser Proteine in der SDS-Elektrophorese (nicht gezeigt). Demnach erfolgt keine Modifikation dieser CD44v-Isoformen mit Chondroitinsulfat.

Eine nichtkovalente, homo- oder heterotypische Komplexbildung der CD44v-Proteine kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da eine Inkubation mit dem stark denaturierenden Agens Guanidin-Hydrochlorid das elektrophoretische Laufverhalten nicht beeinflusst (Abb. 5, vgl. Gua.-HCl mit unbehandelt).

Eine weitere Möglichkeit die Glykosylierung von Proteinen aufzuklären erfolgt über den Nachweis von Lektinen, die spezifisch an charakteristische Oligosaccharid-Strukturen binden. Diese Methodik wurde angewendet, um die unter Abb. 5 gezeigten Ergebnisse zu bestätigen bzw. um diese detaillierter darzustellen. Dabei wurden die affinitätschromatographisch gereinigten BSp73ASML-spezifischen CD44v-Isoformen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und nachfolgend mit unterschiedlichen Lektinen inkubiert. Gebundene Lektine wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

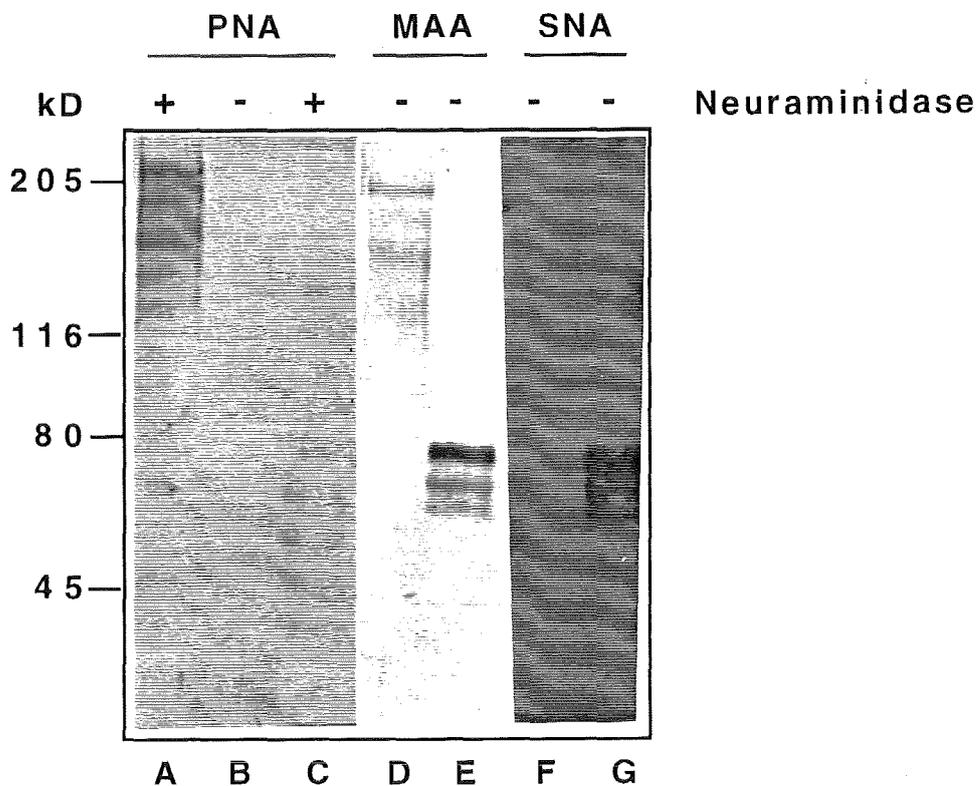


Abb. 7 Aufklärung der Glykosylierung durch Lektine

Affinitätschromatographisch gereinigte CD44v-Proteine der BSp73ASML-Zelllinie wurden entweder mit Neuraminidase behandelt (2 Std. bei 37°C) oder unbehandelt auf einem SDS-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt und nachfolgend auf eine Immobilon-Membran transferiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zunächst zweimal mit TBS gewaschen und zur unspezifischen Absättigung von Bindungsstellen mit 1% BSA in TBS (Blockinglösung) inkubiert, bevor die Membran erneut gewaschen wurde (zweimal in TBS und einmal in Puffer 1). Im nächsten Schritt wurde die Membran mit den Digoxigenin-markierten Lektinen PNA, MAA und SNA inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschritt (dreimal mit TBS) und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Digoxigenin konjugiert mit alkalischer Phosphatase). Nach einem abschließenden Waschschritt (dreimal mit TBS) erfolgte der Nachweis der gebundenen Lektine mit der NBT/BCIP-Detektmethode. Abschließend wurde die Membran mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen sowie weitere Informationen über die Durchführung dieser Methode sind dem Methodenteil (6.4) zu entnehmen. Das Molekulargewicht der identifizierten Proteinbanden wurde mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt.

Die spezifische Reaktion mit dem Lektin PNA stellt den eindeutigen Nachweis O-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Strukturen auf den BSp73ASML-spezifischen CD44v-Proteinen dar (Abb. 7, Spur A). Dabei reagiert PNA mit dem in O-Glykanen direkt an das Proteingerüst gebundenen Disaccharid Galaktose- β (1-3)-N-Azetylgalaktosamin. Analog zum glykosidischen Verdau mit O-Glykosidase müssen bei diesem Experiment die CD44v-Proteine mit Neuraminidase vorinkubiert werden, um die Bindung des Lektins zu ermöglichen (vgl. Abb. 7, Spur A und B). Offensichtlich ist die schwache Reduktion im Molekulargewicht dieser Moleküle durch O-Glykosidase (Abb. 5, O-Glyk.) ein Hinweis darauf, daß O-Glykosylierung tatsächlich nur einen minimalen Beitrag zum Molekulargewicht dieser Proteine leistet.

Neuraminsäure ist in Glykoproteinen terminal an komplexen Oligosaccharid-Strukturen lokalisiert. Es gibt jedoch Unterschiede in der kovalenten Bindung von Neuraminsäure in Glykoproteinen, die durch die Bindung von zwei Lektinen unterschiedlicher Spezifität identifiziert werden können. MAA (*Maackia amurensis*-Agglutinin) identifiziert Neuraminsäurereste in komplex glykosylierten Proteinen, die in α (2-3)-Stellung an Galaktose gebunden sind, während SNA (*Sambucus nigra*-Agglutinin) eine α (2-6)-Bindung an Galaktose anzeigt.

Bei den CD44v-Molekülen der BSp73ASML-Zelllinie liegt Neuraminsäure ausschließlich in α (2-3)-Stellung an Galaktose gekoppelt vor (Abb. 7). So besitzen die BSp73ASML-spezifischen CD44v-Proteine keinerlei Affinität zu SNA (Abb. 7, Spur F), während eine deutliche Reaktion mit MAA beobachtet werden kann (Abb. 7, Spur D). Die Reaktivität der Lektine PNA, SNA und MAA in diesem Experiment wird durch die spezifische Anfärbung der Kontrollproteine Asialofetuin (Abb. 7, Spur C) und Fetuin (Abb. 7, Spur E und G) verdeutlicht.

Neuraminsäure kommt auch in einer als Sialyl-Lewis-X bezeichneten Struktur vor, die auf vielen Tumorzellen aber auch auf HEVs nachgewiesen werden kann und von einer als Selektine bezeichneten Familie von Adhäsionsmolekülen erkannt wird (Fukushima et al., 1984; Phillips

et al., 1990; True et al., 1990; Walz et al., 1990; Imai et al., 1991; Springer und Lasky, 1991; Foxall et al., 1992). Mit einem Sialyl-Lewis-X-spezifischen Antikörper konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die in BSp73ASML-Zellen nachgewiesene, $\alpha(2-3)$ -gekoppelte Neuraminsäure nicht als Sialyl-Lewis-X vorliegt (nicht gezeigt). Eine Wechselwirkung zwischen den Selektinen und den CD44v-Proteinen der Zelllinie BSp73ASML ist demnach unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es sich bei den CD44v-Proteinen der Bsp73ASML-Zellen um N- und O-glykosilierte Membranproteine handelt, die zusätzlich mit Neuraminsäure modifiziert sind. Behandlung mit verschiedenen Glykosidasen ändert das Molekulargewicht aller Isoformen dieser Zelllinie um einen vergleichbaren Betrag. Offensichtlich sind diese Moleküle identisch oder zumindest sehr ähnlich und nicht differentiell glykosyliert. Neuraminsäure liegt spezifisch $\alpha(2-3)$ -gebunden, jedoch nicht als Sialyl-LewisX, vor und trägt maßgeblich zur Azidität der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Isoformen bei. Eine im elektrophoretischen Laufverhalten nachweisbare Reduktion eines dieser Membranproteine auf das theoretische Molekulargewicht der Meta-1-Isoform (56 kD) konnte nicht beobachtet werden.

3.5 Identifizierung der CD44v-Isoform Meta-1 in BSp73ASML-Zellen

Transfektion der Meta-1-cDNA in die CD44v-negative Zelllinie BSp73AS resultiert in der Expression der Meta-1-Isoform (Abb. 8a, AS-Meta-1/-Tunicamycin). Dieses 140 kD-Protein zeigt in der SDS-Elektrophorese keine Komigration mit einer der CD44v-Isoformen der BSp73ASML-Zelllinie (Abb. 8a, ASML/-Tunicamycin). Möglicherweise wird das Meta-1 Protein in der BSp73AS-Zelllinie unterschiedlich zur BSp73ASML-Zelllinie modifiziert. Demnach muß die Identifizierung von Meta-1 in BSp73ASML-Zellen durch einen Vergleich der unmodifizierten CD44v-Versionen dieser Zellen mit der nichtmodifizierten Form aus Meta-1-Transfektanten bzw. dem *in vitro* synthetisierten Meta-1 Protein erfolgen.

Um die unmodifizierte Form von Meta-1 in BSp73ASML-Zellen zu identifizieren wurden BSp73ASML-Zellen sowie BSp73AS-Meta-1-Transfektanten mit einem Hemmstoff der Glykosylierung, Tunicamycin (Elbein, 1981), behandelt und nachfolgend durch Western-Analyse untersucht (Abb. 8a). Darüberhinaus wurden die Produkte der Tunicamycin-Inhibition mit *in vitro* synthetisiertem Meta-1-Protein verglichen (Abb. 8b und 9).

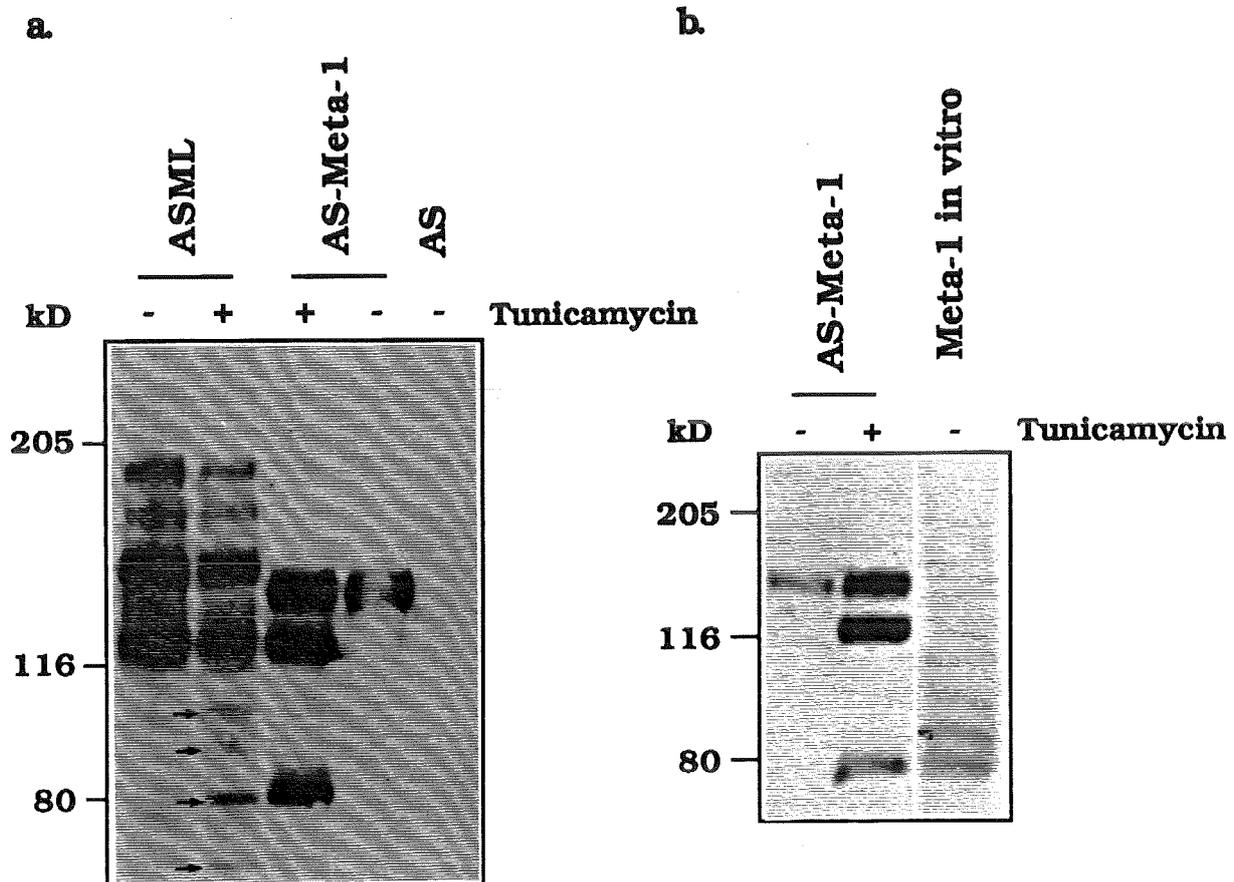


Abb. 8 *In vitro*-synthetisiertes Meta-1-Protein komigriert mit p80 aus Tunicamycin behandelten BSp73AS-Meta-1-Transfektanten

Abb. 8a Western-Analyse Tunicamycin-behandelter BSp73-Zellen

Die Zelllinien BSp73ASML und BSp73AS-Meta-1 wurden für 8 Std. in Gegenwart von Tunicamycin (5 µg/ml Kulturmedium) kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Zellextrakte wurden präpariert (s. Methodenteil). Zellextrakte Tunicamycin-behandelter Zellen wurden, ebenso wie Extrakte unbehandelter Zellen, auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt. Dabei wurden von BSp73ASML +/- Tunicamycin (und BSp73AS) 100 µg und von BSp73AS-Meta-1 +/- Tunicamycin jeweils 10 µg aufgetrennt und nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Immobilon-Membran transferiert. Genaue Angaben zur Durchführung der Western-Analyse mit 1.1ASML als Primärantikörper sind dem Methodenteil (6.3) und der Bildunterschrift von Abb. 1 zu entnehmen. Die neu auftretenden Banden im Extrakt von BSp73ASML-Zellen nach Tunicamycin-Behandlung sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Abb. 8b Vergleich mit *in vitro* synthetisiertem Meta-1-Protein

Die im Vektor pBAT subklonierte Meta-1-cDNA wurde 3' von ihrer Insertionstelle linearisiert und nachfolgend mit T3-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert (1 Std. bei 40°C). Die Translation der Meta-1-RNA wurde in Gegenwart von 50 µCi ³⁵S-Methionin in einem Weizenkeimlysat durchgeführt (1 Std. bei 25°C). Die genauen Bedingungen der *in vitro*-Transkription/Translation können im Methodenteil (6.7) nachgelesen werden. 1/10 des Translationsansatzes (Meta-1 *in vitro*) sowie 10 µg Proteinlysate von Tunicamycin-behandelten und -unbehandelten BSp73AS-Meta-1-Transfektanten (AS-Meta-1 +/- Tunicamycin) wurden auf einem SDS-Gel (6%

Acrylamid) aufgetrennt und nachfolgend auf eine Immobilon-Membran transferiert. Die Western-Analyse wurde wie im Methodenteil (6.3) bzw. wie in der Bildunterschrift von Abb. 1 beschrieben durchgeführt.

Im Extrakt von Tunicamycin-behandelten BSp73ASML-Zellen sind neben den modifizierten CD44v-Versionen vier neue Banden zu erkennen (70, 80, 100 und 110 kD; Abb. 8a, ASML/+Tunicamycin, indiziert mit Pfeilen), die ein deutlich geringeres scheinbares Mw aufweisen als die Formen, die nach N-Glykosidase F-Behandlung auftreten (90, 130, 155 und 175 kD; Abb. 5, N-Glyk. F). Offensichtlich wird durch N-Glykosidase F-Behandlung nur ein bestimmter Anteil der N-glykosidisch gebundenen Zuckerstrukturen entfernt. Da Tunicamycin nur die Glykosylierung von neu synthetisierten Proteinen blockiert, sind die modifizierten Versionen der CD44v-Proteine, die vor der Tunicamycin-Behandlung synthetisiert wurden, im Extrakt der Tunicamycin-behandelten BSp73ASML-Zellen noch nachweisbar (Abb. 8a, ASML/+Tunicamycin).

Nach Tunicamycin-Behandlung werden im Extrakt von BSp73AS-Meta-1-Transfektanten neben der modifizierten Version noch zwei weitere Proteine von 80 bzw. 120 kD identifiziert (Abb. 8a, AS-Meta-1/+Tunicamycin und Abb. 8b, AS-Meta-1/+Tunicamycin). In hier nicht gezeigten Experimenten konnte festgestellt werden, daß es sich bei der 120 kD Form um ein partiell glykosyliertes Zwischenprodukt handelt (Jonathan Sleeman, pers. Mitteilung).

Die 80 kD-Form aus Tunicamycin-behandelten Meta-1-Transfektanten läuft in der SDS-Elektrophorese auf gleicher Höhe mit einer der neu auftretenden Banden der behandelten BSp73ASML-Zellen (Abb.8a, vgl. AS-Meta-1/+Tunicamycin mit ASML/+Tunicamycin). Eine Möglichkeit um zu untersuchen, ob diese 80 kD-Proteine die unmodifizierten Meta-1-Spleißvarianten darstellen, ist der Vergleich dieser Proteine mit *in vitro* synthetisiertem Meta-1-Protein. Da in einem *in vitro*-Translations-System (z.B. in einem Weizenkeimlysat) Glykosylierung ohne Zugabe exogener Mikrosomen nicht möglich ist, repräsentiert das *in vitro* -synthetisierte Protein in seinem elektrophoretischen Laufverhalten das Laufverhalten der nichtmodifizierten Form *in vivo*. In einem solchen Experiment konnte tatsächlich eine Komigration zwischen der 80 kD-Form aus Meta-1-Transfektanten nach Tunicamycin-Behandlung und *in vitro* -synthetisiertem Meta-1-Protein festgestellt werden (Abb. 8b, vgl. AS-Meta-1/+Tunicamycin mit Meta-1 *in vitro*). Offensichtlich handelt es sich bei den 80 kD-Proteinen aus Tunicamycin-behandelten Meta-1-Transfektanten und BSp73ASML-Zellen um die nichtmodifizierten Formen der CD44v-Spleißvariante Meta-1.

Den endgültigen Identitätsbeweis stellt der Vergleich der Peptidspaltmuster der 80 kD (p80) Formen aus Tunicamycin-behandelten BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-1-Transfektanten mit dem von *in vitro* -synthetisiertem Meta-1 Protein dar (Abb. 9).

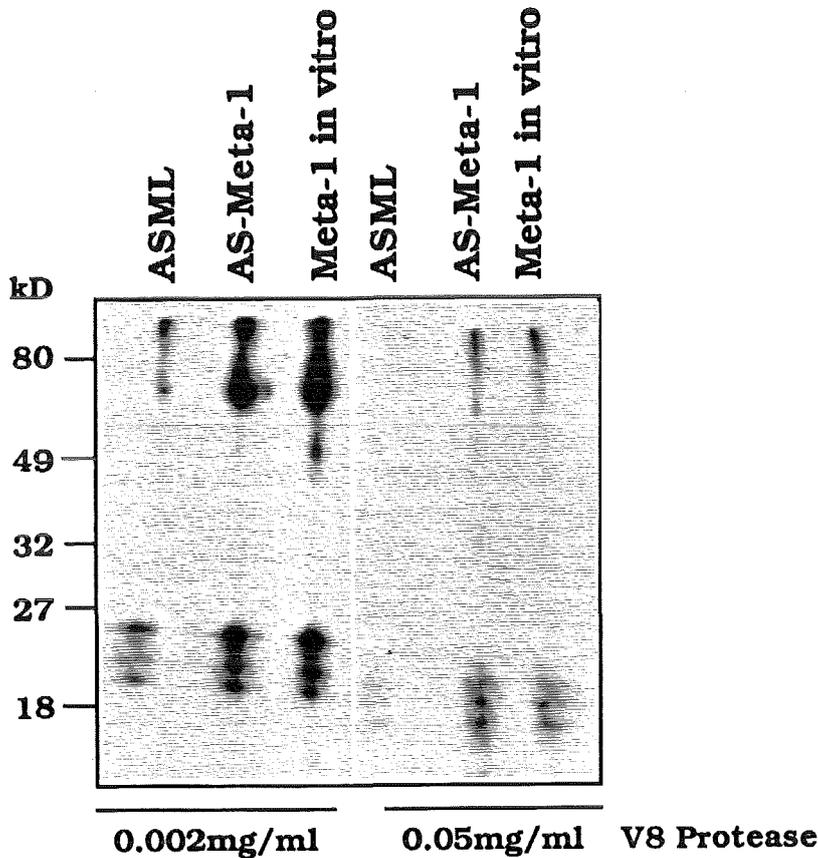


Abb. 9 Identität zwischen *in vitro* synthetisiertem Meta-1-Protein und den 80 kD-Molekülen aus Tunicamycin-behandelten BSp73ASML-Zellen bzw. BSp73AS-Meta-1-Transfektanten

BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-1-Transfektanten wurden in Gegenwart von Tunicamycin (5 μ g/ml) für 6 Std. metabolisch mit 35 S-Methionin (500 μ Ci/ml) markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Zellkerne wurden abgetrennt und die 80 kD Formen aus beiden Zelllinien mit dem mAk 1.1ASML (5 μ g) isoliert. Die 80 kD-Formen beider Zelllinien (ASML, AS-Meta-1) sowie *in vitro* synthetisiertes Meta-1-Protein (Meta-1 *in vitro*) wurden auf einen SDS-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel fixiert, aktiviert und getrocknet, ehe eine Autoradiographie durchgeführt wurde. Nach der Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser als Schablone benutzt um die 80 kD Proteine aus dem Gel auszuschneiden. Die so isolierten Gelstückchen wurden in die Taschen eines neuen SDS-Gels (12% Acrylamid) überführt und mit den indizierten Konzentrationen V8 Protease inkubiert (20 min. in den Taschen und 30 min. im Sammelgel). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel erneut fixiert, aktiviert, getrocknet und autoradiographiert. Das Molekulargewicht der Spaltprodukte wurde mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt.

