

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6270

**Die Signalübertragung von CD44 in
T-Lymphozyten**

Maria Angelika Grimm

Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1999

1 Zusammenfassung

Das Oberflächenglykoprotein CD44 ist in Embryonalentwicklung, Metastasierung, T-Zellaktivierung, Hämopoiese und „Lymphozyten-Homing“ involviert. Die Aktivierung von CD44 in T-Zellen mit dem natürlichen Liganden Hyaluronsäure oder mit aktivierenden CD44-Antikörpern induziert eine alternative Signalkette. Diese ist der bereits sehr gut charakterisierten Signalübertragung, die nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors/CD3-Komplexes induziert wird, sehr ähnlich. Daraus ergab sich die Fragestellung, welche Kinasen an der Signalübertragung von CD44 beteiligt sind.

Der humane CD44-Antikörper J-173 und der bisher noch nicht näher charakterisierte humane CD44-Antikörper D2.1 koaktivieren sowohl die homotypische T-Zellaggregation als auch das T-Zellwachstum. Die Bindung der Antikörper an CD44 aktivierte Proteine von 200, 150, 120, 112, 100, 84, 59, 56, 42, 38 und 35 kDa. Unter diesen Proteinen waren Lck und Erk2.

Untersuchungen in der Maus mit den inhibierenden CD44-Antikörpern IM7, KM81 und einem KM81 F(ab')₂-Fragment hemmten die CD3-induzierte Interleukin-2 Produktion und T-Zellproliferation (aktivierende Antikörper waren in der Maus nicht verfügbar). Es wurden Tyrosin-phosphorylierte Proteine von 120, 100, 84, 80 und 35 kDa sowie Erk2 (42 kDa) gehemmt. Die Spezifität der Antikörper wurde mit T-Zellen aus CD44-„Knockout“ Mäusen demonstriert. In diesen T-Zellen hatten die Antikörper keinen Einfluß auf eine CD3-induzierte Aktivierung. Die Hemmung durch CD44-Antikörper auf die CD3 Signalübertragungskette erfolgte stromabwärts der T-Zell-Rezeptor- ζ -Kette.

Die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine von 56, 120 und vor allem von 84 kDa kann in murinen T-Zellen auch durch Hyaluronsäure induziert werden. Dazu müssen ruhende T-Zellen durch Voraktivierung z.B. mit Phorbolestern befähigt werden, Hyaluronsäure zu binden. Diese Bindung wird durch CD44 und nicht durch einen anderen Hyaluronsäure-Rezeptor vermittelt. Überraschenderweise wurde Erk2 nicht mit Hyaluronsäure aktiviert. Folglich gibt es Unterschiede in der Signalübertragung nach Aktivierung mit CD44-Antikörpern bzw. Hyaluronsäure.

Ein Protein mit 84 kDa wird sowohl durch Hyaluronsäure als auch durch CD3-Antikörper besonders stark phosphoryliert. Es scheint auch im CD44-Signalweg zu liegen, weil hemmende, gegen CD44 gerichtete Antikörper seine Phosphorylierung unterdrücken und aktivierende seine Phosphorylierung bewirken. Da das Molekulargewicht dieses Proteins nicht mit den naheliegendsten Kandidaten, der 85 kDa-Untereinheit der PI3-Kinase, Ezrin, Stat1 β bzw. Stat3 β übereinstimmte, ist dessen Identität unklar. Dieses Protein wurde daher HARP (für „*Hyaluronic Acid Responding Phosphoprotein*“) genannt. Um HARP aufzureinigen und mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse zu identifizieren, wurden die Proteinlysate mit einer Ionenaustauschersäule aufgetrennt und einer quantitativen Immunpräzipitation mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper unterzogen. Die präzipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber angefärbt. Die Sichtbarmachung von HARP im Silbergel war bisher, im Gegensatz zu dem oben erwähnten 120 kDa Protein, nicht möglich.

Signal transduction of CD44 in T-lymphocytes

Abstract

The surface glycoprotein CD44 is involved in embryonal development, metastasis, T-cell activation, haemopoiesis and lymphocyte-homing. CD44 can be activated in T-cells by hyaluronic acid, its natural ligand, or activating CD44-antibodies. This triggers a signal transducing pathway similar to one activated by T-cell receptor/CD3-complex in T-cells. The aim of this work is to identify which kinases are involved in the signaling pathway triggered by CD44.

The human CD44-antibody J-173 and D2.1 (uptill now uncharacterized) coactivate the homotypic T-cell aggregation and the T-cell growth. The binding of these antibodies to CD44 activates proteins of 200, 150, 120, 112, 100, 84, 59, 56, 42, 38 and 35 kDa as identified by tyrosine phosphorylation. Among these proteins Lck and Erk2 were identified.

Experiments in the mouse system with the inhibiting CD44-antibodies, IM7, KM81 and a KM81 F(ab')₂-fragment inhibited the CD3-induced interleukin-2 production and T-cell proliferation (activating CD44-antibodies in the mouse system were not available at the time). Tyrosine-phosphorylated proteins of 120, 100, 84, 80 and 35 kDa as Erk2 (42 kDa) were inhibited. The specificity of antibodies in T-cells was demonstrated from CD44-„Knockout“ mice. In these T-cells the antibodies had no effect on the CD3-induced Erk2 activation. The T-cell-receptor- ζ -chain was found to be not involved, therefore the inhibition with CD44-antibodies on the CD3 signal transduction must be upstream to the T-cell-receptor- ζ -chain.

The tyrosine-phosphorylation of intracellular proteins of 56, 120 and mainly of 84 kDa were also induced in murine T-cells with hyaluronic acid. Binding of hyaluronic acid in resting T-cells must be induced upon a preactivation with phorbol ester. This binding is mediated through CD44 alone. Surprisingly Erk2 is not activated by hyaluronic acid. Therefore there are differences between the signaling pathways after activation with CD44-antibodies or hyaluronic acid.

A protein of 84 kDa is strongly phosphorylated upon hyaluronic acid treatment of murine and human lymphocytes as well as with CD3 antibodies. It appears to be in the CD44 signaling pathway, since inhibiting CD44 antibodies suppresses and activating antibodies induce its phosphorylation. Since the molecular weight of this protein does not agree with that of obvious candidates such as the 85 kDa subunit of PI3-kinase, Ezrin, Stat1 β or Stat3 β , its identity remains unclear. Therefore, this protein was called HARP (for „*Hyaluronic Acid Responding Phosphoprotein*“). In order to purify and subsequently to identify HARP mass spectrometric analysis would be utilized. Protein lysates were separated with an ion exchange column and this lysates were immunoprecipitated with a phospho-tyrosine-antibody. The precipitated proteins were separated by electrophoresis and then stained with silver. Unfortunately HARP was not visible to that end in the silver gele.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung

2	Einleitung	1
2.1	Der TCR/CD3-Komplex und seine Signalübertragung.....	1
2.1.1	Der T-Zell-Rezeptorkomplex	1
2.1.2	Signalübertragungswege nach Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes	2
2.1.3	Zelluläre Substrate der Protein-Tyrosin-Kinasen	4
2.1.4	Aktivierung des Shc-Ras-Erk2-Signalübertragungswegs	6
2.1.5	Transkriptionsfaktoren ermöglichen die Expression von Interleukin-2 und des Interleukin-2 Rezeptors	7
2.1.6	Die Funktion von Korezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Kostimulatoren	8
2.2	CD44.....	11
2.2.1	Struktur, Vorkommen und Funktion von CD44.....	11
2.2.2	Hyaluronsäure als Ligand von CD44	13
2.2.3	Regulation der Bindung von Hyaluronsäure	15
2.2.4	Wechselwirkung von CD44 mit dem Zytoskelett	17
2.2.5	Signalübertragung von CD44 in T-Zellen.....	17
2.2.6	Signalübertragung von CD44/Hyaluronsäure in anderen Zelltypen des Immunsystems	19
2.2.7	Zielsetzung der Arbeit	20
		21
3	Material	21
3.1.	Versuchstiere	21
3.2.	Zellen bzw. Zelllinien und Kulturbedingungen.....	22
3.3.	Antikörper.....	26
3.4.	Puffer und Lösungen	28
3.5.	Induktoren und Inhibitoren	29
3.6.	Radiochemikalien	29
3.7.	Chemikalien.....	31
3.8.	Geräte und Verbrauchsmaterial	33
4	Methoden	33
4.1	Zellkultur	33
4.1.1	Kultivierung von Suspensionszellen	33
4.1.2	Einfrieren von Suspensionszelllinien	33
4.1.3	Einfrieren von Blutlymphozyten (PBL)	33
4.1.4	Auftauen von Suspensionszelllinien.....	34
4.1.5	Auftauen von Blutlymphozyten	34
4.1.6	Bestimmung der Lebendzellzahl	34
4.2	Immunologische Methoden	34
4.2.1	Isolierung von murinen T-Zellen aus Lymphknoten.....	
4.2.2	Isolierung von humanen Blutlymphozyten aus Leukozytenkonzentraten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (verändert nach Reinherz et al., 1979).....	35
		36