Die Peptidspaltmuster, nach Partialverdau mit unterschiedlichen Konzentrationen (2 μ g/ml und 50 μ g/ml) von V8-Protease aus *Staphylococcus aureus*, zwischen p80 aus Tunicamycin behandelten BSp73ASML-Zellen (Abb. 9, ASML), p80 aus behandelten BSp73AS-Meta-1-Transfektanten (Abb. 9, AS-Meta-1) und der *in vitro* synthetisierten CD44v-Isoform Meta-1

(Abb. 9, Meta-1 *in vitro*), sind identisch. Unterschiede in der Signalstärke zwischen den Spuren sind auf unterschiedliche Mengen der für den Verdau eingesetzten 80 kD-Isoform zurückzuführen.

Das Ergebnis dieses Experiments bestätigt die Vermutung, daß es sich bei den aus BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-1-Transfektanten isolierten 80 kD-Proteinen tatsächlich um die unglykosilierten Formen der CD44v-Spleißform Meta-1 handelt.

Durch Hemmung der Glykosylierung mit Tunicamycin und Vergleich mit *in vitro* synthetisiertem Meta-1-Protein konnte eine der Banden aus BSp73ASML-Zellen dem Meta-1-Protein zugeordnet werden. Neben der unmodifizierten 80 kD Spleißform von Meta-1 wurden vom mAk 1.1ASML (nach Tunicamycin-Behandlung) jedoch noch drei weitere Proteine (70, 100 und 110 kD), offensichtlich weitere Spleißvarianten von CD44, identifiziert. Eine Diskrepanz zwischen dem aus der cDNA-Sequenz des Meta-1-Proteins abgeleiteten Molekulargewicht (56 kD) und dem aus der elektrophoretischen Mobilität bei der SDS-Elektrophorese (80 kD) bestimmten, bleibt jedoch bestehen. Offensichtlich nimmt die Meta-1-Isoform eine sehr ausgeprägte, gegen SDS-Denaturierung resistente Tertiärstruktur ein, welche das Laufverhalten bei der SDS-Elektrophorese mitbestimmt.

3.6 Meta-2 - die kleinste CD44v-Isoform aus BSp73ASML-Zellen

Durch Sequenzanalyse der Meta-1-cDNA konnte ein offener Leserahmen von 1509 bp (503 As) identifiziert werden. Dieser Klon enthält eine Insertion von 486 bp (162 As) in der extrazellulären membranproximalen Region an Position 669 der CD44s-cDNA-Sequenz (Ntd. 670 repräsentiert das erste Extranukleotid). Bis auf eine Deletion von 69 bp des Meta-1-Moleküls (Ntd. 672-738) sind die an die Insertion angrenzenden Sequenzen zwischen CD44s- und der Meta-1-Isoform identisch (Günthert et al., 1991). Weitere CD44v-Isoformen wurden vor allem aus humanen Tumorzelllinien isoliert (Dougherty et al., 1991; Hofmann et al., 1991; Stamenkovic et al., 1991). Dabei fiel auf, daß die Insertionsstelle der zusätzlichen As-Sequenzen immer konserviert bleibt. Um weitere CD44-Spleißvarianten aus der BSp73ASML-Zelllinie zu isolieren wurden "primer" synthetisiert, die 5' und 3' von der Insertionsstelle der zusätzlichen Sequenzen, in der zwischen Meta-1 und CD44s identischen (der sog. CD44s-spezifischen) Region, hybridisieren. Diese Primer wurden in PCR-Analysen mit cDNA aus den Zelllinien BSp73AS und BSp73ASML eingesetzt. Durch die Wahl der Primer sollten, neben der CD44s-cDNA, auch CD44v-cDNAs mit zusätzlich inserierten Sequenzen amplifiziert werden (Abb. 10).

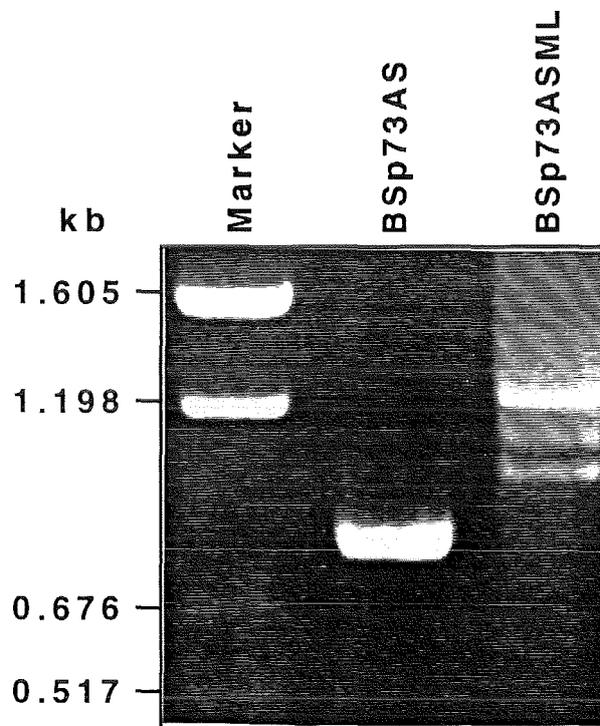


Abb. 10 Identifizierung der CD44v-Isoform Meta-2 durch PCR

PolyA⁺ RNA von BSp73AS- und BSp73ASML-Zellen wurde revers transkribiert und ein Äquivalent von 200 ng wurde für die PCR-Amplifikation eingesetzt. Die für die Amplifikation verwendeten Oligonukleotidprimer korrespondieren zu den Positionen 362-385 und 1132-1154 der CD44s-cDNA der Ratte. Nach 30 Zyklen bei 94,5 °C für 45 sek., 60 °C für 1 min., und 73 °C für 3 min. wurden die Amplifikationsprodukte auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

Aus der cDNA von BSp73AS-Zellen wurde nur ein Produkt von ca. 0,8 kB amplifiziert (Abb. 10, BSp73AS), das der Sequenz der CD44s-cDNA zwischen den verwendeten Oligonukleotidprimern entspricht. Diese CD44s-spezifische Bande ist bei der BSp73ASML-Zelllinie kaum noch nachweisbar. In der cDNA von BSp73ASML-Zellen sind jedoch eine Reihe größerer Amplifikationsprodukte zu sehen. Zwei definierte Banden mit einer Größe von 1,0 bzw. 1,2 kB können auf dem Agarosegel identifiziert werden (Abb. 10, BSp73ASML). Demnach wird CD44s in BSp73ASML-Zellen nur sehr schwach exprimiert, während eine ganze Reihe von CD44v-mRNAs synthetisiert werden. Die beiden häufigsten Formen (1,0 und 1,2 kB) wurden durch Klonierung und nachfolgende Sequenzierung identifiziert.

Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die 1,2 kB Bande das Amplifikationsprodukt der Meta-1-cDNA repräsentiert. Bei der kleineren abundanten Bande (1,0 kB) handelt es sich um die cDNA einer neuen CD44v-Isoform. Sequenzanalyse dieser kleineren CD44-Spleißvariante ergab, daß sie zusätzlich zur CD44s-Sequenz nur für die 85 karboxyterminalen Aminosäuren der zusätzlichen Domäne von Meta-1 kodiert (Pos. 300-385 der As-Sequenz). Wie bei der Meta-1-Isoform fehlen diesem Molekül 23 membranproximale Aminosäuren im Vergleich zu CD44s. Diese bisher kleinste, in der BSp73ASML-Zelllinie identifizierte, CD44v-Isoform wurde fortan als Meta-2 bezeichnet.

Neben der Meta-1- und der Meta-2-Bande kann man jedoch in der PCR-Reaktion der BSp73ASML-Zellen ein diffuses Muster zwischen diesen beiden Hauptamplifikationsprodukten und auch darüber erkennen (>1,6 kB). Es ist nicht auszuschließen, daß dieses diffuse Muster eine Vielzahl von CD44v-Spleißprodukten repräsentiert. Möglicherweise liegt in der BSp73ASML-Zelllinie eine generelle Fehlregulation des CD44-Spleißens vor.

3.6.1 Das Meta-2 Protein wird in BSp73ASML-Zellen exprimiert

Größe und Häufigkeit machen es wahrscheinlich, daß das 120 kD-Protein der BSp73ASML-Zellen von der Meta-2-cDNA kodiert wird. Um dies zu prüfen wurde die Meta-2-cDNA, unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors, stabil in BSp73AS-Zellen transfiziert. Die Transfektanten wurden mit und ohne Tunicamycin kultiviert und nachfolgend mit BSp73ASML-Zellen (+/- Tunicamycin) und *in vitro*-synthetisiertem Meta-2-Protein verglichen (Abb. 11 und 12). Darüberhinaus wurde die Lokalisation des Meta-2-Proteins auf der Zellmembran durch Immunfluoreszenz-Analyse überprüft (Abb. 13).

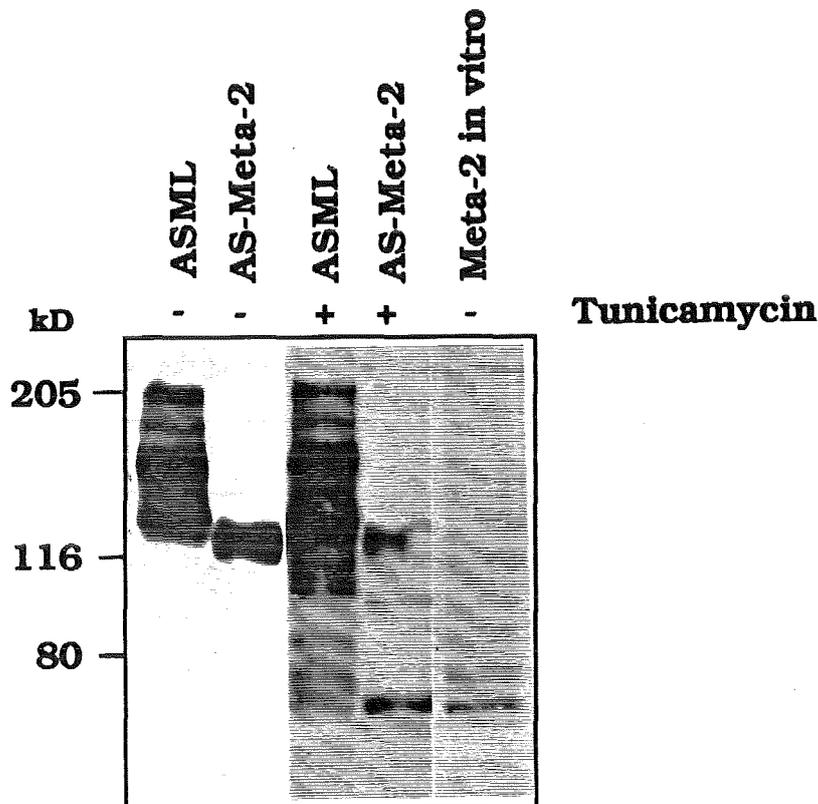


Abb. 11 Meta-2 komigriert mit der kleinsten CD44v-Isoform in BSp73ASML-Zellen

BSp73ASML-Zellen und Meta-2-Transfektanten wurden für 8 Std. in Gegenwart von Tunicamycin kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und Zellextrakte wurden präpariert. Zellextrakte Tunicamycin-behandelter und nichtbehandelter Zellen wurden auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt. Dabei wurden von BSp73ASML +/- Tunicamycin 100 µg und von BSp73AS-Meta-2 +/- Tunicamycin 20 µg aufgetrennt. Zusätzlich zu diesen Extrakten wurde noch *in vitro*-synthetisiertes Meta-2-Protein (Meta-2 *in vitro*) aufgetrennt (1/10 des *in vitro*-Translationsansatzes). Die *in vitro*-Synthese wurde dabei wie unter Abb. 8 bzw. wie im Methodenteil (6.7) beschrieben durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Immobilon-Membran transferiert. Genaue Angaben zur Durchführung der Western-Analyse mit 1.1ASML als Primärantikörper sind dem Methodenteil (6.3) bzw. der Bildunterschrift von Abb. 1 zu entnehmen.

Die cDNA-Sequenz der CD44v-Isoform Meta-2 kodiert für ein Protein mit dem theoretischen Molekulargewicht von 47,2 kD. Der modifizierten, von Meta-2-Transfektanten exprimierten Version dieses Moleküls kann in der SDS-Gelelektrophorese ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 115 kD zugeordnet werden (Abb. 11, AS-Meta-2/-Tunicamycin). Offensichtlich wird Meta-2, analog zu Meta-1, stark modifiziert. Das Meta-2-Protein zeigt (wie Meta-1) keine Komigration mit einer der CD44v-Isoformen aus BSp73ASML-Zellen. Die kleinste modifizierte Form aus BSp73ASML-Zellen hat ein scheinbares Mw von 120 kD (p120) und

"läuft" im SDS-Gel knapp oberhalb der Meta-2 Isoform (Abb. 11, vgl. AS-Meta-2/-Tunicamycin mit ASML/-Tunicamycin).

Tunicamycin-Behandlung der Meta-2-Transfektanten resultiert in einer drastischen Reduktion des Molekulargewichts der Meta-2-Isoform (von 115 kD auf 70 kD; Abb. 11, vgl. AS-Meta-2/-Tunicamycin mit AS-Meta-2/+Tunicamycin). Zusätzlich zu dieser Beobachtung kann nach Behandlung dieser Zellen mit Tunicamycin eine Komigration zwischen dem neu auftretenden 70 kD-Protein (p70Meta-2) und der kleinsten BSp73ASML-spezifischen Spleißform nach Tunicamycin-Behandlung (p70ASML) festgestellt werden (Abb.11, vgl. AS-Meta-2/+Tunicamycin mit ASML/+Tunicamycin). Da Tunicamycin nur die *de novo* -Glykosylierung von Glykoproteinen hemmt sind die vor der Tunicamycin-Behandlung synthetisierten, modifizierten Versionen ebenfalls noch nachweisbar. Bei BSp73AS-Meta-2-Transfektanten ist (wie bei Meta-1) ein Glykosylierungs-Intermediat (~90 kD) nach Tunicamycin-Behandlung erkennbar (Abb. 11, vgl. ASML/+Tunicamycin mit AS-Meta-2/+Tunicamycin). Die nach Tunicamycin-Behandlung in Extrakten von BSp73AS-Meta-2-Transfektanten und von BSp73ASML-Zellen nachgewiesene 70 kD Form läuft im SDS-Gel auf gleicher Höhe wie *in vitro* synthetisiertes Meta-2 Protein (Abb. 11; vgl. ASML/+Tunicamycin mit AS-Meta-2/+Tunicamycin und Meta-2 *in vitro*) und stellt somit mit großer Wahrscheinlichkeit die nichtglykosylierte Meta-2-Spleißform dar. Um letzte Zweifel über die Identität dieser 70 kD-Proteine auszuschließen wurden ihre Peptidspaltmuster miteinander verglichen (Abb. 12).

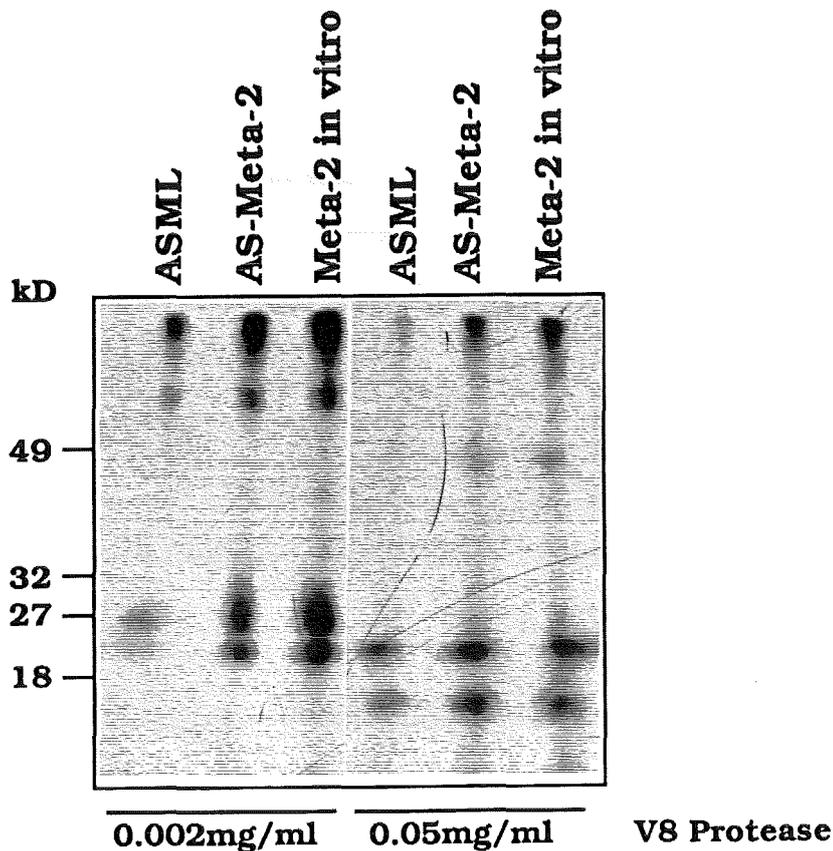


Abb. 12 Die 70 kD-Proteine aus Tunicamycin-behandelten BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-2-Transfektanten sind identisch mit *in vitro* synthetisiertem Meta-2-Protein

BSp73ASML-Zellen (ASML) und BSp73Meta-2-Transfektanten (AS-Meta-2) wurden in Gegenwart von Tunicamycin (5µg/ml Kulturmedium) für 6 Std. metabolisch in Gegenwart von ³⁵S-Methionin (500µCi/ml) markiert. Die Isolierung der 1.1ASML-spezifischen Proteine, der proteolytische Verdau mit V8-Protease sowie der Vergleich der Peptidspaltmuster mit *in vitro* synthetisiertem Meta-2 Protein (Meta-2 *in vitro*) erfolgte analog zu der unter Abb. 9 beschriebenen Methode.

Die Peptidspaltmuster der 70 kD-Proteine aus Tunicamycin behandelten BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-2-Transfektanten, nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (2µg/ml und 50 µg/ml) von V8-Protease aus *Staphylococcus aureus*, sind identisch mit dem von *in vitro* -synthetisiertem Meta-2-Protein (Abb. 12).

Die Expression der CD44v-Isoform Meta-2 in BSp73AS-Meta-2-Transfektanten wird durch die Western-Analyse von Abb. 12 nachgewiesen. Mit dieser Methode kann jedoch nicht zwischen einer zytoplasmatischen und einer membranassoziierten Lokalisation des Meta-2-Proteins differenziert werden. Eine Standardmethode für den Nachweis von Membranproteinen ist die Immunfluoreszenzanalyse von intakten Zellen mit einem spezifischen Antikörper. Mit dieser Methodik kann die Lokalisation der Meta-2-Isoform von BSp73AS-Meta-2-Transfektanten eindeutig der Zelloberfläche zugeordnet werden (Abb. 13).

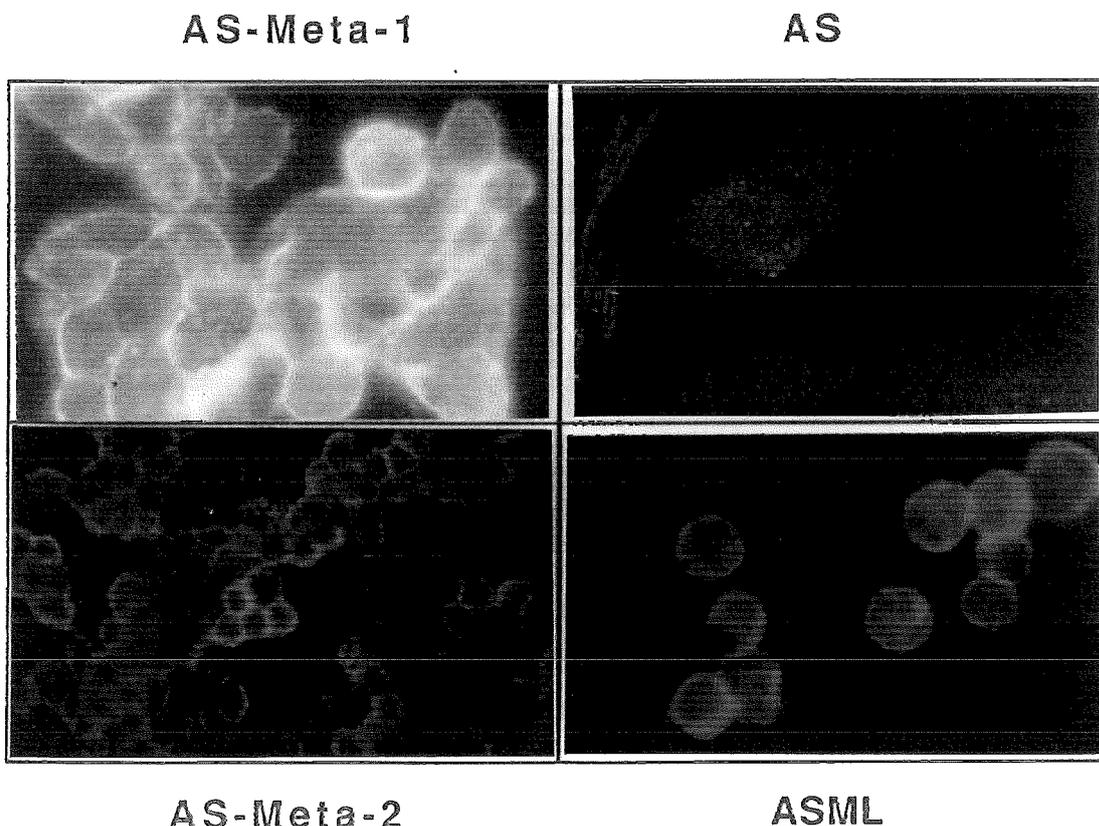


Abb. 13 Die CD44v-Isoform Meta-2 ist auf der Zellmembran lokalisiert

BSp73AS-Zellen (AS, rechts oben), BSp73ASML-Zellen (ASML, rechts unten), Meta-1- (AS-Meta-1, links oben), und Meta-2-Transfektanten (AS-Meta-2, links unten) wurden mit Paraformaldehyd (1% in TBS) fixiert. Nach Auswaschen des Fixierungsmittels wurden die Zellen mit dem CD44v-spezifischen mAk 1.1ASML (5µg/ml Zellkulturmedium mit 10% FCS) für 30 min. bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssiger Primärantikörper entfernt und Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG) konjugiert mit Rhodamin (rote Fluoreszenz) bzw. Aminomethylcoumarin (blaue Fluoreszenz) 1:100 verdünnt in Zellkulturmedium mit 10% FCS auf die Zellen gegeben (30 min., RT). Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen mit Glycergel eingebettet und die Bindung der Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Nähere Angaben zur Durchführung der Methode können dem Methodenteil entnommen werden (6.9).

Wie erwartet zeigen BSp73ASML-Zellen und BSp73AS-Meta-1-Transfektanten eine starke Membranfluoreszenz (hohe Expression von CD44v) während BSp73AS-Zellen negativ sind (Abb. 13). BSp73AS-Meta-2-Transfektanten reagieren jedoch ebenso deutlich mit dem CD44v-spezifischen mAk 1.1ASML und zeigen eine starke, für Oberflächenproteine typische Fluoreszenz (Abb.13). Offensichtlich wird die CD44v-Isoform Meta-2 auf der Zelloberfläche der Transfektanten exprimiert. Die Expression auf der Zellmembran stellt die Grundvoraussetzung für eine funktionelle Aktivität dieser Isoform dar.

Die nach Tunicamycin-Behandlung in BSp73ASML-Zellen bzw. BSp73AS-Meta-2-Transfektanten neu auftretenden 70 kD-Formen stellen die nichtglykosylierten Versionen der CD44v-Spleißvariante Meta-2 dar. Das Meta-2-Protein ist demnach, mit nur 85 zusätzlichen As im extrazellulären Anteil, die kleinste nachweisbare CD44v-Spleißform die in BSp73ASML-Zellen exprimiert wird. Möglicherweise repräsentiert p120ASML die modifizierte Meta-2-Version. Der Unterschied im Molekulargewicht zwischen p120 aus BSp73ASML-Zellen und dem Meta-2 Protein aus Transfektanten (115 kD) könnte durch (geringfügige) Unterschiede in der Glykosylierung zwischen diesen Zelllinien begründet sein.

Die Diskrepanz zwischen dem aus der Meta-2-cDNA Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht (47 kD) und dem scheinbaren Laufverhalten bei der SDS-Elektrophorese (*in vitro* synthetisiertes Meta-2 läuft bei 70 kD) ist eventuell (wie bei Meta-1) auf eine gegen SDS-Denaturierung stabile Tertiärstruktur dieses Proteins zurückzuführen.

Eine Grundvoraussetzung für eine funktionelle Aktivität des Meta-2 Proteins stellt die Expression auf der Zellmembran dar. Dies konnte durch Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen werden.

3.6.2 Expression der CD44v-Isoform Meta-2 induziert Metastasierung in BSp73AS-Zellen

Um aufzuklären ob die Expression der "CD44v-Minimalvariante" Meta-2 ebenfalls ausreichend ist um der nichtmetastasierenden Zelllinie BSp73AS Metastasierungspotential zu verleihen, wurden BSp73AS-Meta-2-Transfektanten subkutan in die Pfoten syngener Ratten injiziert und die Ausbildung von Metastasen in Lunge und Lymphknoten analysiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Tierexperimente mit Meta-2-Transfektanten, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Zöller (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt wurden. Diese Experimente müssen im Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen aus *in vivo*-Metastasierungsversuchen mit Meta-1-Transfektanten betrachtet werden (Günthert et al., 1991; Seiter et al., 1993).

Tabelle 1

Zellklon	Anzahl der injizierten Tiere	Tiere mit Lungenmetastasen
BSp73AS	40	0
BSp73AS-neo	8	0
BSp73ASML	40	40
BSp73AS-Meta1#14	60	60
BSp73AS-Meta2#3	6	5
BSp73AS-Meta2#7	6	6
BSp73AS-CD44s#15	5	0

Tab. 1 Expression von Meta-2 vermittelt den metastatischen Phänotyp

5×10^5 Tumorzellen wurden entweder subkutan in die Pfoten oder die Flanke von syngen BDX-Ratten injiziert. Bei der Entwicklung eines Primärtumors in der Pfote der Tiere wurde dieser operativ entfernt. Nach 60 Tagen wurden die Tiere getötet und Lunge sowie Lymphknoten auf die Entstehung von Metastasen untersucht.

BSp73AS-Meta-2-Transfektanten (die beiden Klone #3 und #7 wurden getestet) metastasieren mit ähnlich hoher Effizienz in die Lunge wie BSp73AS-Meta-1-Transfektanten (#14) und BSp73ASML-Zellen. Bei allen Tieren mit Lungenmetastasen waren auch Metastasen in den Lymphknoten nachweisbar. Um die Spezifität der CD44v-Sequenzen im Metastasierungsprozeß zu überprüfen wurden BSp73AS-Zellen mit einer CD44s-cDNA, unter Kontrolle des SV40-Promotors, stabil transfiziert und auf ihre Metastasierungsfähigkeit in

syngenem BDX-Ratten getestet. BSp73AS-CD44s-Transfektanten (#15) waren genauso wenig in der Lage Metastasen zu bilden wie BSp73AS-Zellen und BSp73AS-Zellen, die lediglich mit dem Neomycin-Resistenzgen transfiziert wurden (BSp73AS-neo).

Überexpression der CD44v-Isoform Meta-2 reicht aus, um nicht metastasierenden BSp73AS-Zellen die Fähigkeit zu verleihen, effizient in Lunge und Lymphknoten zu metastasieren. Offensichtlich entscheiden 85 zusätzliche Aminosäuren im extrazellulären Anteil des CD44s-Moleküls zwischen lokal begrenztem Wachstum (wie bei BSp73AS-Zellen und BSp73AS-CD44s-Transfektanten) und der Fähigkeit, Metastasen zu bilden (bei BSp73AS-Meta-2). Möglicherweise bekommen die Transfektanten über diese Extradomäne ein Signal, das Prozesse in Gang setzt, die für den Metastasierungsprozeß notwendig sind.

3.7 Dimerisierung von CD44v-Isoformen

Eine Reihe von Oberflächenrezeptoren liegen erst nach Dimerisierung bzw. Multimerisierung in einer funktionell aktiven Form vor (Hynes, 1987). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch bei CD44v-Proteinen eine Dimerisierung oder eine Multimerisierung nachgewiesen werden kann. Zunächst wurde getestet, ob die CD44v-Isoform Meta-1 in der Lage ist durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zu dimerisieren. Dabei wurde das radioaktiv markierte Meta-1-Protein mit dem mAk 1.1ASML isoliert und unter nichtreduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 14, AS-Meta-1/-DTT).

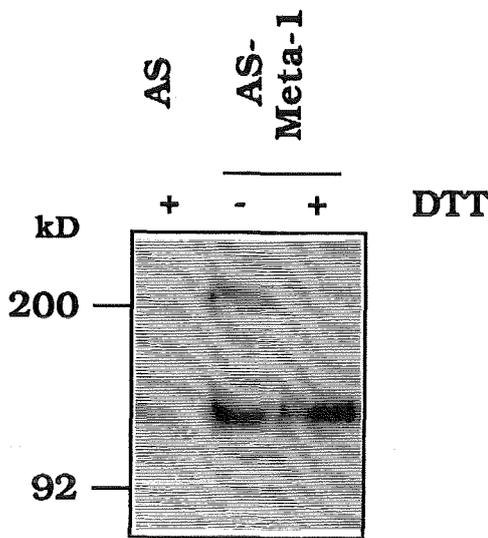


Abb. 14 Unter nichtreduzierenden Bedingungen liegt Meta-1 teilweise als Dimer vor

Die radioaktive Markierung der Zellen BSp73AS (AS) und BSp73AS-Meta-1 (AS-Meta-1) mit ^{125}I od und die nachfolgende Immunpräzipitation mit dem mAk 1.1ASML wurde wie unter Abb. 2 (bzw. im Methodenteil unter 6.5 und 6.5.1) beschrieben durchgeführt. Die immunpräzipitierten Meta-1-Proteine wurden entweder in reduzierendem (+DTT) oder nichtreduzierendem Proteinprobenpuffer (-DTT) aufgekocht und auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) analysiert. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel fixiert und getrocknet. Abschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt. Die Molekulargewichtsbestimmung der nachgewiesenen Proteine erfolgte mit radioaktiv markierten Eichproteinen.

Die CD44v-Isoform Meta-1 ist in der Lage unter nichtreduzierenden Bedingungen Dimere auszubilden (Abb. 14, AS-Meta-1/-DTT). Eine zusätzliche prominente Bande von ca. 280 kD kann beobachtet werden. Diese zusätzliche Bande repräsentiert offensichtlich ein Meta-1-Dimer, da nach Isolation dieser Bande aus dem Gel und nachträglicher Reduktion nur noch eine Bande mit dem Molekulargewicht von Meta-1 zu sehen war (nicht gezeigt). Offensichtlich findet eine Wechselwirkung von Meta-1 Molekülen über Disulfidbrücken statt, da diese Bindungen in Gegenwart von DTT gespalten werden (Abb. 14, AS-Meta-1/+DTT).

Um zu untersuchen, ob CD44v-Isoformen generell in der Lage sind hochmolekulare Komplexe auszubilden, wurden Proteine von BSp73ASML-Zellen sowie von Meta-1- und Meta-2-Transfektanten unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Reaktivität mit dem CD44v-spezifischen mAk 1.1ASML getestet (Abb. 15).

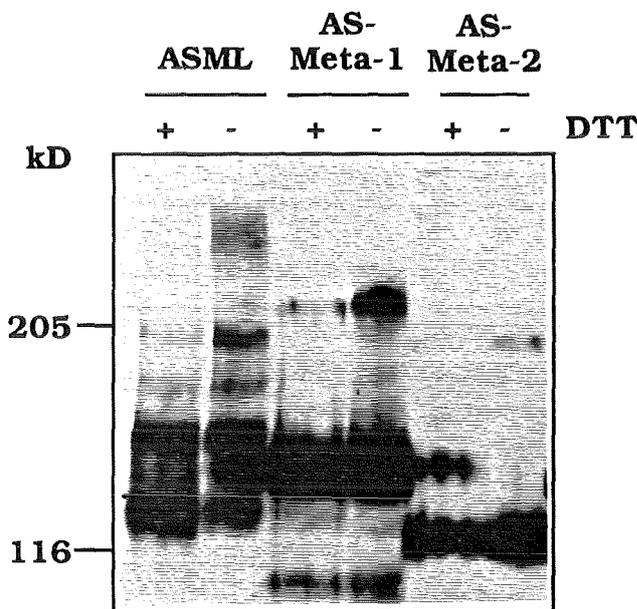


Abb. 15 CD44v-Isoformen bilden hochmolekulare Komplexe unter nichtreduzierenden Bedingungen

Zellextrakte von BSp73ASML-Zellen (ASML) BSp73AS-Meta-1- (AS-Meta-1) und BSp73AS-Meta-2-Transfektanten (AS-Meta-2) wurden unter reduzierenden (+DTT) und nichtreduzierenden (-DTT) Bedingungen präpariert. Die Konzentration der Zellextrakte wurde auf einem SDS-Gel analysiert (durch Färbung mit CBB R250 und Vergleich mit einem Zellextrakt bekannter Konzentration). Nachfolgend wurden die Extrakte auf einem

SDS-Gel (6% Acrylamid) analysiert. Dabei wurden von BSp73ASML +/- DTT jeweils 100 µg, von BSp73AS +/- DTT jeweils 10 µg und von BSp73AS-Meta-2 +/- DTT jeweils 20 µg aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Immobilon-Membran transferiert und eine Western-Analyse mit 1.1ASML als Primärantikörper, wie unter Abb. 1 bzw. im Methodenteil unter 6.3 beschrieben, durchgeführt.

Unter nichtreduzierenden Bedingungen werden in den Zellextrakten von BSp73ASML-Zellen und den CD44v-Transfektanten AS-Meta-1 und AS-Meta-2, zusätzlich zu den obligatorischen CD44v-Proteinen dieser Zellen, jeweils auch hochmolekulare Banden durch den CD44v-spezifischen Antikörper 1.1ASML "angefärbt" (Abb. 15, ASML, AS-Meta-1 und AS-Meta-2, jeweils -DTT). Unter reduzierenden Bedingungen sind diese Extrabanden nicht oder nur ganz schwach (bei AS-Meta-1 +DTT) zu sehen (Abb. 15, ASML, AS-Meta-1 und AS-Meta-2, jeweils +DTT). Die verschiedenen Komplexe unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht. Bei BSp73ASML-Zellen ist eine diffuse Färbung bei ca. 300-350 kD zu sehen, während bei BSp73AS-Meta-1 (~ 280 kD) und bei BSp73AS-Meta-2 (~ 230 kD) konkrete Banden vom mAk 1.1ASML identifiziert werden. Offensichtlich sind alle 1.1ASML-spezifischen CD44v-Isoformen in der Lage hochmolekulare Komplexe zu bilden. Durch Experimente mit chemischen Protein-Kopplungsreagentien konnte gezeigt werden, daß ausschließlich homotypische Aggregation von CD44v-Molekülen in diesen Komplexen vorliegt (Jonathan

Sleeman, pers. Mitteilung). Allerdings liegt nur ein geringer Prozentsatz (5% oder weniger) dieser Moleküle im Komplex vor. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen den beteiligten CD44v-Proteinen nur transient oder wird durch die Probenzubereitung zerstört.

Bei der BSp73ASML-Zelllinie wird ein hochmolekularer Bereich vom mAk 1.1ASML angefärbt (300-350 kD). Eventuell liegt bei diesen Zellen eine Oligomerisierung der CD44v-Isoformen vor. Dies würde das höhere Mw des Komplexes und auch die diffuse Färbung durch den Antikörper bei dieser Zelllinie erklären.

Die 1.1ASML-spezifischen CD44v-Isoformen sind in der Lage unter nichtreduzierenden Bedingungen homotypische Aggregate (Dimere und Multimere) auszubilden. Eine Aggregation verschiedener CD44v-Isoformen miteinander bzw. zwischen CD44v und CD44s konnte nicht beobachtet werden.

3.8 CD44v-Isoformen werden auch auf normalem Rattengewebe exprimiert

Viele Moleküle, die auf transformierten Zellen exprimiert werden, können auch, zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien, auf normalem Gewebe nachgewiesen werden. Das Membranprotein CEA ("Carcinoembryonic Antigen") z.B. kommt massiv auf Kolonkarzinomzellen und einigen anderen Tumorzellen, jedoch auch auf embryonalen und adulten Dünndarmzellen vor (Benchimol et al., 1989). Eine Expression der 1.1ASML-spezifischen CD44v-Proteine konnte zunächst nur auf Tumorzellen beobachtet werden (Günthert et al., 1991; Hofmann et al., 1993). Erst später konnte mit aktivierten Lymphozyten auch eine erste "normale Zellpopulation" identifiziert werden, bei der eine Expression von 1.1ASML-spezifischen CD44v-Isoformen stattfindet (Arch et al., 1992). Um eine Expression von CD44v-Proteinen auf normalem Rattengewebe zu untersuchen und damit eine mögliche physiologische Funktion dieser Proteine kennenzulernen, wurden verschiedene Organe präpariert und mit verschiedenen Methoden (Western-Analyse, Immunhistochemie) auf Gegenwart dieser Moleküle getestet (Abb.16-19).

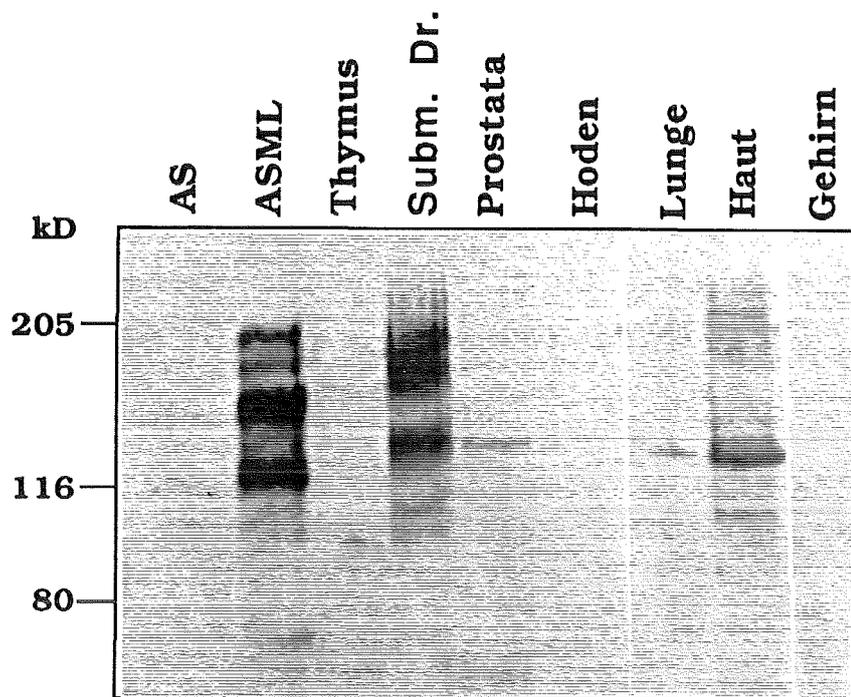


Abb. 16 Expression von CD44v auf normalem Rattengewebe

Die indizierten Rattenorgane wurden präpariert (Subm. Dr. = Unterkieferspeicheldrüse), unter flüssigem Stickstoff zermörsert und in heißem (95 °C) Proteinprobenpuffer resuspendiert. Zur vollständigen Desintegration von DNA und festen Zellbestandteilen wurden die Gewebe homogenisiert und nachfolgend ~ 1 min. sonifiziert. Zelldebris wurden abzentrifugiert (2x) und die Überstände durch Anfärbung mit CCB R250 auf gleiche Proteinkonzentration eingestellt. 100 µg Proteinextrakt der verschiedenen Gewebe wurden auf einem SDS-Gel (7,5% Acrylamid) aufgetrennt und nachfolgend auf eine Immobilon-Membran transferiert. Western-Analyse mit 1.1ASML als Primärantikörper wurde wie im Methodenteil (6.3) bzw. wie unter Abb. 1 beschrieben, durchgeführt.

Während in Gewebeextrakten von Thymus, Hoden und Gehirn keine CD44v-Expression mit dem mAk 1.1ASML nachgewiesen werden kann (Abb. 16), reagiert der Antikörper stark mit Proteinen der Unterkieferspeicheldrüse (Abb. 16, Subm. Dr.). Eine deutliche Bande von 130 kD, eine diffuse Färbung im Molekulargewichtsbereich von 160 bis 200 kD und eine schwache Reaktion mit einem 100 kD-Protein ist zu erkennen (Abb. 16, Subm. Dr.). Die diffuse Färbung im hochmolekularen Bereich könnte CD44v-Isoformen repräsentieren, die leicht unterschiedlich glykosyliert sind (und daher in der SDS-Elektrophorese auch sehr eng beieinander laufen). Das 130 kD Protein ist als dominante Bande auch im Extrakt von Prostata, Lunge und etwas stärker auch in der Haut nachzuweisen (Abb. 16). In Haut und Lunge werden weitere Banden, wenn auch sehr schwach, durch den mAk 1.1ASML identifiziert (Haut: 90, 105, 200 und 220 kD; Lunge: 200 und 220 kD).

Die Untersuchung der Rattengewebe durch Western-Analyse mit dem mAk 1.1ASML zeigt ein repräsentatives Bild aller in diesen Geweben exprimierten CD44v-Proteine, wobei die CD44v-Expression jedoch keinem spezifischen Zelltyp dieser Gewebe zugeordnet werden kann. Dies gelingt mit der Immunhistochemie. Aus diesem Grund wurden von einigen Rattenorganen Gefrierschnitte angefertigt und Immunhistochemie mit dem mAk 1.1ASML wurde durchgeführt (Abb. 17 und 18).

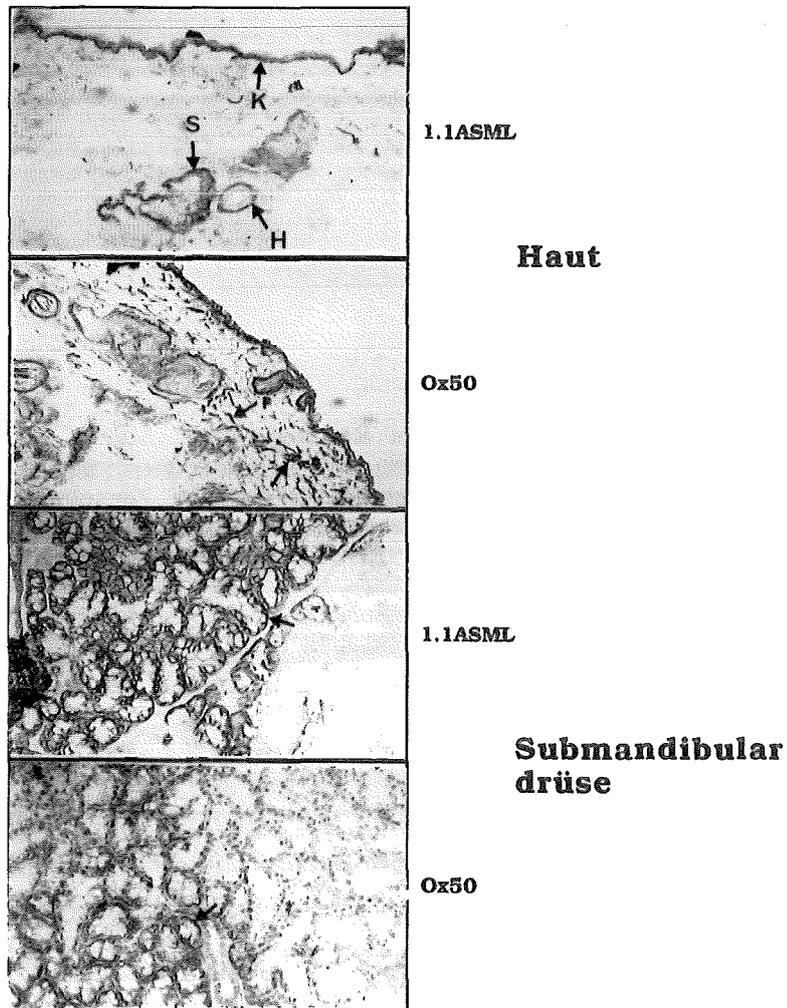


Abb. 17 Der mAk 1.1ASML identifiziert CD44v-Proteine auf Keratinozyten der Haut und Epithelzellen der Speicheldrüse.