4.2.3	Aufreinigung von humanen T-Zellen.....	37
4.2.4	Lichtmikroskopische Analyse	
4.2.5	Nachweis der Interleukin-2 Sekretion mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA).....	37
4.2.6	Statistische Auswertung der Daten.....	38
4.2.7	Ermittlung der Proliferation von T-Zellen	39
4.2.8	Behandlung von Zellen mit Induktoren.....	39
4.2.9	Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflußzytometrie	
4.2.10	Kopplung von Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) an Hyaluronsäure (De Belder und Wik, 1975).....	40
4.3	Protein-Methoden	
4.3.1	Herstellung einer Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)-Stamm- lösung (Krypta et al., 1988).....	41
4.3.2	Aktivierung der T-Zellen.....	42
4.3.3	Präparation von Zytoplasmaextrakten (Taher et al., 1996)	42
4.3.4	Immunpräzipitation von Proteinen	43
4.3.5	Aufreinigung von Proteinen durch Ionenaustauschersäulen	43
4.3.6	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
4.3.7	Zweidimensionale Gelelektrophorese (O'Farrell et al., 1975)	45
4.3.8	Silberfärbung von Proteingelen	
4.3.9	Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern ("Western-Blot")	46
4.3.10	Behandlung der Membran zur Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“).....	47
4.3.11	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus dem Kulturüberstand von Hybridomzelllinien	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Signalübertragung von CD44 in humanen T-Zellen	
5.1.1	Isolierung und Reinheit von T-Zellen isoliert aus Leukozytenkonzentrat	49
5.1.2	Einfluß von CD44-Antikörpern auf den Phänotyp und die Proliferation von humanen T-Zellen	51
5.1.3	Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Behandlung humaner T-Zellen mit den CD44-Antikörpern D2.1 und J-173.....	54
5.1.4	Hemmung der Signalübertragungswege mit Inhibitoren	59
5.2	Signalübertragung von CD44 in murinen T-Zellen.....	59
5.2.1	Kontrolle der Reinheit der murinen T-Zellpopulationen.....	
5.2.2	Hemmung der CD3 induzierten Proliferation von primären murinen T-Lymphozyten nach Zugabe von CD44-Antikörpern	60
5.2.3	Hemmung der CD3 induzierten Sekretion von murinem Interleukin-2 nach Behandlung mit CD44-Antikörpern	61
5.2.4	Optimierung der Methode zur Aktivierung muriner T-Lymphozyten mit CD3-Antikörpern	63
5.2.5	Hemmung der CD3 induzierten Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine in Anwesenheit von blockierenden CD44-Antikörpern.....	65

5.2.6	Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 nach Behandlung von T-Zellen aus CD44 "Knockout" Mäusen mit CD3- und CD44-Antikörpern	69
5.2.7	Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 nach Stimulierung von T-Zelllinien mit CD3- und CD44-Antikörpern	71
5.2.8	Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Behandlung von T-Zellen aus CD44v Transgenen Mäusen mit CD3- und CD44-Antikörpern	72
5.2.9	Tyrosin-Phosphorylierung der TCR ζ -Kette nach Behandlung der T-Zellen mit CD3- und CD44-Antikörpern	75
5.3	Signalübermittlung von Hyaluronsäure in murinen T-Zellen	78
5.3.1	Signalübertragung von Hyaluronsäure in primären murinen T-Lymphozyten	78
5.3.2	Signalübertragung von Hyaluronsäure in murinen T-Zelllinien	81
5.4	Identifizierung von HARP	84
5.4.1	Zweidimensionale Auftrennung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine	84
5.4.2	Immunpräzipitation der Tyrosin-phosphorylierten Proteine	86
6	Diskussion	92
6.1	Aktivierende CD44-Antikörper aktivieren die homotypische T-Zell-aggregation und die T-Zellproliferation	92
6.2	Aktivierende CD44-Antikörper induzieren die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine wie Erk2	93
6.3	Inhibierende CD44 Antikörper hemmen die IL-2 Produktion	95
6.4	Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung mit inhibierenden CD44-Antikörpern.....	96
6.5	Hemmung der Erk2-Phosphorylierung.....	98
6.6	Aktivierung von PTPasen	99
6.7	Signalübertragung induziert durch den CD44v6-Antikörper 1.1ASML	100
6.8	Hyaluronsäure induziert die Tyrosin-Phosphorylierung	101
6.9	Identifizierung von HARP.....	103
7	Literatur	104
8	Abkürzungen	119

2 Einleitung

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Bestimmte Zellen phagozytieren unspezifisch Mikroorganismen, andere erkennen fremde Antigene spezifisch auf ihren Zielzellen und eliminieren diese. Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen ab, die sich in zwei Hauptlinien differenzieren. Die erste Linie ist die myeloische Reihe, aus der Monozyten, Granulozyten und Makrophagen hervorgehen, die zweite ist die lymphatische Reihe, aus der T- und B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen entstehen. Die B-Zellen sind für die humorale Antikörper-Antwort, die gegen Bakterien und Viren in extrazellulären Medien gerichtet ist, verantwortlich. Die T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort, die zur Zerstörung von virusinfizierten Zellen, Parasiten und Krebszellen führt, aber auch für die Regulation anderer Immunzellen oder Hemmung einer Immunreaktion verantwortlich. Sie werden anhand ihrer Funktion in T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen und Suppressor-T-Zellen unterschieden. T-Helfer-Zellen werden durch die Bindung an Klasse II-Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) gebundene, fremde Antigene auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (für "antigen presenting cell", APC) aktiviert. Aktivierte T-Helfer-Zellen regulieren die Funktionen von Makrophagen (T_H1 für T-Helfer-1 Zellen) und B-Zellen (T_H2 für T-Helfer-2 Zellen) durch die Sekretion von unterschiedlichen Zytokinen bzw. Interleukinen. Zytotoxische T-Zellen töten in Klasse-I-MHC-restringierter Weise virusinfizierte Zellen ab. Suppressor-T-Zellen unterdrücken die Aktivität von B- und T-Zellen und verhindern somit eine überschießende Reaktion der Immunantwort. T-Zellen bilden daher ein zentrales Element in der Koordination eines Großteils der Immunantwort. Alle Funktionen der verschiedenen T-Zellen benötigen einen funktionsfähigen T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR-Komplex; TCR steht für „T-cell receptor“).

2.1 Der TCR/CD3-Komplex und seine Signalübertragung

2.1.1 Der T-Zell-Rezeptorkomplex

Die Erkennung von fremden Antigenen, welche im MHC-Komplex der APC oder der Zielzelle präsentiert werden, wird durch den TCR-Komplex ermöglicht. Der klonotypische TCR-Komplex besteht aus einer α - und β -Kette (oder γ - und δ -Kette), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Beide Ketten bestehen aus einer amino-terminalen variablen Domäne, die für die Spezifität verantwortlich ist und einer konstanten Domäne. Die Gene für die α - und β -Kette bestehen aus getrennten Segmenten, die während der Entwicklung der T-Zellen durch somatische Rekombination verknüpft werden. Die Kombination von V/J-Segmenten des α -Ketten Lokus und V/D/J-Segmenten des β -Ketten Lokus bilden das vollständige α/β -Heterodimer.

Der TCR hat eine zentrale Rolle in der T-Zellaktivierung. Hierzu müssen nach Bindung fremder Antigene an den TCR Signale in die Zelle weitergeleitet werden. Die α - und β -Kette besitzt keine großen zytoplasmatischen Domänen (nur fünf Aminosäuren), die für die Signalweiterleitung ausreichend wären. Der TCR ist mit der TCR η -Kette, der TCR ζ -Kette und dem CD3-Komplex assoziiert, die die Signalweiterleitung übernehmen. Die TCR η -Kette (23 kDa) entsteht durch alternatives Spleißen des RNS-Transkripts der TCR ζ -Kette (Clayton et al.,

1991). Ungefähr 80% des TCR sind mit zwei TCR ζ -Ketten assoziiert. Diese Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden und stellen somit ein Homodimer dar. Der verbleibende Rest von ca. 20 % ist mit einem TCR ζ -TCR η -Heterodimer assoziiert. Die TCR ζ -Kette (16 kDa) besitzt sechs potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, die z.T. konstitutiv phosphoryliert sind oder nach Induktion phosphoryliert werden (Kersh et al., 1998). Die phosphorylierte TCR ζ -Kette hat ein Molekulargewicht von 21 kDa bzw. 23 kDa.

Der CD3-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten. Zu diesen gehören die verwandten Proteine CD3 ϵ , CD3 δ und CD3 γ , welche eine große zytoplasmatische Domäne besitzen.

2.1.2 Signalübertragungswege nach Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes

Rezeptoren auf der Zelloberfläche dienen als Empfänger extrazellulärer Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone oder Mediatoren. Die Signalübertragung vom Rezeptor bis in den Zellkern führt über zytoplasmatische Signalmoleküle zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Expression spezifischer Gene. Diese regulieren z.B. das Zellwachstum, die Differenzierung oder die Apoptose.

Die Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes induziert eine Signalübermittlungskette, die über Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) der Src-Familie und der Tec-Kinase-Familie führt. Diese aktivieren über Effektormoleküle oder Adaptorproteine Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Interleukin-2 und des Interleukin-2 Rezeptors ermöglichen. Dies führt zum Zellwachstum (als Übersichtsartikel siehe: Klausner und Samelson, 1991; Rudd et al., 1994; Chan and Shaw, 1995; DeFranco, 1995; Cantrell, 1996; Wange und Samelson, 1996; Qian und Weiss, 1997).

Keines der Proteine des TCR/CD3-Komplexes besitzt eine intrinsische enzymatische Aktivität, wie z.B. eine Kinase-Aktivität. Wie Signale vom TCR zum CD3-Komplex und zu den PTK übermittelt werden, ist noch unklar. Jedoch ist eine Konformationsänderung des Rezeptors oder eine Vernetzung von Rezeptoren, die die Signalübermittlung induziert, beteiligt. Die durch den TCR-Komplex aktivieren PTK aus der Src-Familie, wie z.B. p56^{Lck} (Lck), p59^{Fyn} (Fyn) bzw. p50^{Csk} (Csk), phosphorylieren eine Vielzahl zellulärer Substrate. Hauptsächliche Substrate sind die ITAM-Sequenzen (für „Immunoglobulin Receptor Family Tyrosine-based Activation Motif) der CD3 ϵ -, CD3 δ -, CD3 γ - und TCR ζ -Kette (Reth, 1989). Die TCR ζ -Kette enthält drei Kopien der ITAM-Sequenzen. Dieses Motiv mit der Konsensussequenz EX₂YX₂L/IX7YX₂L/I (im Einbuchstaben-Aminosäurencode, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann) wurde auch in der Immunoglobulin- α - und - β -Kette des B-Zell-Rezeptors gefunden (Flaswinkel und Reth, 1994). Die verschiedenen ITAM-Sequenzen dienen der Signalamplifikation. Sie binden unterschiedliche Proteine, die eine SH2-Domäne (für „Src-Homologe-Domäne 2“) besitzen und aktivieren so verschiedene Signalübertragungswege (Osman et al., 1995).

Wichtige SH2-Domänen-Proteine sind Lck und Fyn, da sie unter den ersten sind, die nach der TCR-Aktivierung rekrutiert werden. Die PTKs Lck und Fyn besitzen insgesamt fünf verschiedene Domänen: ein regulatorisches carboxy-terminales Motiv, eine SH1-Domäne, SH2-Domäne, SH3-Domäne und eine amino-terminale Region (Übersichtsartikel: Mustelin und Burn, 1993; Rudd et al., 1994). Die SH-Domänen sind für die Wechselwirkung mit Adaptorproteinen oder für die Aktivierung von Effektorproteinen notwendig. Die hochkonservierte Aminosäuresequenz der katalytische SH1-Domäne besitzt die ATP-Bindestelle, eine Auto-phosphorylierungsstelle (Tyrosin 394 in Lck und Tyrosin 420 in Fyn; Abraham und Veilette,

1990; Peters et al., 1990) und eine Serin-Phosphorylierungsstelle in Lck (Serin 59; Watts et al., 1993). SH2-Domänen sind etwa 100 Aminosäuren lange Sequenzmotive, die mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen wechselwirken. Die SH2-Domäne von Lck beinhaltet zusätzlich potentielle Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, die nach Stimulierung z.B. mit Anti-CD3-Antikörpern bzw. dem Phorbol ester TPA phosphoryliert werden (Soula et al., 1993) und für eine Zunahme des Molekulargewichts in der SDS-Gelelektrophorese verantwortlich sind. Die SH3-Domäne besteht aus einem etwa 45 Aminosäuren langem Sequenzmotiv. Dies ermöglicht eine Wechselwirkung mit Prolin-reichen Sequenzen anderer Proteine.

Unter den Proteinen, die mit Lck oder Fyn wechselwirken, gehören sowohl PTK wie ZAP-70 und Csk als auch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) wie z.B. CD45 und PTP-1C. Durch eine koordinierte Reaktion von CD45 und Csk wird die Aktivität von Lck und Fyn reguliert.

Das Transmembranmolekül CD45 (200 kDa) hat eine intrinsische Phosphataseaktivität in der zyttoplasmatischen Domäne. Diese besteht aus zwei katalytischen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domänen (PTP) von jeweils etwa 240 Aminosäuren. Eine Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung der zweiten PTP-Domäne von CD45 induziert die PTPase Aktivität (Stover und Walsh, 1994). CD45 dephosphoryliert ein Tyrosin in der carboxy-terminalen Domäne (in der Position 505 bzw. 528 von Lck bzw. Fyn). Dies führt durch eine Konformationsänderung der Moleküle zu einer erhöhten PTK-Aktivität (Mustelin und Altman, 1990). Jedoch ist die Wechselwirkung zwischen Lck und CD45 für die Aktivierung nicht ausreichend. Sie wird durch ein CD45-Bindeprotein (32 kDa) vermittelt (Schraven et al., 1994). CD45 besteht aus einer Gruppe von 8 verschiedenen Isoformen, die in unterschiedlichen Zelllinien und in unterschiedlichen Stadien der lymphoiden Aktivierung/Entwicklung exprimiert werden (Trowbridge und Thomas, 1994). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in der Fähigkeit, die Aktivierung von Lck und Fyn zu unterstützen (Novak et al., 1994; McKennedy et al., 1995).

Csk phosphoryliert diese Tyrosin-Reste der PTK (505 bzw. 528 von Lck bzw. Fyn) und stabilisiert so die inaktive Konformation, in der die Tyrosin-Reste die intramolekulare SH2-Domäne binden ("tail-bite model").

Lck und Fyn phosphorylieren nach Aktivierung die ITAM-Sequenzen der TCR ξ -Kette und CD3 ϵ -Kette. Es konnte gezeigt werden, daß dies bei der murinen TCR ζ -Kette in einer geordneten Weise an mehreren Stellen geschieht (Neumeister et al., 1998). Die Tyrosin-phosphorylierten ITAM-Sequenzen wechselwirken hierauf mit der PTK ZAP-70 (für „ ξ -assoziiertes Protein von 70 kDa“) (Chan et al., 1992). Diese Wechselwirkung wird durch die zwei SH2-Domänen von ZAP-70 vermittelt (Wange et al., 1993; Isakov et al., 1995). ZAP-70 besitzt zusätzlich mehrere potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. ZAP-70 wird nun durch Lck und Fyn Tyrosin-phosphoryliert und dadurch aktiviert (Iwashima et al., 1994).

In murinen Thymozyten und murinen T-Zellen aus Lymphknoten ist ZAP-70 ständig an die konstitutiv phosphorylierte TCR ζ -Kette gebunden und wird nicht phosphoryliert oder aktiviert bevor der TCR/CD3-Komplex nicht stimuliert wird (van Oers et al., 1994).

Die Signalübertragung der PTK Lck, Fyn und ZAP-70 führt entweder direkt oder indirekt, d.h. über Adaptormoleküle, zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Effektormolekülen. Effektormoleküle sind z.B. FAK (fokale Adhäsionskinase), PI3-Kinase (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), PLC γ (Phospholipase C γ), Pyk2 (für „proline rich kinase 2“) und Vav. Adaptormoleküle sind z.B. c-Cbl, Cas (für „Crk-associated substrate“), Ezrin, FYB (für „Fyn binding protein“), Lat (für „linker for activation of T cells“), Lnk, Paxillin, RasGAP (GTPase-aktivierendes Protein), Sam68 (für „src associated in mitosis, 68 kDa“), Shc (für „src-

collagen-homolog“) und SLP-76 (für „SH2 domain-containing leukocyte protein“). Diese verbinden die Signalübertragungskette, die am TCR-Komplex gestartet wurde, mit verschiedenen „downstream“ gelegenen Effektormolekülen.

2.1.3 Zelluläre Substrate der Protein-Tyrosin-Kinasen

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die wichtigsten Substrate der PTK Lck, Fyn und ZAP-70 aufgelistet (siehe Abbildung 1). Sie umfassen sowohl Effektormoleküle als auch Adaptorproteine. Die Phosphorylierung dieser Proteine aktiviert entweder direkt oder indirekt Transkriptionsfaktoren.