Organe wurden direkt nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kryoschnitte in einer Stärke von 5 µm wurden angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgebracht, angetrocknet und fixiert. Das zur Fixierung verwendete Aceton wurde ausgewaschen und endogen im Gewebe vorkommende Peroxidase durch Inkubation mit H₂O₂ inaktiviert. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 10% FCS (in Zellkulturmedium) abgesättigt. Im nächsten Schritt wurde als Primärantikörper entweder 1.1ASML, Ox50 oder anti-TNP (als Isotypkontrolle, nicht gezeigt) in einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml verdünnt in Zellkulturmedium mit 10% FCS auf die Schnitte appliziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssiger Primärantikörper ausgewaschen und der Sekundärantikörper (Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG 1:500 verdünnt in Zellkulturmedium mit 10% FCS) auf die Schnitte gegeben. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde ebenfalls ausgewaschen und in einem letzten Inkubationsschritt ein Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplex appliziert. Nach dieser Inkubation wurden nichtgebundene Moleküle des Komplexes entfernt und Bindung durch Umsatz des Färbungsagens AEC nachgewiesen. Die Detektionsreaktion wurde nach einer angemessenen Zeit abgestoppt und die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nachfolgend wurden die Schnitte für ~ 30 min. luftgetrocknet, mit Glyzergel eingebettet und mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop im Hellfeld analysiert. Genaue Angaben über verwendete Lösungen und Inkubationszeiten sind dem Methodenteil zu entnehmen (6.10). Charakteristische Signale sind mit Pfeilen indiziert. Abkürzungen: K: Keratinozyten, H: Haarwurzelscheiden, S: Schweißdrüsen.

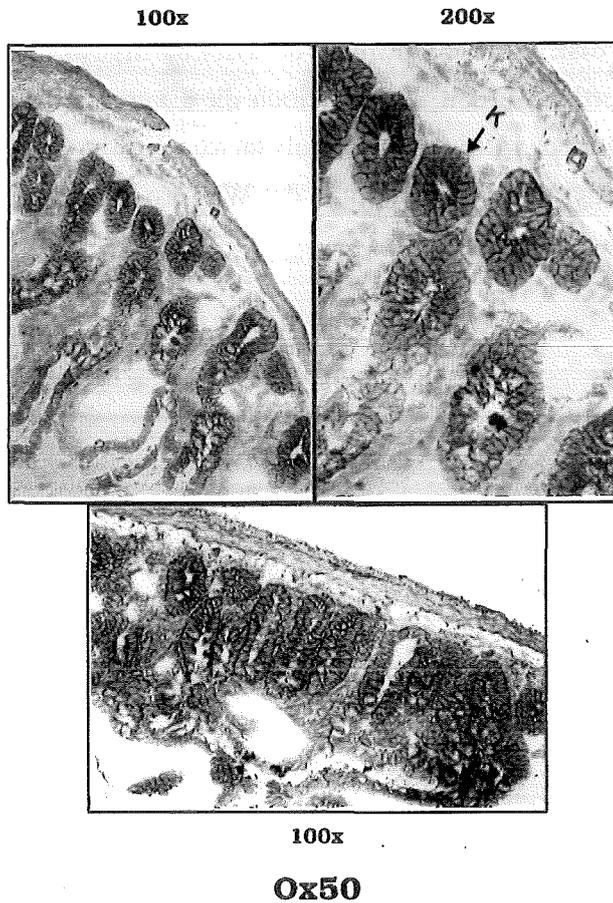
Auf Gefrierschnitten der Haut reagiert der mAk 1.1ASML spezifisch mit nichtverhornten Keratinozyten aller epithelialen Schichten der Epidermis (mit Pfeil indiziert: K) und mit dem Epithel von Schweißdrüsen (mit Pfeil indiziert: S) und Haarwurzelscheiden (Mit Pfeil indiziert: H; Abb. 17, 1.1ASML; Wirth et al., 1993). Der für den gemeinsamen Standardanteil von CD44v und CD44s-Proteinen spezifische mAk Ox50 identifiziert die gleichen Zelltypen. Darüberhinaus werden jedoch einzelne, diffus in der Subkutis verteilte Zellen angefärbt (gekennzeichnet mit einem Pfeil). Bei diesen Zellen handelt es sich möglicherweise um Fibroblasten und (oder) Langerhans Zellen der Haut (Abb. 17, Ox50). Die Beobachtung, daß der mAk Ox50 dieselben Zellen erkennt wie der CD44v-spezifische mAk 1.1ASML ist auf die Präsenz von CD44s-Sequenzen auf den CD44v-Proteinen zurückzuführen. Die in der Subkutis nur von Ox50 angefärbten Zellen exprimieren demnach die CD44s-Isoform oder v6-negative CD44v-Isoformen. Auch auf menschlichen Hautschnitten konnte CD44v-Expression auf Keratinozyten nachgewiesen werden (Heider et al., 1993). Außerdem konnte aus einer humanen Keratinozytenzelllinie die bisher größte CD44v-Isoform, mit 338 zusätzlichen Aminosäuren, identifiziert werden (Hofmann et al., 1991). Möglicherweise repräsentiert das im Proteinlysate von Rattenhaut nachgewiesene 130-kD Molekül das Rattenhomolog zum humanen "Keratinozytentyp" (Abb. 16; Heider et al., 1993).

Der mAk 1.1ASML identifiziert eine Reihe von hochmolekularen CD44v-Isoformen (100, 130, und 160 - 200 kD) im Extrakt der Submandibulardrüse (Abb. 16, Subm. Dr.). Durch Immunhistochemie wird das Epithel der serösen Drüsenzellen dieser Speicheldrüse angefärbt (Abb. 17, 1.1ASML und Ox50, mit Pfeil gekennzeichnet). Offensichtlich wird auf den mukösen Drüsenzellen dieses Gewebes CD44 nicht exprimiert, da keine Reaktion mit dem mAks 1.1ASML und Ox50 erfolgt.

In der Lunge konnten durch Immunhistochemie einzelne CD44v-positive Zellen identifiziert werden (nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich dabei um infiltrierende Immunzellen (evtl. Makrophagen) und nicht um Zellen des eigentlichen Lungengewebes. Die durch Western-Analyse nachgewiesenen schwachen Signale im Lungenextrakt (Abb. 16) repräsentieren offensichtlich CD44v-Proteine dieser in der Immunhistochemie positiven Zellen.

CD44v kann auf dem Darmepithel der Ratte nachgewiesen werden

Die Expression von CD44-Isoformen auf der Mukosa von Dün- und Dickdarm des Menschen wurde bereits analysiert (Heider et al., 1993). Auf Gefrierschnitten konnte lediglich eine schwache Expression von CD44s an der Basis der Lieberkühnschen Krypten identifiziert werden, während CD44v-Isoformen an derselben Stelle kaum nachzuweisen waren. Mit fortschreitender Tumorprogression dieses Gewebes kann eine Expression von CD44v-Proteinen jedoch beobachtet werden. CD44v-Isoformen werden ab dem Polypenstadium synthetisiert. Invasive Kolonkarzinome und Metastasen dieser Tumoren sind ebenfalls CD44v positiv (Heider et al., 1993). Um nachzuweisen ob die Expression von CD44v auf dem Epithel von Dünndarm und Kolon der Ratte ebenfalls erst nach Transformation nachweisbar ist oder ob die Synthese dieser Proteine schon unter physiologischen Bedingungen stattfindet, wurden diese Gewebe präpariert und auf CD44v-Expression untersucht (Abb. 18 und 19).

1.1ASML**Abb. 18 CD44 wird auf Dünndarmepithel der Ratte exprimiert**

Dünndarm und Kolon wurden präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kryoschnitte wurden bei einer Temperatur von -25°C angefertigt und in einer Stärke von $5\mu\text{m}$ auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Immunhistochemie mit den Antikörpern 1.1ASML, Ox50 und anti-TNP (Isotypkontrolle, nicht gezeigt) wurde analog zu der unter Abb. 17 (bzw. im Methodenteil unter 6.10) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Immunhistochemie wurde mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop im Hellfeld analysiert. Die Gewebeschnitte wurden bei verschiedenen Vergrößerungen fotografiert (1.1ASML: 100x und 200x obere Reihe, Ox50: 100x untere Abbildung). Eine Lieberkühnsche Darmkrypte ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Abkürzungen; Lieberkühnsche Krypten; K.

In normalem, nichttransformiertem Dünndarm der Ratte findet eine starke Expression von CD44v-Proteinen statt (Abb. 18; Wirth et al., 1993). Die Expression von CD44v ist auf die Basis der Lieberkühnschen Krypten beschränkt (Abb.18, 1.1ASML 100x und 200x, eine Krypte ist mit K gekennzeichnet; Wirth et al., 1993). Die Art des Signals ist typisch für Proteine, die auf der Zellmembran lokalisiert sind. Eine deutliche Färbung ist auch mit dem

mAk Ox50 zu beobachten. Aufgrund der Präsenz von CD44s-Sequenzen auf den CD44v-Isoformen kann jedoch nicht entschieden werden, ob neben CD44v-Proteinen auch noch die CD44s-Isoform in den Darmkrypten synthetisiert wird. Das umliegende Darmgewebe wird jedoch nur mit Ox50 gefärbt, was auf eine Expression der CD44s-Isoform bzw. auf v6-negative CD44v-Isoformen hinweist. Gefrierschnitte von Dickdarmgewebe konnten aus technischen Gründen nicht angefertigt werden. Um dennoch die Expression von CD44v in diesem Gewebe untersuchen zu können, wurde ein Proteinlysate von Kolongewebe hergestellt und im Vergleich mit einem Proteinlysate aus Dünndarm in der Western-Analyse getestet (Abb. 19).



Abb. 19 CD44v Isoformen auf dem Darmepithel der Ratte

Präparation der Proteinlysate und Western-Analyse erfolgte wie unter Abb. 16 bzw. wie im Methodenteil beschrieben (6.1.2 bzw. 6.3).

CD44v-Isoformen werden in einem Proteinlysate von normalem Dickdarmgewebe der Ratte und in nichttransformiertem Dünndarm nachgewiesen (Abb.19). Während im Dickdarmgewebe eine starke diffuse Reaktion des mAk 1.1ASML in einem Molekulargewichtsbereich von ~ 170 bis 210 kD zu beobachten ist (Abb. 19, Dickdarm) sind die identifizierten Proteine im Dünndarm größer (190 bis 230 kD; Abb. 19, vgl. Dünndarm mit Dickdarm). Es ist unwahrscheinlich, daß die diffuse Anfärbung im Proteinlysate von Dün- und Dickdarm durch den mAk 1.1ASML auf eine einzige Proteinspezies zurückzuführen ist. Möglicherweise werden in diesem Gewebe eine ganze Reihe von CD44v-"Modifikationsisoformen" synthetisiert, die geringfügige Unterschiede in ihrer Glykosylierung und damit auch unterschiedliche Mobilität in der SDS-Elektrophorese aufweisen.

CD44v wird auf dem Epithel von nichtransformiertem Dün- und Dickdarm der Ratte deutlich exprimiert und, im Gegensatz zu humaner Kolonmukosa, nicht erst während der malignen Transformation (Heider et al., 1993; Wirth et al., 1993). Durch Immunhistochemie, Western- und FACS-Analyse konnte eine Expression von *CD44v* ebenfalls auf Keratinozyten der Epidermis, auf aktivierten Lymphozyten und dem Epithel der Unterkieferspeicheldrüse nachgewiesen werden (Arch et al., 1992; Wirth et al., 1993). Dabei ist auffallend, daß mit den Keratinozyten der Epidermis, den Epithelzellen an der Basis der Darmkrypten und aktivierten Lymphozyten (Epithelzellen der Submandibulardrüse bilden eine Ausnahme) solche Zelltypen *CD44v*-Proteine exprimieren, die während bestimmter Differenzierungsphasen an Migrationsvorgängen teilnehmen.

3.9 *CD44*-Rezeptorglobuline

Von den *CD44v*-Isoformen Meta-1 und Meta-2 ist bekannt, daß Expression auf einer nichtmalignen Rezipientenzelllinie ausreicht, um den metastatischen Phänotyp zu vermitteln (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). Die Funktion der *CD44v*-Isoformen in diesem Prozeß ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise kommt es jedoch zur Bindung eines aktivierenden Liganden an die *CD44v*-Moleküle. Ein Hinweis dafür ist die Blockierung der Metastasierung *CD44v*-positiver Zellen durch den mAk 1.1ASML (Reber et al., 1990; Seiter et al., 1993). Eine weitere potentielle Möglichkeit, in diesen Prozeß einzugreifen bzw. den Liganden zu identifizieren, ist die Verwendung von gentechnologisch veränderten, sezernierten *CD44v* Proteinen. Eine Methode solche Proteine herzustellen ist die Fusion des extrazellulären Anteils des Membranproteines mit der schweren Kette eines Antikörpermoleküls. Ligandenspezifität und -affinität dieser sog. Rezeptorglobuline bleibt nach Expression in eukaryontischen Zellen meist erhalten (Capon et al., 1989; Watson et al., 1990; Arrufo et al., 1990; Imai et al., 1991). Weitere Eigenschaften dieser Moleküle sind die korrekte Modifikation nach Expression in eukaryontischen Zellen, Sekretion und leichte Reinigung durch Affinität des IgG-Anteils an immobilisiertes Protein A und Protein G sowie der leichte experimentelle Nachweis mit anti-IgG Antikörpern. Mit einem Meta-1 Rezeptorglobulin sollte es möglich sein, die Metastasierung von Meta-1-Transfektanten durch Konkurrenz der Bindung des putativen Liganden *in vivo* zu blockieren und darüberhinaus den *CD44v*-spezifischen Liganden auf Gewebeschnitten oder im Zellextrakt zu identifizieren.

3.9.1 CD44-Rezeptorglobuline werden synthetisiert und sezerniert

Um CD44-Rezeptorglobuline herzustellen, wurden die cDNAs, die für den extrazellulären Anteil des CD44s-Moleküls und der CD44v-Isoform Meta-1 kodieren (Günthert et al., 1991; Hofmann, 1991) sowie die cDNAs der schweren Ketten eines Rattenantikörpermoleküls (Isotyp IgG2c; Brüggemann et al., 1987) und eines murinen Antikörpers (Isotyp IgG1; Honjo et al., 1979) zwischen spezifischen Oligonukleotiden durch PCR-Amplifikation isoliert. Die cDNA-Fragmente wurden ligiert und in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Die so erhaltenen Expressionskonstrukte wurden unter Kontrolle des SV40-Promotors stabil in Rattenfibroblasten transfiziert. Die Expression und Sekretion eines dieser Rezeptorglobuline (Meta-1-rIgG2c) ist in Abb. 20 dargestellt.

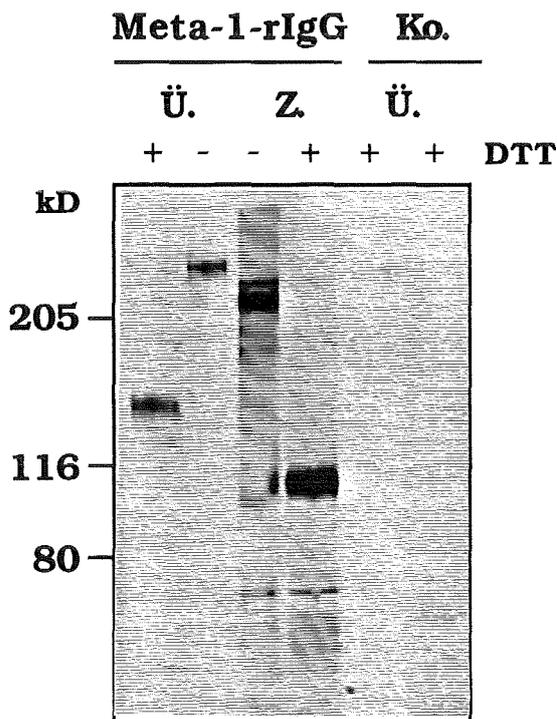


Abb. 20 Meta-1-rIgG wird in Rat 2-Zellen effizient synthetisiert und sezerniert

Meta-1-Rezeptorglobulin-Transfektanten wurden für vier Std. metabolisch in Gegenwart von ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Nach dieser Zeit wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen wurden geerntet. Nach der Lyse der Zellen wurden die Zellkerne abgetrennt. Zum Überstand des Zelllysats und zum Zellkulturüberstand wurde Protein G-Agarose (50 μl einer 1:1 Mischung in Lysispuffer) zugegeben und für zwei Std. bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Protein G-Agarose (mit den gebundenen Rezeptorglobulinen) zur Abtrennung von unspezifisch gebundenem Protein gewaschen und nachfolgend mit Proteinprobenpuffer aufgeköcht. Die an Protein G-Agarose gebundenen Proteine wurden auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) analysiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel fixiert, aktiviert und getrocknet. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts.

Das Meta-1-rIgG2c-Rezeptorglobulin wurde von Rat 2-Fibroblasten exprimiert und in den Zellkulturüberstand sezerniert (Abb. 20, Meta-1-rIgG). Durch Inkubation mit Protein G-Agarose wird eine zytoplasmatische Form von ~ 110 kD als Monomer (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Z./+DTT) und ~ 220 kD im dimerisierten Zustand (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Z./-DTT) nachgewiesen. Die Dimerisierung erfolgt über die Gelenk-Region des IgG-Anteils (analog zu Antikörpermolekülen). Das sezernierte Molekül weist als Monomer ein Molekulargewicht von ~

140 kD (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Ü./+DTT) und als Dimer von ~ 280 kD (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Ü./-DTT) auf. Bei einem weiteren G418-resistenten Klon derselben Transfektion (Ko) kann weder zytoplasmatisch (Abb. 20, Ko/Z./+DTT) noch im Zellkulturüberstand (Abb. 20, Ko/Ü./+DTT) eine Expression von Meta-1-Rezeptorglobulin beobachtet werden. Offensichtlich hat dieser Klon lediglich das G418 Resistenzplasmid aufgenommen.

Auffallend ist, daß ein Unterschied im Molekulargewicht zwischen der intrazellulären Form (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Z.) und der sezernierten Form des Rezeptorglobulins (Abb. 20, Meta-1-rIgG/Ü.) besteht. Offensichtlich wird die sezernierte Form stärker modifiziert als das intrazellulär lokalisierte Molekül. Es ist durchaus denkbar, daß die zytoplasmatische Form nur ein Vorläufermolekül darstellt und nach zusätzlicher Modifikation ebenfalls sezerniert wird.

Das Meta-1-Rezeptorglobulin wird von Rat 2-Zellen exprimiert und in den Zellkulturüberstand sezerniert. Darüberhinaus zeigt dieses chimäre Protein Affinität zu immobilisiertem Protein G. Um nachzuweisen, ob der mAk 1.1ASML an den Meta-1-Anteil des Rezeptorglobulins binden kann, wurden verschiedene Rezeptorglobulin-Transfektanten durch Western-Analyse (Abb. 21) untersucht. Desweiteren sollte, um die Spezifität des Rezeptorglobulins zu überprüfen, versucht werden, durch Zugabe von exogenem Meta-1-Rezeptorglobulin die Bindung von 1.1ASML an Meta-1-Transfektanten zu blockieren (Abb. 22).

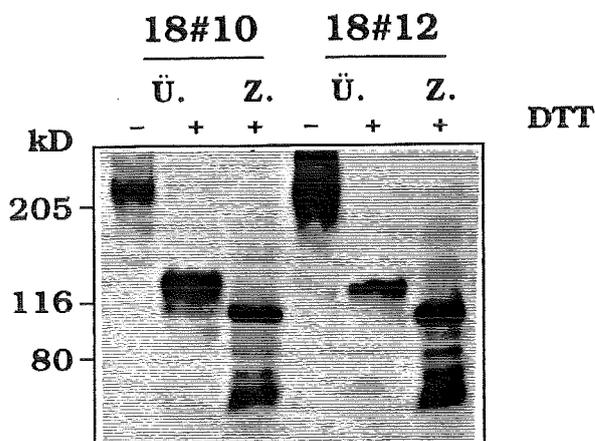


Abb. 21 Der mAk 1.1ASML reagiert spezifisch mit Meta-1-Rezeptorglobulin

Der Zellkulturüberstand von Meta-1-Rezeptorglobulin-Transfektanten 18#10 und 18#12 wurde durch Ammonsulfatpräzipitation 1:10 eingengt und unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen zusammen mit Zellextrakten dieser Zellen auf einem SDS-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt. Die Western-Analyse mit 1.1ASML als Primärantikörper wurde wie unter Abb. 1 bzw. im Methodenteil unter 6.3 beschrieben, durchgeführt.