Tabelle 1: Substrate der PTK Lck, Fyn bzw. ZAP-70

Protein	kDa	Wechselwirkungen	Struktur	Besonderheiten	Literatur
Cas (CrkL)	130	Substrat von FAK und src-Kinasen; assoziiert mit C3G, CrkI/II, CasL, Greb2	SH2- und SH3-Domäne; SH2-binde Motiv	Familie der Cas-Proteine	Nojima et al., 1995; Petch et al., 1995; Jucker et al., 1997
CasL	105	Substrat von Lck, ZAP-70; assoziiert mit Cas	SH3-Domäne, SH2-binde Motiv	Familie der Cas-Proteine	Ohashi et al., 1998
c-Cbl (Cbl)	120	Substrat von Fyn und ZAP-70; assoziiert mit Greb2, PLC γ , Vav, Lat, CrkI/II, CrkL, C3G und der 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase	Prolin-reiche Motive, Leucin-Zipper, RING Finger Struktur und Phospho-Tyrosin-bindende Domäne	Proto-Onkogen	Meisner et al., 1995; Fournel et al., 1996; Tsygankov et al., 1996; Marengère et al., 1997; Feshchenko et al., 1998
Ezrin	81	Substrat von Lck, assoziiert mit Plasmamembran und Zytoskelett	ITAM-ähnliche Sequenzmotive;	Familie der ERM-(Ezrin/Radixin/Moesin) Proteine	Egerton et al., 1992a; Fazioli et al., 1993; Thuillier et al., 1994; Rozsnyay et al., 1996
Fokale Adhäsionskinase (FAK)	120	Substrat von Integrinen und Fyn; assoziiert mit Csk, Greb2, Cbl, Paxillin	SH2- und SH3-binde Motiv	Mitglied der fokalen Adhäsionskinasen-Familie, PTK	Hildebrand et al., 1993; Maguire et al., 1995; Flinn und Ridley, 1996; Berg und Ostergaard, 1997
Fyn-Bindeprotein (FYB)	120/ 130	Substrat von Fyn, assoziiert mit SLP-76	SH3-binde Motive und eine SH3-Domäne	-	da Silva et al., 1993; da Silva et al., 1997a; da Silva et al., 1997b
Linker for activation of T cells (Lat); identisch mit p36	36	Substrat von ZAP-70; assoziiert mit Greb2, PLC γ , der 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase, Sos und Vav	SH2-binde Motiv	-	Übersichtsartikel: Pastor et al., 1995b; Zhang et al., 1998

Protein	kDa	Wechselwirkungen	Struktur	Besonderheiten	Literatur
Lnk	34	assoziiert mit PLC γ , der 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase und Greb2	eine SH2-Domäne	-	Huang et al., 1995; Takaki et al., 1997
Paxillin	70-80	Substrat von Lck, FAK und Pyk2, assoziiert mit Integrinen	SH2-binde Motive, Domäne, ein Prolin-reiches Motiv	zytoskelettales Adaptorprotein	Ostergaard et al., 1998
Phospholipase C γ (PLC γ)	150	Substrat von Lck oder ZAP-70; aktiviert indirekt Raf-1, die cAMP-abhängige Protein Kinase A und AP-1	Zwei SH2-Domänen, SH3-Domäne und PH-Domäne	spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in Diazylglycerin und Inositoltriphosphat	Weiss et al., 1991; Übersichtsartikel: Szamel und Resch, 1995
Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-Kinase)	85 110	Substrat von Fyn oder Lck; assoziiert mit: CD3 ϵ -Kette, PLC γ , Greb2, Lat, Vav, Shc, ζ -PKC und NFAT	Regulatorische Untereinheit: zwei SH2-Domänen, eine SH3-Domäne und Prolin-reiche Sequenzen Katalytische Untereinheit	spezifischer Inhibitor Wortmannin Phosphoryliert die D-3-Position von PI, PI-4-P, PI-4,5-P $_2$	Karnitz et al., 1994; von Willebrand et al., 1994; Ward et al., 1996; De Aós et al., 1997; Gomez et al., 1997
Pyk2	120	Substrat von Integrinen und Fyn	SH2- und SH3-binde Motiv, Prolin-reiche-Regionen	Mitglied der fokalen Adhäsionskinasenfamilie, PTK	Qian et al., 1997; van Seventer et al., 1998
Src-Collagen-Homolog (Shc)	46/52	Substrat von Lck und ZAP-70	eine SH2-Domäne und eine Phospho-Tyrosin-bindende Domäne	2 verschiedene Isoformen in T-Zellen	Ravichandran et al., 1993
SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76)	76	Substrat von ZAP-70; assoziiert mit Vav, Greb2, Lat und PLC γ	eine SH2-Domäne und eine Prolin-reiche-Region	erhöht die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT und des IL-2 Promotors	Jackman et al., 1994; Wardenburg et al., 1996; Wu et al., 1996; Raab et al., 1997
Vav	95	Substrat von Lck; assoziiert mit Shc, Greb2, der 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase,	eine SH2 und zwei SH3-Domänen, Helix-Loop-Helix-Domäne; GEF-Domäne; PH-Domäne	Proto-Onkogen	Bustelo et al., 1991; Straus und Weiss, 1992; Margolis et al., 1992; Wu et al., 1995
Vasolin containing protein VCP	100	-	Säugetier-Homolog von Cdc48p aus der Hefe	für die Zellzyklusprogression notwendig	Egerton et al., 1992b

In Tabelle 1 verwendete Abkürzungen:

AP-1: Aktivator-Protein-1; GEF: „guanine exchange factor“; Greb2: „growth factor receptor binding protein-2“; NFAT: „nuclear factor of activation in T cells“; PI: Phosphatidyl-Inositol; PI-4-P: Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat; PI-4,5-P $_2$: Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat; PH-Domäne: „pleckstrin homology domain“; ζ -PKC: ζ -Isoform der Protein-Kinase C; Sos: für „son of sevenless“

2.1.4 Aktivierung des Shc-Ras-Erk2-Signalübertragungswegs

Ein wichtiger Signalzweigweg, der für die Interleukin-2 (IL-2)-Produktion notwendig ist, führt über Shc, Ras und Erk zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Fos.

Im einzelnen bindet Shc nach Tyrosin-Phosphorylierung das Adaptorprotein Greb2 (für „growth factor receptor binding protein-2“) (Walk et al., 1998; Übersichtsartikel: Cantrell, 1996). Greb2 besteht aus einer SH2- und zwei SH3-Domänen. Die SH3-Domänen binden wahrscheinlich nach einem Konformationswechsel eine Prolin-reiche Domäne des Guanin-Nukleotid-Umwandlungsfaktors Sos (für „son of sevenless“), der die Ras-GTPase aktiviert (McCormick, 1993; Franklin et al., 1994; Übersichtsartikel: Pastor et al., 1995a).

T-Zellen exprimieren aber auch ein weiteres Protein, das den Guanin-Nukleotid-Austausch der Ras-GTPase katalysieren kann: Ein Proto-Onkogen namens Vav (Gulbins et al., 1993), das nach Stimulierung des TCR-Komplex aktiviert wird. Die Funktion von Vav bei der Aktivierung der Ras-GTPase wird aber kontrovers diskutiert. Wahrscheinlich spielt Vav aufgrund seiner Struktur eher eine Rolle bei der Aktivierung der Ras-verwandten Rho- und Rac-GTPasen (Han et al., 1997). Für die Aktivierung von Ras ist auch die Bindung an die klassische PTPase SHP-2, welche auch die Aktivierung von Erk2 ermöglicht, notwendig. SHP2 wird auch PTP1D, SH-PTP3, SH-PTP2 oder PTP2C genannt. Sie dephosphoryliert und aktiviert eventuell auch Mitglieder der src-Kinase-Familie. Es ist bekannt, daß diese eine Rolle bei der Aktivierung von Ras spielen (Qureshi et al., 1992).

Ras kann zwei verschiedene Signalkaskaden induzieren, die eine initiiert bei Raf-1 und die andere bei MEKK (MAPK/Erk-Kinase-Kinase; auch MEK-Kinase). Die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 wird durch die Bindung an aktiviertes Ras phosphoryliert und damit aktiviert. In Anwesenheit von Raf-1 ist Ras mit der Zellmembran assoziiert. Raf-1 katalysiert die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von MEK1 (MAP/Erk-Kinase-1) und MEK2 (Pronk und Bos, 1994). MEK1 und MEK2 werden auch als „dual-spezifische“ Kinasen bezeichnet, da sie in T-Zellen Erk1 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) und insbesondere Erk2 an einem Threonin (T 183) und einem Tyrosin (Y 185) phosphorylieren (Dérjard et al., 1995). Aktivierte Erk1 und Erk2 phosphorylieren Proteine im Zytosol wie z.B. Sos, Raf-1 und MEK1, die in der eigenen Aktivierungskaskade liegen. Dies ist eventuell Teil eines negativen Regelmechanismus der Erk1 und Erk2-Aktivierung, da diese Phosphorylierungen die Signalübermittlung hemmen (als Übersichtsartikel siehe Johnson und Vaillancourt, 1994). Die aktivierten Erk1- und Erk2-Formen wandern nach Dimerisierung in den Zellkern und phosphorylieren dort die TCF (für „ternary complex factor“) Transkriptionsfaktoren Elk-1 und SAP-1 (für „serum response factor associated protein“), die für die Aktivierung von c-Fos verantwortlich sind (Chen et al., 1992; Khokhaletchev et al., 1998).

Erk1 und Erk2 gehören zur Familie der „prolin-gerichteten“ MAP-Kinasen (für „mitogen activated protein kinase“), d.h. sie aktivieren Substrate durch Phosphorylierung eines Serins und/oder Threonins, wobei diesen Aminosäuren immer ein Prolin folgen muß.

Der zweite von Ras aktivierte Signalübertragungsweg über MEKK wird nach Kostimulation des TCR zusammen mit dem Transmembranmolekül CD28 (2.1.6) induziert (Minden et al., 1995; Übersichtsartikel: Lim et al., 1996). Er verläuft wahrscheinlich über die „dual-spezifische“ MAP-Kinase-Kinase SEK1 (für „Stress-aktivierte Protein/Erk-Kinase“), die MAP-Kinase JNK (Jun-N-terminale Kinase) und die Transkriptionsfaktoren Elk und c-Jun (Su et al., 1994; Avraham et al., 1998). C-Jun ist eine Komponente des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1. Zusätzlich aktiviert dieser Zweigweg wahrscheinlich auch die p38 MAP-

Kinase (Bagrodia et al., 1995). Die p38-Kinase hat andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. CHOP als Substrate.

2.1.5 Transkriptionsfaktoren ermöglichen die Expression von Interleukin-2 und des Interleukin-2 Rezeptors

Neben der Signalkette über Ras, die ausführlich beschrieben wurde, führt die Antigenerkennung über Ras-, Calcium- und Protein-Kinase-C-abhängige Signalübertragungswege zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Aktivator-Protein-1: c-Fos/c-Jun), NFAT (für „nuclear factor of activation in T cells“), NF- κ B (Nuklearer Faktor-kappa B), Oct-1 (Octamer-bindendes Protein-1), Sp1, CREB (für „cAMP responsive element binding protein“) und Ets (Oettgen et al., 1985; Emmel et al., 1989; Clipstone und Crabtree, 1992; Skerka et al., 1995; Feuerstein et al., 1996). Das koordinierte Zusammenwirken dieser Transkriptionsfaktoren ist für die Transkriptionsaktivierung unmittelbar aktivierter Gene (z. B. weiteren Transkriptionsfaktoren) und im Anschluß daran für die Aktivierung von „frühen“ Genen (z.B. Zytokinen) notwendig. Von den Zielgenen, die nach TCR-Aktivierung vermehrt produziert werden, ist das Zytokin IL-2 besonders wichtig (Durand et al., 1988; Crabtree, 1989; Boise et al., 1993), da die Produktion von IL-2 für T-Zellaktivierung notwendig ist (Abbildung 1).

Bei geeigneter Stimulation sezernieren T-Zellen IL-2, das mit IL-2-Rezeptoren (IL-2R), die aus einer β - und γ -Ketten bestehen, auf den T-Zellen wechselwirkt. Beide Ketten sind, im Gegensatz zur IL-2R- α -Kette, auf ruhenden T-Zellen konstitutiv exprimiert. Die Transkription der IL-2R- α -Kette wird durch diese Wechselwirkung verstärkt. Die Expression der IL-2R- α -Kette ist durch zwei DNS-Elemente transkriptionell reguliert, an die NFAT, NF- κ B, das Ets Protein Elf-1, SRF (für „serum response factor“) koordiniert binden (Algarté et al., 1995; Schuh et al., 1998). Der hochaffine IL-2-Rezeptor besteht aus einer α -, β - und γ -Kette. IL-2 unterstützt also auf autokrine oder parakrine Weise das T-Zellwachstum.

Die Bindung von IL-2 an den hochaffinen IL-2R induziert Signalübertragungswege, die zum T-Zellwachstum und zur Differenzierung führen. Jedoch besitzt der IL-2R keine intrinsische Kinase-Aktivität. Die IL-2R- α - und IL-2R- β -Kette aktivieren nach IL-2-Bindung Mitglieder der konstitutiv gebundenen Jaks (Janus-Kinasen), die zur Familie der PTK gehören. Die IL-2- β -Kette aktiviert zusätzlich Mitglieder der src-Kinasen wie Lck. Jak1 und Jak3 werden durch eine unbekannte Kinase phosphoryliert, hierdurch aktiviert und bilden dann Dimere. Aktivierte Jaks phosphorylieren den IL-2-Rezeptor, was zur Bindung der Transkriptionsfaktoren Stat 1, Stat 3 und Stat 5 (für „Signal transducers and activators of transcription“) führt. Die Stats werden von den Jaks Tyrosin-phosphoryliert (Gilmour et al., 1995; Lin et al., 1995a; Yu et al., 1996; Ng und Cantrell, 1997), dimerisieren über ihre SH2-Domänen und translozieren in den Zellkern, wo sie spezifische DNS-Sequenzen binden und die Transkription von Genen aktivieren (Übersichtsartikel: Liu et al., 1998). Eines dieser Gene ist die IL-2R- α -Kette (Lecine et al., 1996).

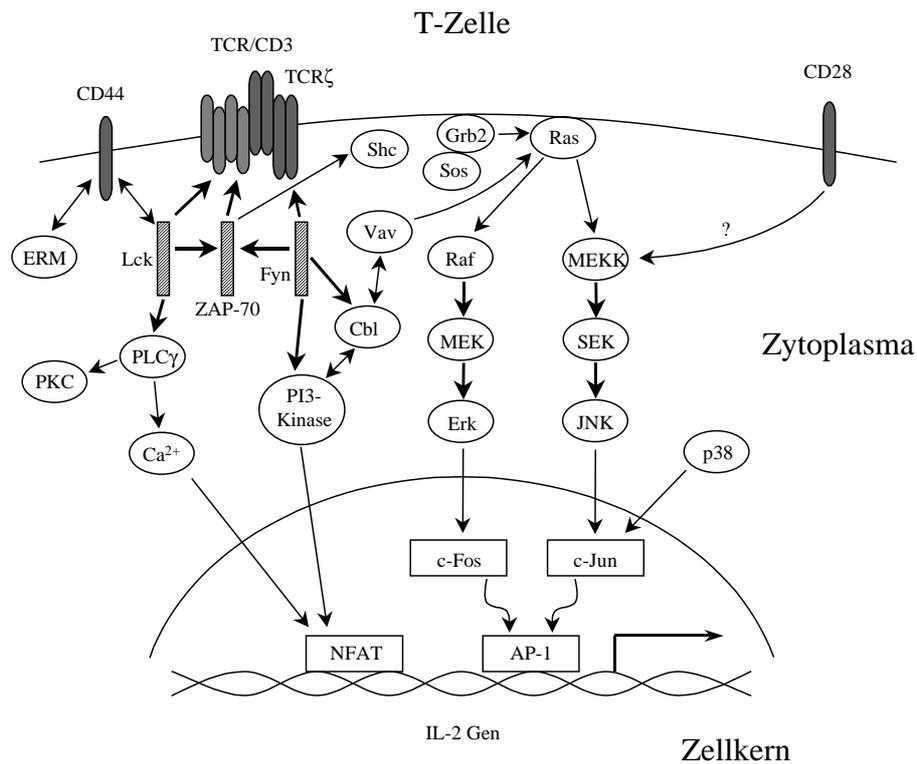


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalübertragewege des TCR/CD3-Komplex

In der Abbildung verwendete Abkürzungen:

AP-1: Aktivator-Protein-1; Ca²⁺: intrazelluläres Calcium; DNS: Desoxyribonukleinsäure; Erk: „extracellular signal regulated kinase“; ERM: Ezrin/Radixin/Moesin-Proteinfamilie; Grb2: „growth factor receptor binding protein-2“; IL-2: Interleukin-2; JNK: „Jun-N-terminale Kinase“; MAPK: „mitogen activated protein kinase“; MAPK: „MAP-Kinase-Kinase“; MEK: „MAPK/Erk-Kinase“; MEKK: „MEK-Kinase“; NFAT: „nuclear factor of activation in T cells“; PI3-Kinase: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase; PKC: Proteinkinase; PLCγ: Phospholipase Cγ; Shc: „Src-Collagen-Homolog“; Sos: „son of sevenless“; TCR: T-Zell Rezeptor; ZAP-70: ζ-assoziertes Protein von 70 kDa; (?): unklare Verknüpfung; Pfeile stellen die Aktivierung des folgenden Proteins dar. Doppelpfeile zeigen die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen.