Zwei unabhängig voneinander isolierte Transfektanten-Klone zeigen identische Ergebnisse (Abb. 21, 18#10 und 18#12). In beiden Klonen kann die Synthese von Meta-1-Rezeptorglobulin mit dem mAk 1.1ASML im Zellysat und im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind dabei vergleichbar mit denen aus Abb. 20. Im Zellysat wird unter reduzierenden Bedingungen die monomere 110 kD-Form nachgewiesen (Abb. 21, 18#10 und 18#12/Z./+DTT). Die sezernierten Formen laufen in der SDS-

Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen bei ~ 130 - 140 kD (Abb. 21, 18[#]10 und 18[#]12/Ü./+DTT) und in der dimerisierten Form ca. bei 260-280 kD (Abb. 21, 18[#]10 und 18[#]12/Ü./-DTT). Die kleineren Banden, die hauptsächlich im Zellextrakt (Abb. 21, 18[#]10 und 18[#]12/Z./+DTT) durch den Antikörper identifiziert werden, repräsentieren vermutlich Degradationsprodukte des Rezeptorglobulins.

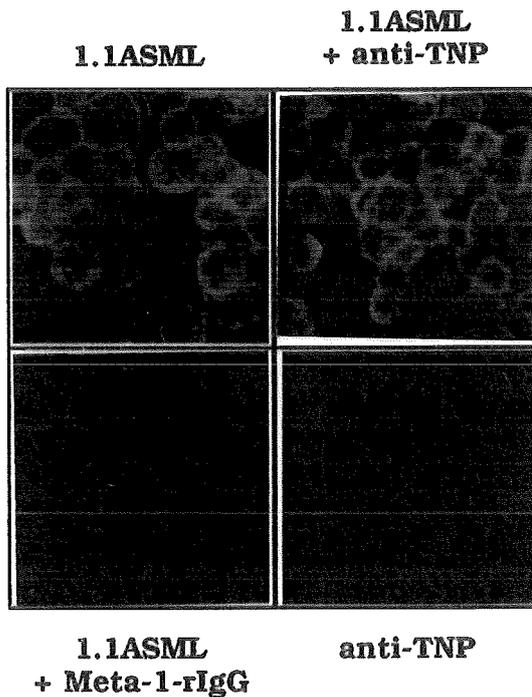


Abb. 22 Meta-1-Rezeptorglobulin kompetitiert die Bindung von mAk 1.1ASML an Meta-1-Transfektanten

BSp73AS-Meta-1-Transfektanten wurden über Nacht in Zellkulturkammern für die Immunfluoreszenz ("chamber slides") kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und mit Paraformaldehyd (1%) fixiert. Das Fixierungsmittel wurde ausgewaschen ehe die Zellen a.) mit mAk 1.1ASML (1µg/ml Medium + 10% FCS; indiziert mit 1.1ASML), b.) mit mAk 1.1ASML (1µg/ml Medium + 10% FCS;), der für 20 min. mit einem doppelten molaren Überschuß an Meta-1-Rezeptorglobulin vorinkubiert wurde (indiziert mit 1.1ASML+Meta-1-rIgG), c.) mit mAk 1.1ASML (1µg/ml Medium + 10% FCS), der für 20 min. mit einem doppelten molaren Überschuß einer mAk-Isotypkontrolle (antiTNP) vorinkubiert wurde (indiziert mit 1.1ASML+anti-TNP) und d.) mit anti-TNP(1µg/ml Medium + 10% FCS; indiziert mit anti-TNP), inkubiert wurden. Nach der Inkubation mit diesen Antikörpern wurden die Zellen

gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Kaninchen-anti-Maus-IgG konjugiert mit Rhodamin, 1:100 verdünnt in Kulturmedium mit 10% FCS). Nach 30 min. wurde überschüssiger Sekundärantikörper ausgewaschen, die Zellen angetrocknet, mit Glyzergel eingebettet und in einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop analysiert.

BSp73AS-Meta-1-Transfektanten werden vom mAk 1.1ASML, in einer für Membranproteine typischen Weise, angefärbt (Abb. 22, 1.1ASML). Der als Isotypkontrolle eingesetzte mAk anti-TNP ist nicht in der Lage, an die Meta-1-Transfektanten zu binden (Abb. 22, anti-TNP). Durch Vorinkubation mit dem Meta-1-Rezeptorglobulin wird die Bindung des CD44v-spezifischen Antikörpers an die Meta-1-Transfektanten, wie erwartet, stark beeinträchtigt (Abb. 22, 1.1ASML+Meta-1-rIgG), während der Kontrollantikörper anti-TNP keinen Einfluß hat (Abb. 22, 1.1ASML+anti-TNP)

Demnach findet eine Bindung des mAk 1.1ASML an die Meta-1-Rezeptorglobuline statt, woraus geschlossen werden kann, daß dieses Rezeptorglobulin in einer funktionell aktiven Form vorliegen sollte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß ein Meta-1-Rezeptorglobulin-Konstrukt (Meta-1-rIgG2c) nach Transfektion in Rattenfibroblasten effizient exprimiert und in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Dieses Fusionsprotein zeigt Affinität an immobilisiertes Protein G (über den IgG-Anteil) und wird vom CD44v-spezifischen mAk 1.1ASML erkannt. Das Rezeptorglobulin liegt demnach in einer funktionell aktiven Form vor. Insgesamt wurden vier Rezeptorglobulin-Konstrukte hergestellt (Meta-1-rIgG2c, CD44s-rIgG2c, Meta-1-mIgG1, CD44s-mIgG1) und analog zu den in Ab. 20-22 gezeigten Experimenten getestet. Während die ersten beiden Moleküle (Meta-1-rIgG2c und CD44s-rIgG2c) hauptsächlich für *in vivo*-Kompetitionsexperimente in der Ratte vorgesehen sind, wobei untersucht werden soll, ob mit einem Überschuß von Meta-1-rIgG2c die Metastasierung von Meta-1 Transfektanten blockiert werden kann (CD44s-rIgG2c dient dabei als Kontrolle für die Spezifität des CD44v-Anteils), eignen sich die Moleküle mit dem murinen IgG-Anteil besonders zur Identifizierung eines spezifischen Liganden *in vitro* (auf Gewebeschnitten bzw. im Zellysat), da sie mit einem verfügbaren Sekundärantikörper gegen das murine IgG leicht nachgewiesen werden können.

3.9.2 CD44-Rezeptorglobuline binden spezifisch an Darmepithel der Ratte

Um einen Liganden für Meta-1 auf Normalgewebe der Ratte zu identifizieren, wurden verschiedene Organe der Ratte präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und die Bindung von Meta-1-mIgG im Vergleich mit CD44s-mIgG getestet. Da aus Tierexperimenten bekannt war, daß Meta-1-Transfektanten präferentiell in Lymphknoten und später in die Lunge metastasieren, wurden lymphatische Organe und die Lunge zunächst auf Expression eines Meta-1-spezifischen Liganden untersucht. Eine Bindung des Meta-1-mIgG sowie von CD44s-mIgG konnte jedoch weder in diesen Organen (Lunge, Milz, Thymus, Lymphknoten: popliteal, inguinal, axilär, cervical, paraaortal, parathymal) noch in einer Reihe weiterer Organe (Leber, Herz, Muskel, Submandibulardrüse und Haut) nachgewiesen werden. Lediglich auf Dünndarmepithel konnte eine spezifische Färbung durch die Rezeptorglobuline beobachtet werden (Abb. 23).

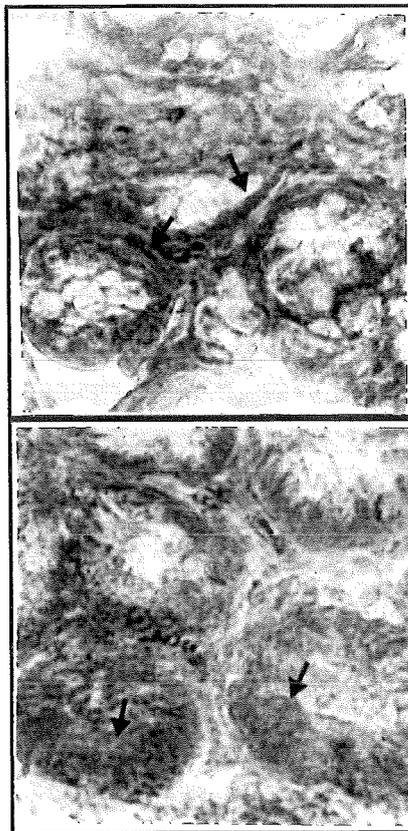
**CD44s -mIgG****Meta-1-mIgG**

Abb. 23 Meta-1-mIgG und CD44s-mIgG binden spezifisch an Strukturen des Dünndarmepithels
 Gefrierschnitte und Immunhistochemie wurden analog zu der unter Abb. 17 bzw. im Methodenteil (6.10) beschriebenen Technik durchgeführt. Anstatt des Primärantikörpers wurden die Schnitte dabei für 60 min. mit Meta-1-mIgG bzw. CD44s-mIgG (1 µg/ml) inkubiert. Jeweils zwei charakteristisch gefärbte Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mit dem CD44s-Rezeptorglobulin kann eine deutliche Reaktion mit Strukturen außerhalb der Lieberkühnschen Krypten festgestellt werden (Abb. 23, CD44s-mIgG, Kennzeichnung mit Pfeilen). Die fibrilläre Erscheinung der identifizierten Strukturen läßt vermuten, daß es sich dabei um Komponenten der extrazellulären Matrix handelt. Das Meta-1-Rezeptorglobulin bindet nur schwach an diese Strukturen. Eine stärkere Färbung mit diesem Molekül ist innerhalb der Darmkrypten zu beobachten (Abb. 23, Meta-1-mIgG, mit Pfeilen indiziert). Allerdings ist die Qualität des Gefrierschnittes zu schlecht, um die Färbung genau zu lokalisieren.

In vergleichbaren Experimenten mit einem Rezeptorglobulin, das den extrazellulären Anteil des humanen CD44s-Moleküls enthält, wurden auf Gefrierschnitten menschlichen Dünndarmgewebes ebenfalls fibrilläre Strukturen außerhalb der Darmkrypten angefärbt. Die beobachtete Bindung des humanen CD44s-Rezeptorglobulins konnte dabei Hyaluronsäure der *Lamina propria* und der epithelialen Basalmembran, jedoch nicht dem Darmepithel selbst zugeordnet werden (Arrufo et al., 1990).

3.9.3 Tumorgewebe bildet ein optimales Substrat für CD44-Rezeptorglobuline

Um festzustellen, ob das CD44s-Molekül und die CD44v-Isoform Meta-1 der Ratte ebenfalls Affinität zu Hyaluronsäure besitzen, sollte getestet werden, ob die Rezeptorglobuline in der Lage sind, an Gefrierschnitte von Tumoren zu binden, von denen bekannt ist, daß sie Hyaluronsäure produzieren (Iozzo, 1985). Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte eines BSp73AS-Tumors angefertigt und die Bindung von CD44s- bzw. Meta-1-Rezeptorglobulin auf den Schnitten untersucht (Abb. 24).

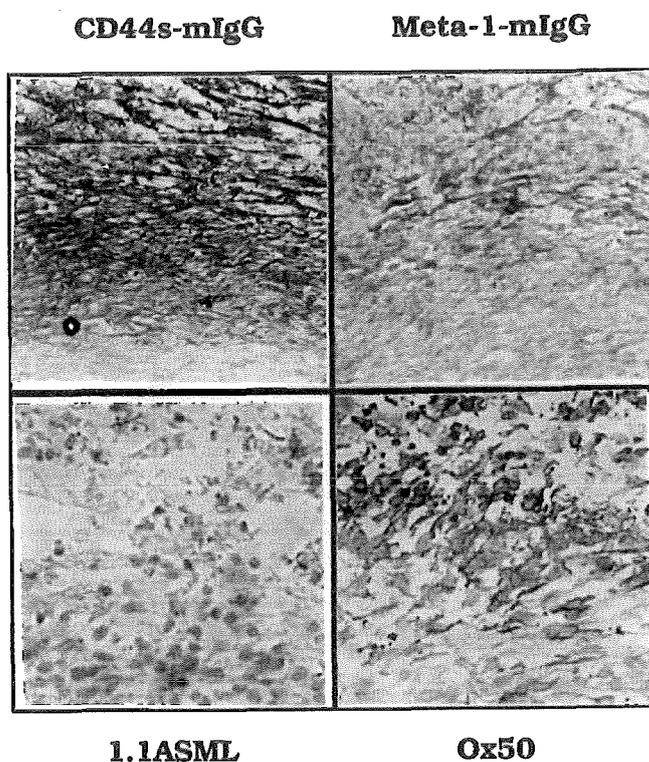


Abb. 24 CD44-Rezeptorglobuline binden an Tumorgewebe. Gefrierschnitte und Immunhistochemie wurde wie im Methodenteil (6.10) bzw. wie unter Abb. 17 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Primärantikörper 1.1ASML (links unten) und Ox50 (rechts unten) sowie die Rezeptorglobuline CD44s-mIgG (links oben) und Meta-1-mIgG (rechts oben) in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt.

CD44s- und Meta-1-Rezeptorglobulin binden an fibrilläre Strukturen der Tumorschnitte (Abb. 24, CD44s- und Meta-1-mIgG). Die Färbung von fibrillären (und nicht zellulären) Strukturen der Tumorschnitte weist darauf hin, daß der Ligand im Bindegewebe und nicht auf den Tumorzellen selbst lokalisiert ist. Der mAk Ox50 dagegen zeigt eine spezifische Membranfärbung der CD44s-positiven BSp73AS-Zellen (Abb. 24, Ox50). Als Isotypkontrolle (Maus IgG1) wurde in diesen Experimenten der CD44v-spezifische mAk 1.1ASML eingesetzt (Abb. 24, 1.1ASML). Die Reaktion mit fibrillären Strukturen auf Gewebeschnitten ist ein

deutlicher Hinweis für die Bindung der Rezeptorglobuline an Hyaluronsäure oder eine andere Komponente der ECM.

3.9.4 Die Bindung der Rezeptorglobuline an Tumorgewebe ist Hyaluronidase sensitiv

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob die Bindung der CD44s- und Meta-1-Rezeptorglobuline an Tumorgewebe tatsächlich auf einer Wechselwirkung mit Hyaluronsäure beruht, ist die Behandlung des Tumorgewebes mit Hyaluronidase vor der Inkubation mit den Rezeptorglobulinen (Abb. 25).

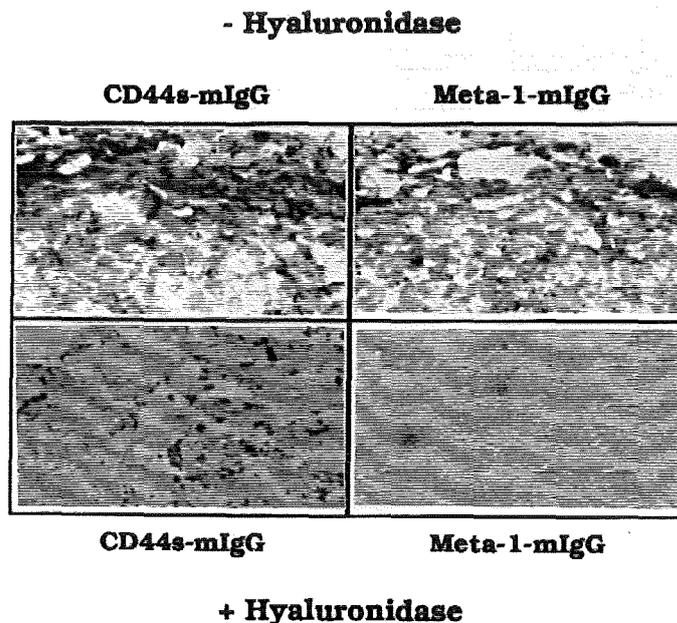


Abb. 25 Hyaluronidase-Behandlung verhindert die Bindung von CD44-Rezeptorglobulinen
Die Herstellung von Gefrierschnitten und die Immunhistochemie wurden wie im Methodenteil (6.10) bzw. unter Abb.17 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die Gefrierschnitte vor der Inkubation mit den Rezeptorglobulinen für 30 min. mit Hyaluronidase (5µg/ml) vorbehandelt. Die Hyaluronidase wurde mit PBS (3x für 2 min.) ausgewaschen, ehe die Rezeptorglobuline (CD44s-mIgG und Meta-1-mIgG +/-Hyaluronidase) in einer Konzentration von 1 µg/ml auf den Schnitten inkubiert wurden.

Durch Vorbehandlung mit Hyaluronidase wird die Bindung von CD44s- und Meta-1-Rezeptorglobulin an Tumorschnitte vollständig blockiert (Abb. 25, CD44s- und Meta-1-mIgG +Hyaluronidase). Dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung, daß die Rezeptorglobuline

tatsächlich an Hyaluronsäure binden. Es muß jedoch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß CD44s-mIgG und Meta-1-mIgG an Komponenten der ECM binden, die mit Hyaluronsäure assoziiert sind (z.B. an Chondroitinsulfat oder Link-Proteine) und durch die Hyaluronidase-Behandlung zusammen mit Hyaluronsäure aus dem Gewebe entfernt werden.

3.9.5 CD44-Rezeptorglobuline binden an Hyaluronsäure

Die Bindung der CD44s- und Meta-1-Rezeptorglobuline an Hyaluronsäure sollte durch ein Experiment bestätigt werden, bei dem durch einen Überschuß exogen zugegebener Hyaluronsäure diese Wechselwirkung blockiert (kompetitiert) werden kann. Die Spezifität der Bindung an Hyaluronsäure sollte darüberhinaus durch exogene Zugabe weiterer Matrixsubstrate, z.B. dem in seiner chemischen Struktur zu Hyaluronsäure sehr ähnlichen Chondroitinsulfat, überprüft werden. Neben Chondroitinsulfat wurden, als weitere Kompetitoren bei diesem Experiment Fibronectin und Kollagen verwendet. Für diese Komponenten der ECM konnte eine Affinität zu CD44 schon nachgewiesen werden (Carter und Wayner, 1988; Gallatin et al., 1989; Jalkanen und Jalkanen, 1992).

Es wurden serielle Gefrierschnitte von Tumorgewebe hergestellt. Die Rezeptorglobuline (CD44s-mIgG und Meta-1-mIgG) wurden zunächst mit den Kompetitoren und nachfolgend mit dem Tumorgewebe inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Rezeptorglobuline erfolgte mit einem anti-Maus-Sekundärantikörper und dem Biotin-Streptavidin System.

Abb 26 Die Bindung von CD44s- und Meta-1-mIgG an Hyaluronsäure ist spezifisch.

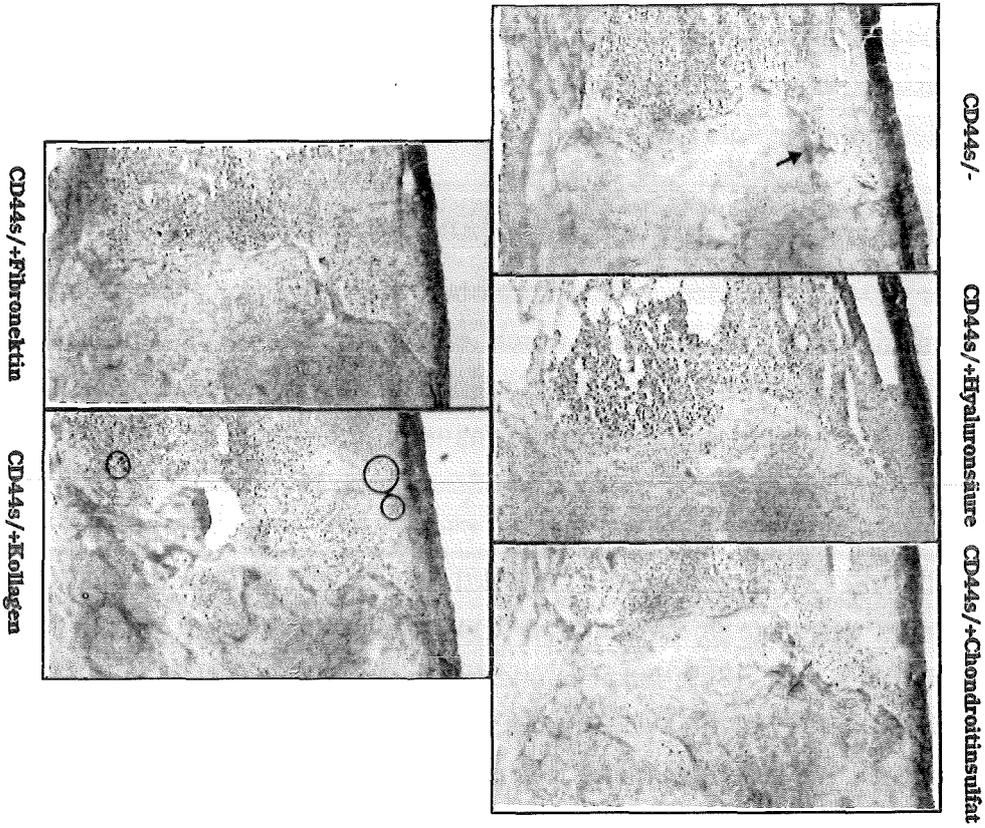
26 a.) CD44s-mIgG

Die Herstellung von Gewebeschnitten und die Durchführung der Immunhistochemie wurde bereits beschrieben (Methodenteil und Bildunterschrift von Abb. 17). CD44s-Rezeptorglobulin (1 µg/ml) wurde direkt (CD44s/-) oder nach Vorinkubation für 30 min. mit den Kompetitoren Hyaluronsäure (CD44s/+Hyaluronsäure), Chondroitinsulfat (CD44s/+Chondroitinsulfat), Fibronectin (CD44s/+Fibronectin) und Kollagen (CD44s/+Kollagen) auf die seriellen Tumorschnitte appliziert. Die Kompetitoren wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Bei CD44s/- ist ein charakteristisches Signal mit einem Pfeil indiziert.