2.1.6 Die Funktion von Korezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Kostimulatoren

Die Wechselwirkung des α/β-Antigen-Rezeptors auf der Oberfläche einer T-Zelle mit dem Antigen-MHC-Komplex auf der Zielzelle bzw. APC reicht nicht aus, um ruhenden T-Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, den Übergang in die G₁-Phase zu ermöglichen. Korezeptoren, Zell-Zell-Adhäsions-Proteine und Kostimulatoren auf den T-Zellen verstärken und stabilisieren diese Wechselwirkung (siehe Übersichtsartikel: Collins et al., 1994).

Die Antigenerkennung des TCR ohne Kostimulierung aktiviert die T-Zellen nicht, sondern führt einen Zustand herbei, der als (klonale) Anergie bezeichnet wird. Das T-Zellwachstum ist nicht mehr stimulierbar (Schwartz, 1990). *In vivo* basiert die extrathymische T-Zelltoleranz auf Anergie oder auf klonaler Deletion durch Apoptose. Eine Ursache für den Zustand der

Anergie kann die veränderte Expression von Lck und Fyn sein, welche in der Inaktivierung von Ras, Erk und einer reduzierten JNK Aktivität resultiert (Fields et al., 1996; Quill et al., 1992). Zusätzlich zeigt sich, daß in anergen T-Zellen die TCR ζ -Kette nicht phosphorylierbar ist (Migita et al., 1995) und mit anderen PTKs assoziiert ist (Boussiotis et al., 1996). Anergie T-Zellen sind unfähig zur IL-2-Produktion.

Es ist jedoch bekannt, daß bestimmte aktivierende Antikörper wie z.B. der CD3-Antikörper OKT3 in Lösung ohne Kostimulus die IL-2 Produktion induzieren und das T-Zellwachstum ermöglichen.

Die Wechselwirkungen der Korezeptoren CD4/MHC Klasse II und CD8/MHC Klasse I sind direkt für die T-Zellaktivierung notwendig. Wechselwirkungen von Zell-Zell-Adhäsions-Proteinen erhöhen die Affinität zur Zielzelle oder APC und Wechselwirkungen zwischen kostimulierenden Molekülen induzieren kostimulierende Signale, die für Proliferation und Differenzierung der T-Zellen notwendig sind. Die letzten beiden Wechselwirkungen werden durch LFA-1 (für „leukozyte function-associated antigen 1“) /ICAM-1 (für „intercellular adhesion molecule 1“), LFA-1/ICAM-2, LFA-1/ICAM-3, CD2 (LFA-2)/LFA-3, CD28/B7 und CD44/Hyaluronsäure vermittelt.

Die Wechselwirkung zwischen dem Leukozytenintegrin LFA-1 (CD11a/CD18) und ICAM-1, ICAM-2 bzw. ICAM-3 verstärkt die Bindung der Zell-Zell-Adhäsion der T-Zellen zu APC bzw. Zielzellen und ermöglicht homotypische Lymphozytenaggregationen und Zytoskelettumorganisationen in den T-Zellen (Koopman et al., 1990; Yamada und Miyamoto, 1995). LFA-1 besteht aus einer α - und β_2 -Kette. Der extrazelluläre Teil der Integrine ist mit der extrazellulären Matrix („ECM“) assoziiert (als Übersichtsartikel siehe: Machesky und Hall, 1996). Der zyttoplasmatische Teil von LFA-1 kann mit Aktin-Streßfasern in fokalen Adhäsionen verbunden werden (Peter und O’Toole, 1995). Die Stimulierung von LFA-1 induziert eine Signalübertragung, die zur Aktivierung von Erk2 führt (Cerný et al., 1996; Chen et al., 1996).

Ein anderer Kofaktor, CD2 (50 kDa), wurde zuerst als Schafserythrozyten-bindendes Glykoprotein beschrieben. Seine Liganden sind die Glykoproteine LFA-3 (CD58) (Dustin et al., 1987) und CD59. Die Bindung von CD2 an diese Liganden verstärkt die Zell-Zell-Adhäsion der T-Zellen mit der Zielzelle bzw. APC. Es wird auf fast allen peripheren T-Zellen exprimiert und ist mit CD3 physikalisch und funktionell assoziiert. Die Stimulierung von CD2 induziert eine Signalübermittlungskette, die über die PTK Lck und PLC γ führt (Danielian et al., 1992; Hubert et al., 1996). Sie ermöglicht die Expression von IL-2 und führt zum Zellwachstum (Danielian et al., 1992). Die Signalübertragung von CD2 stellt aber einen alternativen Weg zu dem des TCR/CD3-Komplexes dar, da CD2 und CD3 unterschiedliche Signalübermittlungswege aktivieren. So mobilisiert CD2 im Gegensatz zu CD3 höhere Mengen an intrazellulärem Calcium und aktiviert ZAP-70 nicht (Spinozzi et al., 1995; Hubert et al., 1996). Die Aktivierung der CD2-Signalübertragung ist mit einer bestimmten Kombination von CD2-Antikörpern möglich (Meuer et al., 1984).

CD28 ist der wichtigste kostimulierende Rezeptor für T-Zellen (44 kDa; Übersichtsartikel: Robey und Allison, 1995). Er wird auf fast allen T-Zellen exprimiert und bildet durch Disulfidbrücken ein Homodimer. Seine Liganden sind B7.2 (CD86) und B7.1 (CD80). Die Signalübertragung von CD28 umfaßt die eigene Autophosphorylierung und Aktivierung der

PI3-Kinase, Erk und JNK. Die Wirkungen von CD3- und CD28-Antikörpern sind synergistisch und führen zur erhöhten Produktion von IL-2, INF- γ (Interferon- γ), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α), TNF- β und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-, „colony-stimulating factor“). Mit Hilfe dieser Zytokine wird die Wechselwirkung von aktivierten T-Zellen mit anderen Zellen möglich. Der primäre Mechanismus, durch welchen das von CD28 transduzierte Signal die Zytokinproduktion beeinflusst, liegt im Falle von IL-2 sowohl in der Induktion der Transkription durch ein spezifisches Element („responsive Element“) im IL-2-Promotor, als auch in einer Stabilisierung der IL-2 mRNA (Fraser und Weiss, 1992). Die dadurch gesteigerte IL-2-Produktion verhindert den Zustand der klonalen Anergie (Harding et al., 1992). Neben dem Signalübertragungsweg über CD3 und dem Kostimulator CD28 sind auch Signalübertragungswege über zwei Kostimulatoren z.T. synergistisch. So konnte gezeigt werden, daß die Stimulierung von CD28 und CD44 synergistisch auf die IL-2-Sekretion wirkt (Huet et al., 1989; Sommer et al., 1995).

2.2 CD44

CD44 (CD steht für "cluster of differentiation") bezeichnet eine heterogene Familie von Transmembranglykoproteinen, die durch ein einzelnes Gen kodiert sind. Synonyme für CD44 sind die Bezeichnungen Glykoprotein GP^{Hermes}, Extrazellulärer Matrix Rezeptor III, Phagozyten Glykoprotein 1, Ly-24, Hyaluronat Rezeptor, HUTCH-1 (für „high endothelial venules“) H-CAM (für „homing-cellular adhesion antigen“) und In (Lu)-verwandtes p80 Glykoprotein. Ursache dieser Heterogenität in der Namensgebung sind die vielfältigen Funktionen von CD44 und die unterschiedlichen Gewebe, in denen CD44 exprimiert wird (Übersichtsartikel: Naor et al., 1997).

2.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von CD44

Das humane CD44-Gen erstreckt sich über einen Bereich von mehr als 50 kb auf Chromosom 11 und enthält mindestens 19 Exons (Screaton et al., 1992). Die humanen CD44-Proteine (80-230 kDa) gliedern sich strukturell in vier Domänen:

- eine amino-terminale, extrazelluläre Domäne, welche durch N-, O-Glykosylierung und Tyrosin-Sulfatierung sowie Anheftung von Chondroitin- und Heparinsulfat posttranslational modifiziert wird und für die Bindung an Liganden verantwortlich ist (Übersichtsartikel: Naor et al., 1997; Maiti et al., 1998; Sleeman et al., 1998)
- eine der Membran proximal gelegene Domäne, in welche durch „alternatives“ Spleißen der pre-mRNS die Sequenzen von 10 „variablen“ Exons eingefügt werden können
- eine hydrophobe Transmembran-Domäne mit einer Palmytylierungsstelle, welche die CD44 Proteine in der Zellmembran verankert und
- eine zytoplasmatische Domäne, welche über Adaptorproteine (z.B. ERM-Proteine und Ankyrin) CD44 mit dem Aktinzytoskelett verankert und 6 potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen hat (Kalomiris und Bourguignon, 1988; Tsukita et al., 1994; siehe auch Abbildung 2)

Die häufigste Form von CD44 ist ein 85-95 kDa-Protein, das keine durch variable Exons kodierte Sequenzen enthält: das Protein CD44s (CD44 Standardform) (Dalchau et al., 1980; Idzerda et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989; Wolffe et al., 1990). Es wird fast ubiquitär exprimiert, so z.B. auf allen hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Condrozyten und einigen neuronalen Zellen. Hingegen sind die varianten CD44 Isoformen, die die von den varianten Exons v1 bis v10 kodierten Sequenzen enthalten, in ihrer Expression auf wenige Zelltypen wie z.B. Monozyten, Epithelzellen, Keratinozyten, dendritische Zellen und metastasierende Tumorzellen beschränkt (Arch et al., 1992; Koopman et al., 1993). Diese Isoformen enthalten verschiedene Kombinationen der durch die varianten Exons kodierten Aminosäuresequenzen. Bis heute sind von den mehr als 700 theoretisch möglichen Kombinationen 20 verschiedene Isoformen beschrieben.

So sind z.B. die Keratinozyten in der Haut und die generativen Zellen des Darmepithels an der Basis der Krypten prominente Orte der Expression von Isoformen, die von Exon CD44v6 kodierte Aminosäuresequenzen enthalten. Die Expression von CD44s und varianten CD44-Isoformen wie z.B. Isoformen, die Exon CD44v6 bzw. CD44v9 kodierte Sequenzen enthal-

ten, ist in aktivierten Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen erhöht (Lesley et al., 1990; Mackay et al., 1994).

Ausnahmen von der Grundstruktur von CD44 sind Isoformen mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne (Screaton et al., 1992) und lösliche CD44-Proteine, die ins Serum abgegeben werden (Lucas et al., 1989). Die Konzentration von löslichem CD44, das durch eine proteolytische Abspaltung („Shedding“) entsteht, kann im Serum von Mäusen und Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder mit Tumorerkrankungen erhöht sein (Katoh et al., 1994; Saito et al., 1998).

CD44-Proteine unterstützen als Adhäsionsmoleküle die Zell-Zell-Wechselwirkungen, die homotypische T-Zellaggregation und Zellwanderungen wie die Wanderung von Lymphozyten vom Blutstrom zu Venolen mit hohem Endothel (HEV) wie z.B. in Lymphknoten (Jacobson et al., 1984; Rothlein und Springer, 1986; Jalkanen et al., 1987; Picker et al., 1989; Belitsos et al., 1990; St. John et al., 1990; Birch et al., 1991; DeGrendele et al., 1996). Als Rezeptor präsentiert CD44 Hyaluronsäure (2.2.2), Chemokine oder Wachstumsfaktoren wie z.B. Heparinsulfat-Bindungsfaktoren, unterstützt die Endozytose gebundener Hyaluronsäure und dient als Signalmolekül für die Weiterleitung von Wachstumsignalen (Culty et al., 1992; Hua et al., 1993; Tanaka et al., 1993; Bennett et al., 1995a; Sherman et al., 1998; siehe auch 2.2.5). CD44-Proteine sind dabei an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt wie z.B. Makrophagen- und T-Zell-Aktivierung, Wundheilung, rheumatoide Arthritis, „Lymphozyten-Homing“, Lymphozytenreifung, Hämoopoese, embryonale Entwicklung, Apoptose und Angiogenese (Jalkanen et al., 1986; Miyake et al., 1990b; Hamann et al., 1995; Griffioen et al., 1997; Khaldoyanidi et al., 1997; Yu et al., 1997; Weiss et al., 1997; Moll et al., 1998; Übersichtsartikel: Naor et al., 1997).

Insbesondere den varianten CD44 Isoformen kommt eine Funktion bei der Tumormetastasierung zu. So konnte die funktionelle Relevanz von CD44v4-v7 und CD44v6-v7 Isoformen mit Hilfe des CD44-Antikörpers 1.1ASML nachgewiesen werden, welcher ein Epitop erkennt, das vom varianten Exon 6 kodiert wird. Dieser Antikörper interferiert *in vivo* mit der Kolonisierung von Lymphknoten und der Lunge durch die metastasierende Ratten-Pankreaskarzinomzelllinie BSp73ASML, die die varianten Isoformen CD44v4-v7 und CD44v6-v7 exprimiert (Reber et al., 1990; Seiter et al., 1993). In der ursprünglich nicht-metastasierenden pankreatischen Tumorzelllinie BSp73AS konnte gezeigt werden, daß speziell die Überexpression der varianten Isoformen CD44v4-v7 und CD44v6-v7 den Zellen einen metastatischen Phänotyp verleiht (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). 1.1ASML blockiert auch in diesem Fall die Kolonisierung von Lymphknoten und der Lunge (Seiter et al., 1993).

Die funktionelle Relevanz von varianten CD44-Isoformen konnte auch bei der T-Zellaktivierung, der Bildung zytotoxischer T-Zellen und der Embryonalentwicklung gezeigt werden, da alle diese Prozesse von 1.1ASML inhibiert werden (Arch et al., 1992; Sleeman et al., 1996b; Sherman et al., 1998). Jedoch ist die Präsentation von Wachstumsfaktoren durch variante CD44 Isoformen, in der Entwicklung von Gliedmaßen gezeigt, die einzig bekannte molekulare Funktion, die von 1.1ASML gehemmt wird. Vermutlich spielt diese auch in den anderen Prozessen eine Rolle.

Der Grund für das Auftreten neuer CD44-Spleißvarianten in den Karzinomen ist eine Störung im Spleißkontrollmechanismus der Tumorzellen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß eine Phorbolsterbehandlung und Überexpression von c-Ha-ras zum transienten Anstieg der

Expression von CD44-Isoformen im Verhältnis zur Gesamt-CD44-Expression führt (Hofmann et al., 1993).

Aufgrund ihrer verstärkten Expression bzw. der Expression spezifischer Isoformen während des Metastasierungsprozesses können bestimmte variante CD44-Isoformen als Tumorprogressionsmarker für z.B. Brust-, Kolon-, Cervix-Karzinome und Non-Hodgkin-Lymphome benutzt werden (Pals et al., 1989; Matsumura und Tarin, 1992; Heider et al., 1993; Tanabe et al., 1993; Wielenga et al., 1993; Iida und Bourguignon, 1995; Dall et al., 1995; Stauder et al., 1995; Dall et al., 1996). Jedoch wird der Zusammenhang sowohl von erhöhter Expression varianter CD44-Isoformen als auch von der Expression spezifischer varianter CD44-Isoformen mit dem Metastasierungsprozess z.T. kontrovers diskutiert. Dies ist vermutlich auf technische Gründe oder auf unterschiedliche Kriterien in der Auswahl der Patienten in den Studien zurückzuführen.

Trotz der vielfältigen Funktionen von CD44 in der Embryogenese und während des erwachsenen Lebens sind Mäuse mit homozygoter Null-Mutation im CD44-Lokus normal entwickelt und haben keine offensichtlichen phänotypischen Abnormalitäten gegenüber CD44-positiven Mäusen (Schmits et al., 1997; Hilberg et al., unveröffentlichte Daten). Vermutlich gibt es ein oder mehrere Proteine, die die Funktion von CD44 kompensieren. Dieser kompensatorische Mechanismus scheint in differenzierten Geweben nicht mehr zu funktionieren, da in diesen ein phänotypischer Effekt mit inhibierenden Antikörpern wie z.B. 1.1ASML nachweisbar ist (Zöller et al., 1996; Sherman et al., 1998). Diese Hypothese wird durch transgene Mäuse untermauert, deren CD44-Expression selektiv in Keratinozyten unterdrückt ist (Kaya et al., 1997). Diese Mäuse zeigen ausgeprägte phänotypische Veränderungen der Haut, begleitet von einer Störung der Hyaluronsäure-Verteilung und des Keratinozytenwachstums.

Als Rezeptor bindet CD44 verschiedene Liganden wie Hyaluronsäure, Osteopontin, Serglycin, Kollagen Typ I und IV, Fibronectin, Addressin, Laminin, MIP-1 β und die mit Chondroinsulfat modifizierte invariante Kette (Wayner et al., 1987; Picker et al., 1989; Aruffo et al., 1990; Jalkanen und Jalkanen, 1992; Underhill, 1992; Naujokas et al., 1993; Toyama-Sorimachi et al., 1995; Weber et al., 1996; Miyake et al., 1990a).