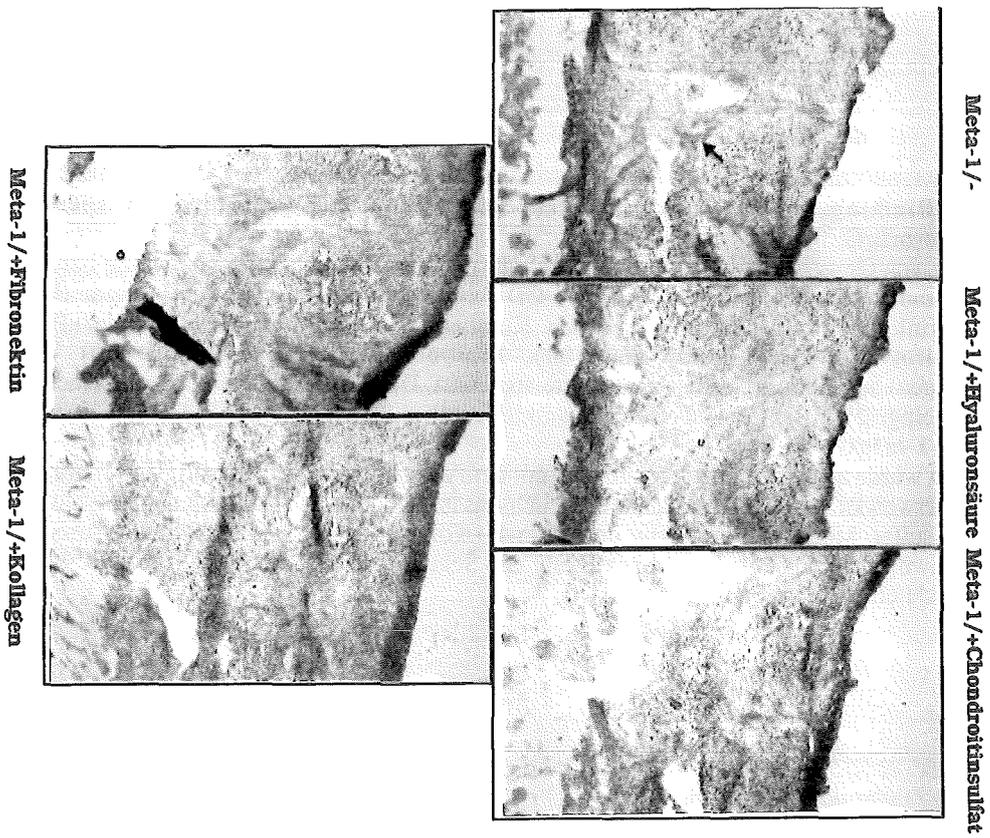
26 b.) Meta-1-mIgG

Das Experiment wurde analog zu 26a durchgeführt mit der Ausnahme, daß Meta-1-mIgG (1 mg/ml) an Stelle von CD44s-mIgG verwendet wurde. Die einzelnen Versuchsansätze sind mit Meta-1/-, Meta-1/+Hyaluronsäure, Meta-1/+Chondroitinsulfat, Meta-1/+Fibronectin und Meta-1/+Kollagen indiziert. Die charakteristische Färbung, die durch den Nachweis des CD44v-mIgG Moleküls auf den Schnitten beobachtet wird, ist bei CD44v/- durch einen Pfeil gekennzeichnet.

a



b



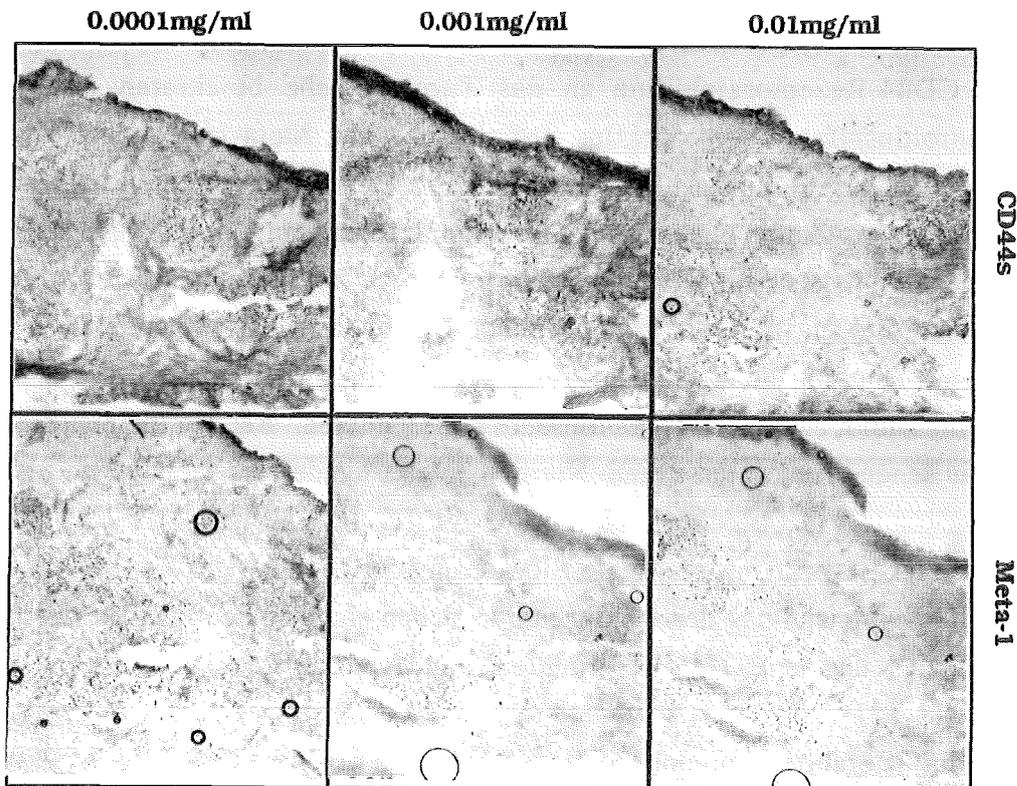
Beide CD44-Rezeptorglobuline binden an Hyaluronsäure (Abb. 26a und 26b). Lediglich exogen zugegebene Hyaluronsäure ist in der Lage die Bindung der Rezeptorglobuline an die Tumorschnitte zu blockieren (26a und b, CD44s- und Meta-1/+Hyaluronsäure). Dagegen können weder exogen zugegebenes Chondroitinsulfat noch Fibronectin und Kollagen die Bindung der CD44-Rezeptorglobuline an das Tumorgewebe blockieren (Abb. 26a, CD44s/+Chondroitinsulfat, -/+Fibronectin; -/+Kollagen; 26b, Meta-1/+Chondroitinsulfat; -/+Fibronectin; -/+Kollagen). Es kann kein Unterschied zu Tumorschnitten festgestellt werden, die mit CD44-Rezeptorglobulin ohne Kompetitor inkubiert wurden (Abb. 26a, CD44s/-; 26b, Meta-1/-; typische Signale sind mit Pfeilen gekennzeichnet). Bei den angefärbten Strukturen könnte es sich um die den Primärtumor umgebende Bindegewebetskapsel handeln. Es findet jedoch auch eine Bindung an fibrilläre Strukturen innerhalb der Tumormasse statt, die offensichtlich im Tumor enthaltene Hyaluronsäure repräsentieren. Bei den kleinen Zellen an der Grenze zwischen Tumormasse und Normalgewebe handelt es sich vermutlich um Lymphozyten.

Das Ergebnis dieses Experiments sowie die Blockierung der Bindung der Rezeptorglobuline nach Hyaluronidase-Behandlung der Tumorschnitte stellen einen eindeutigen Beweis für die Bindung von CD44s- und der CD44v-Isoform Meta-1 an Hyaluronsäure dar.

In den bisher durchgeführten immunhistochemischen Experimenten (3.9.2 - 3.9.5) konnten oftmals Unterschiede in der Intensität der Färbung des Gewebes nach Inkubation mit den Rezeptorglobulinen beobachtet werden. Um herauszufinden ob diese Intensitätsunterschiede auf eine unterschiedliche Affinität der Rezeptorglobuline für immobilisierte Hyaluronsäure (im Tumorgewebe) zurückzuführen sind, wurden diese Moleküle vor der Inkubation mit den Tumorschnitten mit unterschiedlichen Mengen exogener Hyaluronsäure (in Lösung) vorinkubiert.

Abb. 27 Meta-1 bindet stärker an immobilisierte Hyaluronsäure als CD44s

Gewebeschnitte wurden hergestellt und Immunhistochemie durchgeführt wie unter Abb. 17 bzw. im Methodenteil beschrieben. Anstatt mit einem Primärantikörper wurden die Tumorschnitte mit Rezeptorglobulinen (CD44s-mIgG bzw. Meta-1-mIgG) in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert. Konstante Mengen an Rezeptorglobulin wurden in diesem Experiment für 20 min. mit verschiedenen Konzentrationen (10µg/ml: CD44s bzw. Meta-1 0,01mg/ml; 1µg/ml: CD44s bzw. Meta-1 0,001mg/ml; 0,1 µg/ml: CD44s bzw. Meta-1 0,0001mg/ml) an Hyaluronsäure vorinkubiert und nachfolgend auf die Tumorschnitte gegeben.



Bei einer exogenen Hyaluronsäurekonzentration von 10 μ g/ml kann weder bei CD44s-mIgG noch bei Meta-1-mIgG eine Bindung an das Tumorgewebe beobachtet werden (Abb. 27, CD44s und Meta-1 bei 0,01mg/ml). Im Vergleich zu Meta-1-mIgG ist bei CD44s-mIgG jedoch schon bei der zu den Rezeptorglobulinen ungefähr gleichen Menge exogener Hyaluronsäure von 1 μ g/ml (Abb. 27, vgl. Meta-1 mit CD44s bei 0,001mg/ml) eine deutliche Bindung an das Tumorgewebe zu beobachten. Das Meta-1-Rezeptorglobulin zeigt erst bei einer exogenen Hyaluronsäurekonzentration von 0,1 μ g/ml eine schwache Bindung. Bei dieser Menge an exogener Hyaluronsäure ist bei CD44s eine starke Bindung an das Tumormaterial zu beobachten (Abb. 27, vgl. Meta-1 mit CD44s bei 0,0001mg/ml).

Möglicherweise besitzt CD44v-mIgG eine stärkere Affinität zu Hyaluronsäure, da im Vergleich zu der CD44s-mIgG Isoform eine geringere Menge exogener Hyaluronsäure ausreicht um die Bindung von CD44v-mIgG an Tumorgewebe zu kompetitieren (Abb. 27, vgl. Meta-1 mit

CD44s). Allerdings ist eine quantitative Auswertung mit dieser Technik nur schwer möglich, da z.B. in Betracht gezogen werden muß, daß die Hyaluronsäure-Konzentration der einzelnen Gefrierschnitte bzw. die Konzentration der Rezeptorglobuline variieren können.

Abschließend kann festgehalten werden, daß die CD44-Rezeptorglobuline (CD44s-mIgG und Meta-1-mIgG) eine starke Affinität zu Hyaluronsäure der ECM besitzen. Während auf Normalgewebe der Ratte eine Bindung dieser löslichen CD44-Formen lediglich mit ECM-Strukturen des Darmepithels (hauptsächlich von CD44s-mIgG) festgestellt wurde, konnte eine starke Bindung dieser Fusionsproteine an ECM-Strukturen von Tumorschnitten beobachtet werden. Die Bindung beider Rezeptorglobuline erfolgt an Tumor-assoziierte Hyaluronsäure und kann durch Hyaluronidase-Behandlung des Gewebes bzw. durch exogene Hyaluronsäure (nicht durch andere Komponenten der ECM) blockiert werden. Möglicherweise besitzt Meta-1 höhere Affinität für Hyaluronsäure, da diese CD44v-Isoform mit einer geringeren Konzentration von exogener Hyaluronsäure kompetitiert werden kann. Außer Hyaluronsäure konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein anderer Ligand für Meta-1 nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Unter der Bezeichnung CD44 wird eine Familie von Membranrezeptoren zusammengefaßt, die wichtige Funktionen bei verschiedenen physiologischen Prozessen, unter anderem der T-Zellaktivierung, dem "lymphocyte homing" und der Tumormetastasierung, ausüben (zur Übersicht: Herrlich et al., 1993). Diese Proteinfamilie besteht zum einen aus einer CD44-Grundform (CD44s) und aus einer Reihe von Varianten, die zusätzlich zur As-Sequenz von CD44s Insertionen unterschiedlicher Länge besitzen (CD44v). CD44v-Proteine resultieren aus alternativ gespleißten mRNAs eines CD44-Primärtranskripts. Die metastasierende Zelllinie BSp73ASML exprimiert vier CD44v-Proteine auf ihrer Zelloberfläche. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß neben der CD44v-Spleißform Meta-1 noch eine weitere, kleinere CD44v-Isoform - Meta-2 - von BSp73ASML-Zellen exprimiert wird. Dieses Protein ist, ebenso wie Meta-1, in der Lage Metastasierungsfähigkeit auf nichtmetastasierende Tumorzellen zu übertragen.

Glykosylierung der CD44v-Proteine

Mit Hilfe verschiedener Methoden (Glykosidase- und Tunicamycin-Behandlung, Bindung von Lektinen) konnten N- und O-glykosidisch an die BSp73ASML-spezifischen CD44v-Isoformen gebundene Oligosaccharide nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde eine starke Modifikation mit Neuraminsäure (Sialisierung) festgestellt.

Auffällig bei diesen Experimenten ist, daß alle CD44v-Isoformen der BSp73ASML-Zellen zu ungefähr gleichem Anteil glykosyliert sind. Bei Meta-1 und Meta-2 ist der Quotient aus dem Mw von modifiziertem zu unmodifiziertem Protein (m./u.-Quotient), berechnet aus dem Laufverhalten in der SDS-Elektrophorese, nahezu identisch (Meta-1: 1,71; Meta-2: 1,74). Im Vergleich dazu beträgt der m./u.-Quotient bei der CD44s-Isoform der Ratte lediglich 1,26; CD44s ist demnach deutlich schwächer glykosyliert als die CD44v-Isoformen Meta-1 und Meta-2. Da die cDNAs der beiden hochmolekularen Formen der BSp73ASML-Zellen noch nicht identifiziert werden konnten, können für diese Moleküle solche Berechnungen nicht durchgeführt werden. Glykosidase- und Tunicamycin-Behandlung dieser 180 bzw. 195 kD Isoformen resultieren jedoch in einer mit Meta-1 und Meta-2 vergleichbaren Verschiebung im Molekulargewicht bei der SDS-Elektrophorese. Demzufolge findet die Glykosylierung der CD44v-Proteine hauptsächlich im gemeinsamen CD44s-spezifischen Anteil dieser Moleküle statt. Zusätzlich im varianten Anteil enthaltene, potentielle Glykosylierungsstellen (Meta-1 hat

im Vergleich zu Meta-2 drei zusätzliche Stellen für O- und zwei zusätzliche Stellen für N-Glykosylierung) werden offensichtlich nicht oder nur in einem geringen Ausmaß genutzt.

Während der malignen Transformation von Tumorzellen wird häufig eine verstärkte Glykosylierung von Glykoproteinen beobachtet (zur Übersicht: Hakomori, 1984). In einem Fall konnte bei einer murinen Tumorzelllinie ein Zusammenhang zwischen verstärkter Glykosylierung eines Membranproteins in Verbindung mit höherem Verzweigungsgrad der Oligosaccharide und verstärkter Metastasierungsfähigkeit der exprimierenden Tumorzellen festgestellt werden (Dennis et al., 1987; Yagel et al., 1990). Dabei wurde auch gezeigt, daß dieses, bisher nicht näher charakterisierte, 130 kD Membranglykoprotein, über seinen Kohlenhydratanteil die Adhäsion an Komponenten der Basalmembran vermittelt, bevor diese während des Metastasierungsprozesses proteolytisch degradiert wird (Yagel et al., 1990).

Die stärkere Glykosylierung der BSp73ASML-spezifischen CD44v-Proteine im Vergleich zu CD44s ist möglicherweise ebenfalls auf einen höheren Verzweigungsgrad der hauptsächlich über Asparagin gebundenen (N-glykosidisch) Oligosaccharid-Seitenketten zurückzuführen. Den zusätzlich entstandenen "Oligosaccharid-Antennenstrukturen" der CD44v-Proteine könnten wichtige funktionelle Eigenschaften während des Metastasierungsprozesses zukommen. Es wäre denkbar, daß die beobachtete Arretierung der über den Lymphstrom metastasierenden, CD44v-positiven Tumorzellen im ersten ableitenden Lymphknoten durch einen, für die zusätzlichen Oligosaccharid-Strukturen der CD44v-Proteine spezifischen, Lektinartigen Liganden zustande kommt. Ein Beispiel für eine vergleichbare Interaktion stellt die L-Selektin-abhängige Adhäsion von Lymphozyten an das HEV-gebundene Kohlenhydrat Sialyl-Lewis-X während der Lymphozyten-Rezirkulation dar (Geoffroy und Rosen, 1989; True et al., 1990; Imai et al., 1991).

Aussagen wie sie oben für das murine 130 kD-Protein gemacht worden sind, können für die zusätzlichen Oligosaccharidstrukturen der BSp73ASML-spezifischen Proteine nicht getroffen werden. Die Funktion dieser Modifikationen ist bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt.

Eine kausale Rolle während der Metastasierung wird auch dem einzigen geladenen Monosaccharid in Glykokonjugaten, der negativ geladenen Neuraminsäure, zugeschrieben (zur Übersicht: Schauer, 1985). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde beobachtet, daß verstärkte Zelloberflächen-Sialisierung bzw. die Modifikation bestimmter Membranproteine mit Neuraminsäure oftmals mit erhöhter Aggressivität von Tumoren korreliert (Yogeeswaran und Salk, 1981; Dennis et al., 1982). Ein Beispiel hierfür stellen kleinzellige Lungenkarzinome dar auf denen die "embryonale Form" des Adhäsionsmoleküls N-CAM ("neural cell adhesion molecule") nachgewiesen wurde. Diese Form von N-CAM enthält einen hohen Anteil der ungewöhnlich gebundenen $\alpha(2-8)$ -Polysialinsäure (Rougon et al., 1982; Sadoul et al., 1983; Rutishauser et al., 1988). Die Anwesenheit dieser N-CAM Isoform korreliert mit einer

schlechten Prognose der Patienten (Moolenaar et al., 1990). Außerdem konnte von Dennis und Mitarbeitern bewiesen werden, daß die stark metastasierende Variante eines Maustumors dreibis viermal mehr Neuraminsäure auf ihrer Zelloberfläche aufweist als die gutartige Form dieses Tumors (Dennis et al., 1982). Als Mechanismus für das hohe Metastasierungspotential von Tumorzellen, die stark mit Neuraminsäure modifiziert sind, wird z.B. eine geänderte Adhäsion an Komponenten der ECM (Dennis et al., 1982) sowie der Schutz vor dem Immunsystem des Wirts diskutiert (zur Übersicht: Schauer, 1985).

Auf den 1.1ASML-spezifischen CD44v-Proteinen von BSp73ASML-Zellen sowie von Meta-1- und Meta-2-Transfektanten konnte durch Neuraminidase-Behandlung und spezifische Bindung des Lektins MAA Neuraminsäure in $\alpha(2-3)$ -Stellung nachgewiesen werden. Der Einfluß von Neuraminsäure auf das Metastasierungspotential dieser Zellen ist allerdings schwer abzuschätzen. Nicht mehr als ein schwacher Hinweis in diese Richtung ist damit auch die Beobachtung, daß beim CD44s-Rezeptor von BSp73AS-Zellen, die nicht in der Lage sind Metastasierungsfähigkeit zu vermitteln, Neuraminsäure nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Möglichkeit um den Einfluß von Neuraminsäure bei der Metastasierung der CD44v-positiven Zellen BSp73ASML- bzw. von Meta-1- und Meta-2-Transfektanten zu untersuchen wäre z.B. die Selektion von Klonen, die die Fähigkeit CD44v-Proteine zu sialisieren verloren haben ($\alpha 2-3$ -Sialyltransferase-Mutanten) und die Metastasierungsfähigkeit dieser Zellen mit der des Wildtyps zu vergleichen.

CD44 und Tumorentstehung

Eine mögliche Beteiligung von CD44-Isoformen an Tumorentstehung und -progression wurde von Sy und ihren Mitarbeitern untersucht (Sy et al., 1991 und 1992). Durch Transfektion einer CD44s-cDNA in eine CD44-negative Burkitt-Lymphomzelllinie konnte die Tumorigenität dieser Zelllinie bei subkutaner Injektion in Nacktmäuse deutlich erhöht werden. Nach intravenöser Injektion der Transfektanten konnte eine im Vergleich zur Ausgangszelllinie erhöhte Metastasierungsrate in Knochenmark, Darm und Nieren festgestellt werden. Möglicherweise vermittelt CD44 in diesem System eine Tumor-promovierende Wirkung. Die essentielle Funktion von CD44s bei dieser "experimentellen Metastasierung", d.h. Metastasierung nach intravenöser Injektion der Tumorzellen, wurde auch durch Blockierungsexperimente bestätigt (Sy et al., 1992). Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung wurden verhindert, wenn man die Transfektanten zusammen mit einem CD44s-Rezeptorglobulin injizierte, offensichtlich durch Blockierung (Kompetition) einer wichtigen Funktion des CD44s-Proteins.

Im Gegensatz zu CD44s scheint eine aus einer humanen Kolonkarzinomzelllinie isolierte CD44v-Isoform (CD44E), mit 135 zusätzlichen, von den Exons v8-v10 kodierten As, im gleichen Versuchssystem eine Tumor-supprimierende Wirkung zu vermitteln (Stamenkovic et

al., 1991; Sy et al., 1991): Sowohl Tumorwachstum als auch Metastasierungsfähigkeit waren im Vergleich zu CD44s-Transfektanten und der Ausgangszelllinie reduziert (Sy et al., 1991).

Nach intravenöser Injektion in Nacktmäuse ist die Expression von CD44s offensichtlich ausreichend, um die Metastasierungsfähigkeit dieser Tumorzellen zu erhöhen, während dies nach subkutaner Injektion nicht der Fall ist. Bei der intravenösen Injektion von Tumorzellen werden allerdings einige Schritte des Metastasierungsprozesses wie z.B., die Ablösung vom Primärtumor, Degradation der Basalmembran, Passage der ECM, Transport im lymphatischen System umgangen. Möglicherweise spielt die Expression von CD44s erst in einer späteren Phase der Metastasierung, nach Übertritt der Tumorzellen ins Blutgefäßsystem, eine Rolle. Es ist denkbar, daß CD44s eine Adhäsion der Tumorzellen an gewebespezifisch exprimierte Rezeptoren des Kapillarendothels (Nicolson, 1982 und 1988; Pauli und Lee, 1988) vermittelt und somit die Extravasation der Tumorzellen an diesen Stellen veranlaßt.

Die Tatsache, daß CD44E-Transfektanten nach intravenöser Injektion nicht in der Lage sind zu metastasieren, könnte auf der Inaktivierung einer Funktion des CD44s-Proteins durch die Insertion der zusätzlichen As beruhen. Es wäre ebenfalls denkbar, daß die CD44E-Isoform alleine nicht ausreicht, jedoch zusammen mit dem CD44s-Protein in der Lage ist Metastasierungsfähigkeit auf nichtmetastasierende Rezipientenzellen zu vermitteln.

Im Gegensatz zu den beschriebenen CD44E-transfizierten Burkitt-Lymphom-Zellen wird in BSp73AS-Meta-1- und -Meta-2-Transfektanten neben der jeweiligen CD44v-Isoform immer auch CD44s synthetisiert. Möglicherweise kommt es während der Metastasierung zu einer Kooperation von CD44s- und CD44v-Proteinen. Eine solche Heterodimerisierung, die z.B. für viele Adhäsionsmoleküle des Immunsystems nachgewiesen werden konnte (zur Übersicht: Springer, 1990), könnte, evtl. nach Bindung eines Liganden, zu einem "aktivierten Komplex" führen über den externe Signale ins Zellinnere übermittelt werden. Durch eine solche Signaltransduktion könnte die Proliferation der Tumorzellen bzw. andere für die Metastasierung wichtige Funktionen induziert werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten jedoch keine Heterodimere aus CD44v-Isoformen und dem CD44s-Protein nachgewiesen werden.

Expression der CD44v-Isoform CD44E, die zusätzlich zur CD44s-Sequenz die Exons v8-v10 enthält, in CD44s-negativen Burkitt-Lymphomzellen führt im Nacktmaussystem nicht zu gesteigerter Tumorigenität und nicht zu gesteigertem Metastasierungspotential. Die bei der Ratte Metastasierungsfähigkeit-vermittelnden CD44v-Isoformen Meta-1 und Meta-2 enthalten beide die Exons v6 und v7. Dies impliziert, daß die Expression dieser beiden Exons ursächlich mit der Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen korreliert. Allerdings wurde die Funktion von Transfektanten, die nur die Exons v6 und v7 exprimieren, bis jetzt noch nicht im Nacktmaus-System untersucht. Da nach Transfektion von Meta-1 in nichtmetastasierende Zellen im Nacktmaus-System ein ähnliches Metastasierungsmuster gefunden wurde wie nach Injektion

dieser Zellen in syngene Ratten, kann jedoch spekuliert werden, daß die Isoform Meta-2 auch dort in der Lage ist Metastasierungsfähigkeit zu vermitteln.

CD44v-Isoformen

Die CD44v-Isoformen Meta-1 und Meta-2 der metastasierenden Zelllinie BSp73ASML sind beide in der Lage Metastasierungsfähigkeit in nichtmetastasierenden Rezipientenzellen zu induzieren. Dabei besitzt Meta-1, verglichen mit dem CD44s-Protein, 162 zusätzliche As im extrazellulären Anteil, die von den Exons v4-v7 kodiert werden (Günthert et al., 1991). Meta-2 dagegen enthält nur die von den Exons v6 und v7 kodierten 85 C-terminalen As von Meta-1 und stellt somit die kleinste nachweisbare CD44v-Isoform der BSp73ASML-Zellen dar (Rudy et al., 1993). Offensichtlich reichen die 85 zusätzlichen As von Meta-1 und Meta-2 in der Grundstruktur des CD44s-Moleküls aus um lokal wachsenden Tumorzellen Invasivität zu vermitteln.

Möglicherweise ist die gleichzeitige Expression mehrerer CD44v-Isoformen bei BSp73ASML-Zellen die Konsequenz einer Fehlregulation des Spleißens eines CD44-Primärtranskripts. Dafür spricht, daß unter physiologischen Bedingungen in normalem Gewebe z.B. in der Haut, Prostata, Lunge sowie in aktivierten Lymphozyten nur eine dominante, v6-spezifische CD44v-Isoform exprimiert wird (Ausnahme: Unterkieferspeicheldrüse).

Ursächlich am Spleißen beteiligt sind Protein-RNA-Komplexe, sog. Spleißosomen (Forbes et al., 1984; Somasekhar und Mertz, 1985; Smith et al., 1989). Deren Zusammensetzung könnte bei der Fehlregulation des Spleißens eines CD44-Primärtranskripts eine Rolle spielen. Sehr wahrscheinlich sind bestimmte Komponenten im Spleißosom verantwortlich für die spezifische Auswahl bestimmter Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen in einem Primärtranskript mit mehreren Exons und Introns wie dies z.B. bei CD44, aber z.B. auch bei den Membranproteinen N-CAM und CEA der Fall ist (Cunningham et al., 1987; Barnett et al., 1989; Screatton et al., 1992; Tölg et al., 1993). Eine Veränderung eines solchen Faktors könnte bewirken, daß die Spezifität verlorenght und Spleißdonor und -akzeptorstellen inkorrekt kombiniert werden. Eine solche Veränderung könnte während der Transformation von Zellen, evtl. durch eine Mutation im Gen des Spezifität vermittelnden Spleißfaktors, erfolgen.

Nach allogener Stimulation *in vivo* (mit abgetöteten Lymphozyten eines anderen Rattenstammes) konnte aus Lymphknoten von Ratten eine Lymphozyten-Population isoliert werden, die nur das Exon v6 im Hintergrund der CD44s-Sequenz exprimiert (Arch et al., 1992). Es wurde gezeigt, daß die 43 von Exon v6 kodierten As dabei die Proliferation von Lymphozyten nach Antigenkontakt vermitteln (Arch et al., 1992). Offensichtlich ist die Expression dieser 43 As entscheidend um biologische Aktivität zu vermitteln. Ob die

Expression von Exon v6 alleine ausreichend ist um Metastasierungsfähigkeit in nichtmetastasierenden, CD44v-negativen BSp73AS-Zellen zu induzieren, muß allerdings noch experimentell untersucht werden.

Aktivierte Lymphozyten stellen nicht die einzige Zellpopulation dar, die v6-spezifische CD44v-Isoformen unter physiologischen Bedingungen exprimieren (Wirth et al., 1993). Exon v6 wird auf Zellen einiger Drüsen und auf einer Reihe von Zelltypen, möglicherweise im Kontext mit anderen CD44v-spezifischen Exons, exprimiert, die während ihrer normalen Differenzierung an Migrationsprozessen teilnehmen. Im Gegensatz zu Tumorzellen ist bei diesen nichttransformierten Zellen die Expression von CD44v strikt reguliert. So konnte z.B. auf aktivierten Lymphozyten schon kurz nach allogener Stimulation ein Anstieg der CD44v-Expression festgestellt werden, die allerdings transient verlief und nach wenigen Tagen auf das Ausgangsniveau abfiel. Im Gegensatz dazu wird bei BSp73ASML-Zellen und CD44v-Transfektanten CD44v konstitutiv exprimiert. Dies führt möglicherweise zur Aktivierung von Mechanismen, die die Proliferation induzieren und das Metastasierungspotential dieser Zellen erhöhen.

Mechanismen der Metastasierung von v6-positiven Zellen

Der Mechanismus der Metastasierung von Tumorzellen die v6-positive CD44v-Isoformen exprimieren (z.B. BSp73ASML-Zellen sowie Meta-1- und Meta-2-Transfektanten) ist ebenso wie die Funktion der zusätzlich in die CD44-Grundstruktur inserierten As bei diesem Prozeß noch ungeklärt.

Bei *in vivo*-Experimenten nach subkutaner Injektion dieser CD44v-positiven Tumorzellen wurde beobachtet, daß die Zellen zunächst im ersten ableitenden Lymphknoten nachgewiesen werden können (Seiter et al., 1993). Die Tumorzellen werden dort festgehalten und beginnen dann mit der Proliferation, was z.B. durch eine starke Vergrößerung des Lymphknotens deutlich wird. Nachfolgend können metastasierende Tumorzellen in weiter proximal gelegenen Lymphknoten und später, nach Übertritt ins Blutgefäßsystem, auch in der Lunge identifiziert werden.

Die Metastasierung der Transfektanten kann durch Injektion des v6-spezifischen mAks 1.1ASML vollständig blockiert werden (Seiter et al., 1993). Dabei muß der Antikörper appliziert werden bevor Metastasen im ersten ableitenden Lymphknoten nachweisbar sind. In einer späteren Phase kann die Metastasierung der Tumorzellen nicht mehr gehemmt werden. Offensichtlich blockiert der Antikörper eine von CD44v vermittelte Funktion während der frühen Phase der Metastasierung. Da gezeigt werden konnte, daß der mAks 1.1ASML keinen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen ausübt und auch keine Immunantwort gegen diese Zellen induziert, könnte die inhibierende Wirkung des Antikörpers in der Blockierung der

Bindung eines Proliferations-induzierenden Liganden an v6 begründet sein (Matzku, 1983; Seiter et al., 1993; zur Übersicht: Herrlich et al., 1993).

Ein weiterer Hinweis auf einen Liganden für CD44v wurde durch Experimente mit aktivierten Lymphozyten gewonnen. Ratten reagieren auf allogene Stimulation mit einer Induktion von 1.1ASML-spezifischen CD44v-Proteinen auf T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. CD44v läßt sich dabei schon auf kleinen "unreifen" Lymphozyten nicht aber auf intrathymischen T-Lymphozyten nachweisen. Demnach muß CD44v bereits in einen frühen Schritt der Lymphozytenaktivierung involviert sein, d.h. in einer Phase, in der diese Zellen die Peripherie (das Blutgefäßsystem) verlassen, in die Lymphknoten einwandern und dort als Antwort auf den Kontakt mit Antigen mit der Zellteilung beginnen (Arch et al., 1992). Durch Koinjektion von 1.1ASML mit dem Stimulans kann die Aktivierung von T-Lymphozyten und von B-Lymphozyten unterdrückt werden, möglicherweise ebenfalls durch Blockierung einer Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung.

Die Parallelen zwischen CD44v-exprimierenden Tumorzellen und Lymphozyten sind eindeutig. Bei beiden Zelltypen kommt es zu einer Translokation von der Peripherie in das lymphatische System, wo dann die Proliferationsphase einsetzt. Möglicherweise benutzen Tumorzellen dabei Eigenschaften, die Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen für die Proliferationsphase nach der Aktivierung durch Antigen benötigen. Eine dieser Eigenschaften könnte die Induktion der Zellproliferation nach Bindung eines Liganden an die (v6-positiven) CD44v-Isoformen dieser Zellen darstellen.

Da die postulierte Wechselwirkung zwischen CD44v und einem potentiellen Liganden möglicherweise im Lymphknoten direkt erfolgt, wurden Lymphknoten aus verschiedenen Körperregionen der Ratte präpariert und auf die Präsenz eines Liganden für CD44v untersucht. Als "Sonden" wurden dabei das lösliche Meta-1-Rezeptorglobulin und eine ebenfalls leicht nachweisbare lösliche Form der "varianten Domäne" des Meta-1-Proteins verwendet. Weder auf Gefrierschnitten noch in Proteinextrakten von Lymphknoten konnte eine spezifische Bindung eines Liganden an CD44v nachgewiesen werden. Offensichtlich ist in Lymphknoten kein CD44v-spezifischer Ligand vorhanden bzw. nachweisbar.

Möglicherweise findet die postulierte Wechselwirkung zwischen dem Liganden und v6-spezifischen CD44v-Molekülen bereits vor dem Eintritt der Tumorzellen in den Lymphknoten statt. Bei dem postulierten Liganden könnte es sich um einen Wachstumsfaktor handeln, der wie z.B. EGF, PDGF und M-CSF (Ushiro und Cohen, 1980; Nishimura et al., 1982; Cochran, 1985; Metcalf, 1985; Sher et al., 1985; Stanley, 1985) in geringer Konzentration (~ng/ml) in der Lymph- bzw. Blutflüssigkeit vorliegt und dort schon zu einer Induktion der CD44v-positiven Zellen führt. Die Lymphknoten wären in diesem Fall nur der Ort, wo die Folge dieser Induktion, die Proliferation der Tumorzellen, sichtbar wird.

Wenn es sich bei dem postulierten CD44v-spezifischen Liganden tatsächlich um einen diffusiblen Faktor handelt, sollte dieser im Rattenserum bzw. der Lymphflüssigkeit nachweisbar sein.

Analog zu den Blockierungsexperimenten mit dem CD44v-spezifischen Antikörper 1.1ASML sollte es möglich sein, mit einem Überschuß des Meta-1-Rezeptorglobulins die Bindung des putativen Liganden an Meta-1-Transfektanten zu kompetitieren und die Metastasierung dieser Zellen somit zu blockieren. Der postulierte Ligand könnte evtl. sogar durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Meta-1-Rezeptorglobulin aus Rattenserum aufgereinigt werden.

Da die Wechselwirkung von Tumorzellen mit Komponenten der ECM einen essentiellen Schritt während der Tumormetastasierung darstellt (zur Übersicht: Starkey, 1990), wäre es auch denkbar, daß die Insertion der zusätzlichen As-Sequenzen von Meta-1 bzw. Meta-2 zu einem geänderten Adhäsionsverhalten der Tumorzellen an Komponenten der ECM führt. Dabei könnte die Bindung an eine Komponente der ECM direkt über die "Extradomäne" erfolgen oder durch einen sterischen Effekt der zusätzlichen Aminosäuren moduliert werden. Tatsächlich konnte bewiesen werden, daß auf Tumorzellen exprimierte Membranrezeptoren für ECM-Komponenten eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielen (zur Übersicht: Liotta et al., 1983; Liotta, 1986). So konnte z.B. durch die Injektion von Peptiden, die die Matrixbinderegion der Membranrezeptoren für Fibronectin, Laminin und Kollagen beinhalten (Hynes, 1987), die Metastasierung einer aggressiven Maus-Melanomzelllinie reduziert werden (Humphries et al., 1986).

Neben den angeführten ECM-Komponenten stellt Hyaluronsäure einen wichtigen strukturellen wie auch funktionellen Bestandteil der ECM dar (zur Übersicht: Iozzo, 1985). Hyaluronsäure ist das größte bekannte Glykosaminoglykan bestehend aus der sich repetitiv wiederholenden Disaccharid-Einheit D-Glukuronsäure/N-Azetyl-D-Glukosamin in β -Konfiguration mit einem Molekulargewicht zwischen 10^2 - und $\sim 8 \times 10^6$ kD (je nach Anzahl der Disaccharid Untereinheiten). Das Polymer ist ubiquitär verbreitet und kann in größeren Mengen z.B. in Knorpel, Bindegewebe und Synovialflüssigkeit gefunden werden, wo es bei der Ausbildung einer "lockeren" und stark hydratisierten Form der ECM eine Rolle spielt. Darüberhinaus konnte in einer ganzen Reihe von Arbeiten gezeigt werden, daß bei der neoplastischen Transformation von Tumorzellen Hyaluronsäure in hoher Konzentration zum einen vom Tumorgewebe selbst, hauptsächlich jedoch vom umliegenden Stroma produziert wird (Knudson et al., 1989).

Die Wechselwirkung zwischen Zellen und Hyaluronsäure der ECM wird von Zelloberflächenproteinen, sogenannten Hyaluronsäure-Rezeptoren vermittelt. Die am besten charakterisierten Hyaluronsäure-bindenden Proteine stellen die "Link-Proteine" dar, die in der

ECM als Bindeglied zwischen Hyaluronsäure und mit dieser im Komplex vorliegenden Proteoglykanen dienen (Deak et al., 1986; Doege et al., 1986; Goetinck et al., 1987). Die Hyaluronsäurebindungsdomäne des "Link-Proteins" aus Knorpelgewebe konnte charakterisiert werden. Sie besteht aus einer charakteristischen repetitiven Anordnung positiv geladener Aminosäuren zwischen acht Cysteinmolekülen. Dadurch kommt es im "Link-Protein" möglicherweise zu einer exponierten Stellung der positiv geladenen Aminosäuren über die Ausbildung von "Loop-Strukturen" durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen (Goetinck et al., 1987). Es konnte bewiesen werden, daß es zu einer ionischen Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Hyaluronsäure und den positiv geladenen Aminosäuren zwischen den "Loop-Strukturen" kommt. CD44 besitzt eine zur Hyaluronsäurebindungsdomäne des Link-Proteins analoge Struktur im extrazellulären, Membran-distalen Anteil, was seine starke Affinität zu Hyaluronsäure erklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der CD44s-Rezeptor der Ratte und die CD44v-Isoform Meta-1 in der Lage sind, an Hyaluronsäure zu binden. Allerdings findet diese Adhäsion hauptsächlich an Hyaluronsäure statt, die mit Tumorgewebe assoziiert ist. Dabei ist auffallend, daß Hyaluronsäure nicht nur zwischen den Tumorzellen, sondern hauptsächlich an der Tumorgrenze und im Tumor-assoziierten Stroma synthetisiert wird.

Eine Erklärung für die Beobachtung, daß in den durchgeführten immunhistochemischen Experimenten die CD44-Rezeptorglobuline CD44s-mIgG und Meta-1-mIgG stärker an Tumor-assoziierte Hyaluronsäure binden als an Hyaluronsäure im Normalgewebe liefert evtl. ein Verhalten, das als Desmoplasie bezeichnet wird (Liotta et al., 1983; McBride und Ward, 1979; Iozzo, 1985). Unter Desmoplasie versteht man, daß Tumoren sich mit einer "abnormalen", oftmals vom Stroma produzierten Hyaluronsäure-reichen ECM umgeben, um so ein optimales Milieu für Tumorstadium zu schaffen, aber auch, den Zugang immunkompetenter Zellen zu verhindern (Mc Bride und Ward, 1979). Die starke Färbung, die beide CD44-Rezeptorglobuline (Meta-1- und CD44s-mIgG) auf Tumorschnitten verursachen, könnte darin begründet sein, daß mit Tumoren assoziierte Hyaluronsäure in einer für die Bindung von CD44 optimalen Form vorliegt. In dieser Hinsicht kritische Parameter stellen die Kettenlänge und die Art der Immobilisation (Assoziation mit anderen ECM-Komponenten im Gewebe) der Hyaluronsäure dar (Forester und Balazs, 1980; Goldberg und Toole, 1984; Green und Underhill, 1988). Möglicherweise liegt Hyaluronsäure im Normalgewebe zu einem höheren Anteil in der freien Form vor. Freie Hyaluronsäure wird, aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit, während der experimentellen Durchführung der Immunhistochemie ausgewaschen und ist damit nicht mehr nachweisbar.

Auch für die starke Akkumulation von Hyaluronsäure an der Tumorgrenze bzw. im Stroma gibt es Erklärungsmöglichkeiten. So konnte z.B. beobachtet werden, daß Tumorzellen die Synthese von Hyaluronsäure induzieren können (Toole et al., 1979; Mc Bride und Ward, 1979; Merrilees und Finlay, 1985; Iozzo und Müller-Glauser, 1985). Als mögliche Induktoren kommen TGF- β , bFGF (Toole et al., 1979) und ein nicht näher charakterisiertes lipophiles, hitzesensitives Membranprotein in Betracht (Knudson et al., 1989). Unter Umständen stellen dabei die Stromazellen an der Tumorfront die erste Zellpopulation dar, die sensitiv für den Induktor ist. Die gerichtete Sekretion von Hyaluronsäure an der Front des Tumors durch das Stroma könnte dabei die Migration der CD44-positiven Zellen durch das Bindegewebe erleichtern und darüberhinaus in eine bestimmte Richtung dirigieren.

Die Affinität von CD44v zu Hyaluronsäure ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. So konnte von einer Arbeitsgruppe festgestellt werden, daß die humane CD44E-Isoform nicht in der Lage ist eine Bindung an Oberflächen-assoziierte Hyaluronsäure von Endothelzellen aus Lymphknoten zu vermitteln. Diese Beobachtung wurde mit der Interferenz der zusätzlichen extrazellulären As-Sequenzen erklärt (Stamenkovic et al., 1991). Im Gegensatz dazu wurden von He und Mitarbeitern vier murine CD44v-Isoformen kloniert, darunter das Maus-Homolog der CD44E-Isoform und eine CD44v-Form mit 293 zusätzlichen extrazellulären As, die in einer Reihe von Experimenten alle Affinität für Hyaluronsäure aufwiesen und darüberhinaus nur geringfügige Bindungsunterschiede im Vergleich zur CD44s-Form zeigten (He et al., 1992). Offensichtlich haben die zusätzlich inserierten As-Sequenzen der CD44v-Formen keinen Einfluß auf die weiter N-terminal gelegene Hyaluronsäure-Bindungsdomäne.

Der Vergleich der Bindung von CD44s und der CD44v-Isoform Meta-1 an Hyaluronsäure bestätigte diese Ergebnisse. Beide Isoformen binden stark an Tumor-assoziierte Hyaluronsäure. In Konkurrenzexperimenten mit exogen zugegebener Hyaluronsäure konnte, im Vergleich zu CD44s sogar eine etwas höhere Affinität der CD44v-Isoform Meta-1 für Hyaluronsäure beobachtet werden. Mit anderen ECM-Komponenten (Chondroitinsulfat, Fibronectin, Kollagen) konnte die Bindung von Meta-1 und CD44s an immobilisierte Hyaluronsäure nicht blockiert werden. Offensichtlich ist die Bindung von Meta-1 und CD44s an Hyaluronsäure spezifisch und eine Wechselwirkung mit anderen ECM-Komponenten findet nicht statt.

Obwohl Hyaluronsäure mit Prozessen wie Zellmigration, Induktion der Zellproliferation und intrazellulärer Proteinphosphorylierung in Verbindung gebracht wird (Elstadt und Hosich, 1987; Turley, 1989; Turley et al., 1991; zur Übersicht: Turley, 1992), die bei der Tumorentstehung und Tumormetastasierung eine Rolle spielen, kann die Wechselwirkung mit Hyaluronsäure nicht den entscheidenden Parameter der CD44v-induzierten Metastasierung darstellen, da sich CD44s und die v6-positive CD44v-Isoform Meta-1 in ihrer Eigenschaft Hyaluronsäure zu binden kaum unterscheiden.

Dies wird z.B. auch durch Experimente bestätigt, bei denen mit dem mAk 1.1ASML die Bindung von radioaktiv markierten Meta-1-Transfektanten an immobilisierte Hyaluronsäure nicht blockiert werden konnte (eigene unpublizierte Beobachtung). Offensichtlich interferiert dieser Antikörper nicht mit der Hyaluronsäure-Bindung von CD44v, d.h. die Blockierung der Metastasierung mit dem mAk 1.1ASML *in vivo* muß durch eine Blockierung anderer Funktionen der v6-positiven CD44v-Isoformen vermittelt werden. Dabei ist, aufgrund der Spezifität des mAks 1.1ASML für v6, die Induktion der Proliferation der CD44v-positiven Tumorzellen bzw. anderer für die Metastasierung wichtiger Funktionen durch einen v6-spezifischen Liganden am wahrscheinlichsten.

Die Identifizierung dieses Liganden sollte entscheidende Informationen über den Mechanismus der Metastasierung CD44v-positiver Tumorzellen liefern. Da eine Expression von CD44v sehr wahrscheinlich auch bei der Metastasierung humaner Tumorzellen eine Rolle spielt (Matsumura und Tarin, 1992; Heider et al., 1993), stellt die Identifizierung dieses Liganden auch in therapeutischer Hinsicht ein vorrangiges Ziel dar.

Literaturverzeichnis

- Allison, J. P., Mc Intyre, W. und Bloch, D. (1982). Tumor specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J. Immunol.* 129: 2293-3000.
- Anderson, N. D., Anderson, A. O. und Wyllie, R. G. (1976). Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology* 31: 455-473.
- Annweiler, A., Hipskind, R. A. und Wirth, T. (1991). A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit β -globin leader sequence. *Nucl. Acids Res.* 19: 3750.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. und Zöller, M. (1992). Participation in normal immune response of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *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.
- Barnett, T. R., Kretschmer, A., Austen, D. A., Goebel, S. J., Hart, J. T., Elting, J. J. und Kamarck, M. E. (1989). Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J. Cell Biol.* 108: 267-276.
- Bazil, H. und Horejsi, V. (1992). Shedding of the CD44 adhesion molecule from Leucocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. *J. Immunol.* 149: 747-753.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K. und Stanners, C. P. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57: 317-319.
- Berridge, M. (1985). The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am.* 253(4): 142-152.
- Birnboim, P. M und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bownds, M. D. (1981). Molecular mechanism of visual transduction. *Trends Neurosci.* 4: 214-217.
- Boylan, J. F., Jackson, J., Steiner, M. R., Shih, T. Y., Duigon, G. J., Roszman, T., Fisher, P. B. und Zimmer, S. G. (1990). Role of the Ha-ras (Ras^H) oncogene in mediating progression of the tumor cell phenotype. *Anticancer Res.* 10: 717-724.

- Bretscher, M. S. und Raff, M. C. (1975).** Mammalian plasma membranes. *Nature* 258: 43-49.
- 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 glycoprotein with additional exons. *J. Cell. Biol.* 113: 207-221.
- Brüggemann, M., Delmastro-Galfre, P., Waldmann, H. und Calabi, F. (1988).** Sequence of a rat immunoglobulin gamma-2c heavy chain constant region cDNA: Extensive homology to mouse gamma-3. *Eur. J. Immunol.* 18: 317-319.
- Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H. und Goeddel, D. V. (1983).** Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302: 33-37.
- Capon, D. J., Chamow, S. M., Mordenti, J., Marsters, S. A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R. A., Lucas, C., Wurm, F. M., Groopman, J. E., Broder, S. und Smith, D. H. (1989).** Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337: 525-531.
- 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.
- Cleveland, D.W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. und Laemmli, U. K. (1977).** Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl-sulfate and analysis by gel electrofocussing. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.
- Cochran, B. H., Reffel, A. C. und Stiles, C. D. (1983).** Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived-growth-factor. *Cell* 33: 939-947.
- Cochran, B. (1985).** The molecular action of platelet derived growth factor. *Adv. Cancer. Res.* 45: 183-216.
- Collett, M. S. und Erikson R. C. (1978).** Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2021-2024.
- Culty, M., Miyake, K., Kincade, P. W., Silorski, E., Butcher, E. C. und Underhill, C. (1990).** The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111: 2765-2774.
- Culty, M., Nguyen, H. A. und Underhill, C. B. (1992).** The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell. Biol.* 116: 1055-1062.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A. Prediger, E. A., Brackenburry, A. und Edelman, G. M. (1987).** Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 236: 799-806.

- Deak, F., Kiss, J., Sparks, K. J., Argraves, W. S., Hampikian, G. und Goetinck, P. F. (1986).** Complete amino acid sequence of chicken cartilage link protein deduced from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3766-3770.
- Denning, S. M., Le, P. T., Singer, K. H., und Haynes, B. F. (1990).** Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T-Cell activation. *J. Immunol.* 144: 7-15.
- Dennis, J., Waler, C., Timpl, R. und Schirrmacher, V. (1982).** Surface sialic acid reduces attachment of metastatic tumor cells to collagen type IV and fibronectin. *Nature* 300: 274-276.
- Dennis, J. W., Laferté, S., Waghorne, C., Breimann, M. L. und Kerbel, R. S. (1987).** β -(1-6) branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236: 582-586.
- Doege, K., Hassel, J. R., Caterson, B. und Yamada, Y. (1986).** Link protein cDNA sequence reveals a tandemly repeated protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3761-3765.
- 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 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 174: 1-5.
- Duijvestijn, A. und Hamann, A. (1989).** Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. *Immunol. Today* 10: 23-29.
- Edelman, G. M. (1985).** Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 135-169.
- Elbein, A. D. (1981).** The tunicamycins - useful tools for studies on glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 8: 219-221.
- Elk, B., Westermark, B., Wasteson, A. und Heldin C. H. (1982).** Stimulation of tyrosine specific phosphorylation by platelet derived growth factor. *Nature* 295: 419-420.
- Elstad, C. A. und Hosich, H. L. (1987).** Contribution of the extracellular matrix to growth properties of cells from a preneoplastic outgrowth: possible role of hyaluronic acid. *Exp. Cell Biol.* 55: 313-321.
- Finean, J. R. Coleman, R. und Mitchell, R. H. (1978).** Membranes and their cellular functions. 2nd ed., Blackwell, London, pp 42-67.
- Flanagan, B. F., Dalchau, R., Allen, A. K., Daar, A. S., Fabre, J. W. (1989).** Chemical composition and tissue distribution of the human CDw44 glycoprotein. *Immunology* 67: 167-175.
- Forbes, D. J., Kirschner, M. W., Caput, D., Dahlberg, J. E. und Lund, E. (1984).** Differential expression of multiple U1 small nuclear RNAs in oocytes and embryos of *Xenopus laevis*. *Cell* 38: 681-689.

- Forrester, J. V. und Balazs, E. A. (1980). Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 40: 435-446.
- Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hosegawa, A., Asa, D. und Brandley, B. K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the Sialyl Lewis^x oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117: 895-902.
- Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P. J., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Naofumi, S., Fukushi, Y., Nudelman, E. und Hakomori, S. (1984). Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor associated antigen. *Cancer Res.* 44: 5279-5285.
- Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St. John, T., Butcher, E. C. und Carter, W. G. (1989). Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4654-4658.
- Geoffroy, J. S. und Rosen, S. D. (1989). Demonstration that a lectin-like receptor (gp90^{MEL}) directly mediates adhesion of lymphocytes to high endothelial venules of lymph nodes. *J. Cell Biol.* 109: 2463-2469.
- Goding, J. W. (1980). Structural studies of murine lymphocyte surface IgD. *J. Immunol.* 124: 2082-2088.
- Goetinck, P. F., Stirpe, N. S., Tsonis, P. A. und Carlone, D. (1987). The tandemly repeated sequences of cartilage link protein contains the sites for interaction with hyaluronic acid. *J. Cell Biol.* 105: 2403-2408.
- Goldberg, R. L. und Toole, B. P. (1984). Pericellular coat of chick embryo chondrocytes: structural role of hyaluronate. *J. Cell Biol.* 99: 2114.
- 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.
- Gomperts, D. (1976). *The plasma membrane: Models for its structure and function.* Academic Press, New York.
- Gowans, J. L. und Knight, E. J. (1964). The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. roy. Soc. B.* 159: 257-282.
- Graham, F. L., und van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
- Green, S. J. und Underhill, C. B. (1988). Hyaluronate appears to be covalently linked to the cell surface. *J. Cell Physiol.* 134: 376-386.

- Greig, R. G., Koestler, T. P., Trainer, T. L., Corwin, S. D., Miles, L., Kline, T., Sweet, R., Yokoyama, S. und Poste, G. (1985). Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH/3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3698-3701.
- Gruber, M. F., Webb, D. S. A. und Gerrard, T. L. (1992). Stimulation of human monocytes via CD45, CD44, and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. *J. Immunol.* 148: 1113-1118.
- 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.
- Hakomori, S. (1984). Tumor associated carbohydrate antigens. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 103-126.
- Hallman, R., Jutila, M. A., Smith, W., Anderson, D. C., Kishimoto, T. K. und Butcher, E. C. (1991). The peripheral lymph node homing receptor LECAM-1 is involved in CD18 adhesion of human neutrophils to endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 236-243.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishimura, K. und Kincade, P.W. (1992). Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J. Cell Biol.* 119: 1711-1719.
- Heider, K-H., Hofmann, M., Horst, E., Van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. (1993). A human homologue of the rat associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinoma and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233.
- Herrlich, P., Rudy, W., Hofmann, M., Arch, R., Zöller, M., Zawadzki, V., Tölg, C., Hekele, A., Pals, S., Heider, K-H., Sleeman, J. und Ponta, H. (1993). CD44 and splice variants of CD44 in normal differentiation and tumor progression. In: D. M. Livingston, M. Hemler und E. Mihich (eds.). *Cell Adhesion molecules*. Rome: Edigraf.
- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500-544.
- Hofmann, M. (1991). Metastasenspezifisch exprimierte Varianten des Glykoproteins CD44: Schlüssel zum molekularen Verständnis des Metastasierungsprozesses. Dissertation, Universität Tübingen.

- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P., 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 to low-level expression of metastasis specific variants of CD44 in CREB cells. (1993) *Cancer Res.*, im Druck.
- Honjo, T., Obata, M., Yamawaki-Kataoka, Y., Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N. und Mano, Y. (1979).** Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin G1 chain gene. *Cell* 18: 559-568.
- Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, M. und Bernard, A. (1988).** CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.* 143: 798-801.
- Humphries, M. J., Olden, K. und Yamada, K. M. (1986).** A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467-469.
- Hynes, R. O. (1987).** Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554.
- 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. USA* 86: 4659-4663.
- Imai, Y., Singer, M., Fennie, C., Lasky, L.A. und Rosen, S.D. (1991).** Identification of a carbohydrate based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J. Cell. Biol.* 113: 1213-1221.
- Iozzo, R. V. (1985).** Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. *Lab. Invest.* 53: 373-396.
- Iozzo, R. V. und Müller-Glauser, W. (1985).** Neoplastic modulation of extracellular matrix: proteoglycan changes in the rabbit mesentery induced by V2 carcinoma cells. *Cancer Res.* 45: 5677-5687.
- Jalkanen, S., Bargatze, R. F., Herron, L.R. und Butcher, E. C. (1986).** A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.* 16: 1195-1202
- 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. und Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* 116: 817-825.
- Kieran, M. W., Blank, V., Le Bail, O. und Israel, A. (1989). Lymphocyte homing. *Res. Immunol.* 140: 399-450.
- Klein, I., Juretic, A., Constantin, N. B. und Zagy, Z. A. (1981). The traditional and a new version of the mouse H-2 complex. *Nature* 291: 455-460.
- Knudson, W., Biswas, C., Li, X-Q., Nemecek, R. E. und Toole B. P. (1989). The role and regulation of tumor associated hyaluronan. In: Evered, D., Whelan, J. (eds.) *Biology of Hyaluronan*. Wiley and Sons, Chichester, Ciba Foundation Symposium 143: 150-169.
- Köhler, G. und Milstein C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawrence, M. B. und Springer, T. A. (1991). Leucocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873
- Lesley, J., Schulte, R. und Hyman, R. (1990). Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp. Cell Res.* 187: 224-233.
- Lesley, J., He, Q., Miyake, K., Hamann, A., Hyman, R. und Kincade, P. W. (1992). Requirement for hyaluronic acid binding by CD44: A role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J. Exp. Med.* 175: 257-266.
- Liotta, L. A., Rao, C. N. und Barsky, S. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49: 636-649
- Liotta, L. A. (1986). Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 46: 1-7
- Luscinskas, F. W., Brock, A. F., Arnaout, M. A. und Gimbone jr. M. A. (1989). Endothelial-leucocyte adhesion molecule-1 dependent and leucocyte (CD11/CD18)-dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leucocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium. *J. Immunol.* 142: 2257-2263
- Marshall, C. I. (1991). How does p21^{ras} transform cells ? *Trends Genet.* 7: 91-95.
- Matsumura, Y. und Tarin D. (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340: 1053-1058.

- Matzku, S. (1983).** The role of non-adaptive immunity in spontaneous lymphatic metastasis. Habilitationsschrift, Universität Karlsruhe.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildenerger, M., und Zöller, M. (1983).** Characterization of Bsp73, a spontaneous rat tumor and its *in vivo* selected variants showing different metastasizing capacities. *Inv. Met.* 3: 109-123.
- Matzku, S., Wenzel, A., Liu, S. und Zöller, M. (1989).** Antigenic differences between metastatic and non-metastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 49. 1294-1299.
- McBride, W. H. und Ward, J. B. L. (1979).** hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 149: 507
- McGrath, J. P., Capon, D., Goeddel, D. V., Levinson, A. D. (1984).** Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature.* 310: 644-649.
- Merrilees, M. J. und Finlay, G. J. (1985).** Human tumor cells in culture stimulate glycosaminoglycan synthesis by human skin fibroblasts. *Lab. Invest.* 53: 30-46
- Metcalf, D. (1985).** The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science* 229: 16-22.
- Meuer, S. C., Auto, O., Hercend, T., Schlossman, S. F. und Reinherz E. L. (1984).** The human T-Cell-Receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 23-50.
- Milstein, C. (1980).** Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4): 66-74.
- 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.
- Moolenaar, C. E. C. K., Muller, E. J., Schol, D. J., Figdor, C. G., Bock, E., Bitter-Suermann, D. und Michalides, R. J. A. M. (1990).** Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. *Cancer Res.* 50: 1102-1106.
- Neri, A., Ruoslahti, E., und Nicolson, G. L. (1981).** The distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing *in vitro* and *in vivo* at primary and metastatic sites. *Cancer Res.* 41: 5082-5095.
- Neri, A. und Nicolson; G. L. (1981).** Phenotypic drift of metastatic and cell-surface properties of mammary adenocarcinoma cell clones during growth *in vitro*. *Int. J. Cancer* 28: 731-738.
- Neri, A., Welch, D., Kawaguchi, T. und Nicolson G. L. (1982).** Development and biological properties of malignant cell sublines and clones of spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 507-517.

- Nicolson, G. L. (1982).** Cancer metastasis: organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 695: 113-176.
- Nicolson, G. L. (1988).** Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer and Met. Rev.* 7: 143-188.
- Nishimura, J., Huang, J. S. und Deuel, T. F. (1982).** Platelet-derived growth factor stimulates tyrosine-specific protein kinase activity in swiss mouse 3T3 cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4303-4307.
- North, S.M. und Nicolson, G.L. (1985).** Effect of host immune status on the spontaneous metastasis of cloned cell lines of the 13762NF rat mammary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 52: 747-755.
- 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. USA* 86: 8521-8525.
- O'Farrell, P.H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Pastan, J. H. und Willingham M. C. (1981).** Receptor mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Annu. Rev. Physiol.* 43: 239-250.
- Pauli, B. U. und Lee, C-L. (1988).** Organ preference of metastasis: the role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab. Invest.* 58: 379-387.
- Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S. und Paulson J. C. (1990).** ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le^x. *Science* 250: 1130-1132.
- Pierres, A., Lipecky, C., Mawas, C., Olive, D. (1992).** A unique CD44 monoclonal antibody identifies a new T-cell activation pathway. *Eur. J. Immunol.* 22: 413-417.
- Poste, G und Fidler, I. J. (1980).** The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283 139 - 146
- Reber, S., Matzku, S., Günthert, U., Ponta, H., Herrlich, P. und Zöller, M. (1990).** Metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 46: 919-927.
- Reddy, E. R., Reynolds, R. K., Santos, E. und Barbacid, M. (1982).** A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300: 149-152.
- Rothman, B. L., Blue, M. L., Kelly, K. A., Wunderlich, D., Mirez, D. V., Aune, T. M. (1991).** Human T cell activation by OKT3 is inhibited by a monoclonal antibody to CD44. *J. Immunol.* 147: 2493-2499.

- Rougon, G., Deagostini-Bazin, H. und Goridis, C. (1982). Tissue and stage-specific forms of a neural cell surface antigen linked to differences in glycosylation of a common polypeptide. *EMBO J.* 1: 1239-1244.
- 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.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M. und Sunshine, J. (1988). The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240: 53-57.
- Sadoul, R., Hirn, M., Deagostini-Bazin, H., Rougon, G. und Goridis, C. (1983). Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 304: 347-349.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schauer, R. (1985). Sialic acid and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 10: 357-360
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Garth, U. und Bell, J. J. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12160-12164.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., 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.
- Shih, T. Y., Weeks, M. O., Young, H. A., und Scolnick, E. M. (1979). Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* 96: 64-79.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Siraganian, R., Wahl, L. und Shaw, S. (1989). Dual role of the CD44 molecule in T-cell adhesion and activation. *J. Immunol.* 143: 2457-2463.
- Singer, S. J. und Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Smith, C. W. J., Patton, J. G. und Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Ann. Rev. Genet.* 23: 527-577.
- Somasekhar, Y und Mertz, J. E. (1985). Exon mutations that effect the choice of splice sites used in processing the SV40 late transcripts. *Nucl. Acids. Res.* 13: 5591-5609.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.

- Springer, T. A. und Lasky, L. A. (1991).** Sticky sugars for selectins. *Nature* 349: 196-197.
- 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., Arrufo, A., Amiot, M. und Seed, B. (1991).** The hematopoietic and epithelial form of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potential for hyaluronate bearing cells. *EMBO J.* 10: 343-348.
- Stanley, E. R. (1985).** The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for mononuclear phagocyte growth factor CSF1. *Cell* 41: 665-676.
- Starkey, R. S. (1990).** Cell-matrix interactions during tumor invasion. *Cancer Met. Rev.* 9: 113-123.
- Sweadner, K.J. und Goldin, S. M. (1980).** Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. *N. Engl. J. Med.* 302: 777-783.
- 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.* 623-627.
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993).** Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucl. Acids. Res.* 21: 1225-1229.
- Tonegawa, S. (1985).** The molecules of the immune system. *Sci. Am.* 253(4): 122-131.
- Toole, B. P., Biswas, C. und Gross, J. (1979).** Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6299
- Towbin, H., Staehelin, D. und Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- True, D. D., Singer, M. S., Lasky, L. A. und Rosen, S. D. (1990).** Requirement for sialic acid on the endothelial ligand of a lymphocyte homing receptor. *J. Cell Biol.* 111: 2757-2764.
- Turley, E. A. (1989).** Hyaluronic acid stimulates protein kinase activity in intact cells and in an isolated protein complex. *J. Biol. Chem.* 264: 8951-8955.
- Turley, E. A., Austen, C., Vandelig, K. und Clary, C. (1991).** Hyaluronan and a cell associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J. Cell. Biol.* 112: 1041-1047.
- Turley, E.A. (1992).** Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 11: 21-30.

- Ushiro, H. und Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor - activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.* 255: 8363-8365.
- Van Roy, F. und Mareel, M. (1992). Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol.* 2: 163-169.
- Walz, G., Arrufo, A., Kolanus, W., Bevilaqua, M. und Seed. B. (1990). Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250: 1132-1135.
- Warner, N. L. (1974). Membrane immunoglobulin and antigen receptors on B- and T-Lymphocytes. *Adv. Immunol.* 19: 67-216.
- Watson, S.R., Imai, Y., Fennie, C., Joyce, S.G. und Rosen, S.D. (1990). A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules. *J. Cell. Biol.* 110: 2221-2229.
- Watson, S. R., Fennie, C. und Lasky, L. A. (1991). Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing-receptor-IgG chimera. *Nature* 349: 164-167
- Webb, D. S. A., Shimizu, Y., Van Seventer, G. A., Shaw, S. und Gerrard, T. L. (1990). LFA-3, CD44, and CD45: Physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 249: 1295-1297.
- Welch, D. R., Evans, D. P., Tomasovic, S. P. und Nicolson G. L. (1983). Heterogeneous response and clonal drift of sensitivities of metastatic 13762NF mammary adenocarcinoma clones to γ -radiation *in vitro*. *Cancer Res.* 43: 6-10.
- Welch, D. R., Evans, D. P., Tomasovic, S. P., Milas, L. und Nicolson, G. L. (1985). Multiple phenotypic divergence of mammary adenocarcinoma cell clones. II. Sensitivity to radiation, hyperthermia and FUdR. *Clin. Exp. Metastasis* 2: 357-371.
- Wenzel, A. (1986). Charakterisierung von Differenzierungsantigenen auf dem Rattentumor BSp73 mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Wirth, K., Arch, R., Somasundaram, C., Hofmann, M., Weber, P., Herrlich, P., Matzku, S. und Zöller, M. (1993). Expression of a metastasis associated CD44 isoform in newborn and adult rats. *Eur. J. Cancer*, im Druck.
- Yagel, S. Feinmesser, R., Waghorne, C., Lala, P. K., Breitman, M. L. und Dennis, J. W. (1990). Evidence that β -(1-6) branched Asn-linked oligosaccharides on metastatic tumor cells facilitate invasion of basement membranes. *Int. J. Cancer* 44: 685-690.
- Yelton, D. E. und Scharff, M. D. (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu. Rev. Biochim.* 50: 657-680.
- Yogeeswarann G. und Salk, P. (1981). Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* 212: 1514-1516.

Zhou, D. F. H., Ding, J. F., Picker, L. F., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. und Goeddel, D. V. (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1 - The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. J. Immunol. 143: 3390-3395.