2.2.2 Hyaluronsäure als Ligand von CD44

Der am besten charakterisierte Ligand von CD44 ist Hyaluronsäure. Hyaluronsäure ist ein nicht immunogenes, lineares Glykosaminoglykan, das aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten von D-Glucuronsäure [1- β -3] N-Acetyl-D-Glukosamin [1- β -4]_n besteht (Laurent, 1989; Übersicht: Laurent, 1998). Sie hat ein Molekulargewicht von 10³-10⁴ kDa und wird von Fibroblasten, Chondrozyten und Mesothelzellen synthetisiert (Laurent und Fraser, 1992). Sie ist eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix (ECM), in der sie nicht kovalent über ein Adaptorprotein mit anderen Proteoglykanen wie Chondroinsulfat interagiert (Laurent und Fraser, 1992). Hyaluronsäure ist in großen Mengen in der Lunge, der Lymphflüssigkeit, der Matrix von Lymphknoten und in der Dermis der Haut, aber nur in geringen Konzentrationen im Serum vorhanden (Aruffo et al., 1990). Hyaluronsäure hat neben der strukturgebenden Eigenschaft eine Funktion als Signalmolekül (Bourguignon et al., 1993). Wie die Hyaluronsäure-Bindung jedoch ein Signal in der Zelle auslöst, ist bisher nur unzureichend geklärt.

Hyaluronsäure reguliert größtenteils über CD44-Bindung Zell-Zell-Adhäsion, T-Zell-aggregation, Zellwanderung, Wachstum bzw. Differenzierung. Sie ist in eine Vielzahl von Prozessen wie z.B. Entzündung, Wundheilung, embryonale Entwicklung, Pathogenese, Tumorwachstum und Metastasierung verwickelt (West et al., 1985; Laurent und Fraser, 1992; Oksala et al., 1995; Zhang et al., 1995; Rafi et al., 1997).

Die Bindung von Hyaluronsäure an die CD44v8-v10-Isoform ist für das Tumorwachstum und die Metastasierung in Melanomzellen notwendig (Sy et al., 1991; Bartolazzi et al., 1994). Erstaunlicherweise konnte gezeigt werden, daß die Hyaluronsäurebindungs-fähigkeit der varianten CD44v4-v7 Isoformen für den Metastasierungsprozeß nicht notwendig ist (Sleeman et al., 1996b).

In Regionen von Entzündungen liegt Hyaluronsäure neben der hochmolekularen Form in niedermolekularer Form vor (100 kDa). Hoch- und niedermolekulare Hyaluronsäure zeigt unterschiedliche biologische Effekte auf Zellen und Gewebe (West et al., 1985; West und Kumar, 1989). So induzieren kleine Hyaluronsäure-Fragmente (3-16 Disaccharide) die Proliferation von Endothel-Zellen, während hochmolekulare Hyaluronsäure das Wachstum verhindert (West und Kumar, 1989).

CD44 benötigt mindestens sechs Zuckereinheiten der Hyaluronsäure zur Bindung (Underhill et al., 1983). Die Bindungsfähigkeit von Hyaluronsäure an CD44 wurde durch folgende Beobachtungen deutlich: Die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure kann durch Hyaluronsäure, lösliches CD44 oder monoklonale Antikörper (KM81, KM201 und IM7) blockiert werden (Miyake et al., 1990b).

CD44 ist der hauptsächliche Hyaluronsäurerezeptor (Aruffo et al., 1990). Aber auch andere Proteine, sogenannte Hyaladherine, binden Hyaluronsäure: das Knorpel-Linkprotein, Aggrecan, Hyaluronectin, TSG-6 (für „Tumor-Nekrose Faktor- α stimulated gene 6“) und IHABP (für „intracellular hyaluronic acid binding protein“) (Neame et al., 1986; Doege et al., 1987; Kohda et al., 1996; Hofmann et al., 1998).

Die Bindung wird durch drei Hyaluronsäure-Bindungsregionen von CD44, welche in Exon 2 und 5 kodiert sind, vermittelt (Yang et al., 1994). Beide Exons kodieren Sequenzmotive mit einer hohen Anzahl positiv geladener Aminosäuren (Arginin bzw. Lysin), die die negativen Ladungsgruppen von Hyaluronsäure binden (Peach et al., 1993). Die amino-terminale Hyaluronsäure-Bindungsstelle von CD44, die in allen Hyaluronsäure-Bindeproteinen konserviert ist, besteht aus einem Cluster von basischen Aminosäuren: BX_7B (im Einbuchstaben-Aminosäurecode, wobei X jede nicht-saure Aminosäure sein kann; B ist H, R oder K). Mutationen dieser basischen Aminosäuren reduzieren die Hyaluronsäure-Bindung (Zheng et al., 1995). So wurde ein kritisches Arginin 41 in CD44 durch Mutagenesestudien identifiziert. Zusätzlich enthält diese Bindestelle sechs konservierte Cysteine, die Disulfidbrücken bilden und so eine Struktur, die aus drei Schleifen besteht, herstellen. Zwei überlappende Cluster derselben Struktur sind außerhalb dieser amino-terminalen Hyaluronsäure-Bindungsstelle gelegen. Hier sind die Aminosäuren Lysin 158 und Arginin 154 und 162 für die Hyaluronsäure-Bindung notwendig. Alle drei Bindungsstellen bilden das „Linkmodul“ und sind für eine effektive Hyaluronsäure-Bindung notwendig (Peach et al., 1993; siehe auch Abbildung 2).

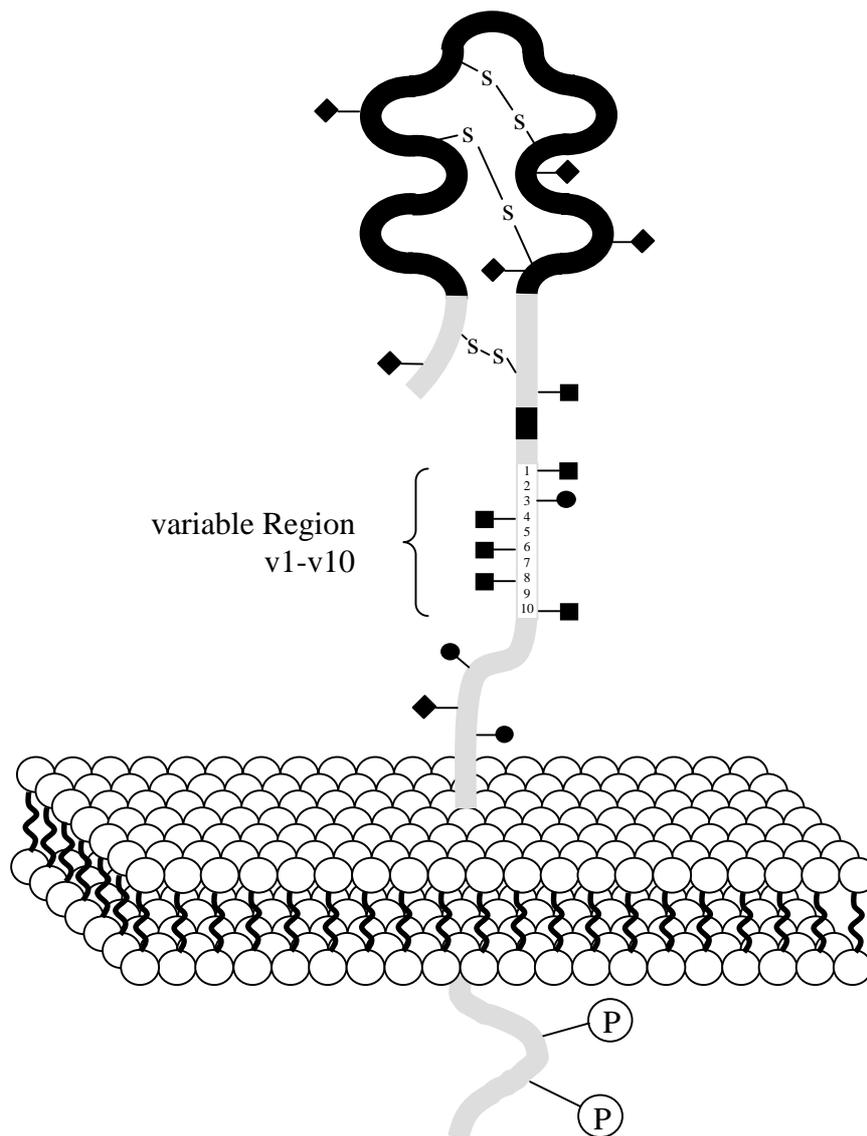


Abbildung 2: Schematische Darstellung von CD44

Die schwarz gekennzeichneten Bereiche der amino-terminalen, extrazellulären Domäne entsprechen den drei Hyaluronsäure-Bindungsregionen. (!): Potentielle Glycosaminoglykan-Anheftungsstellen (Chondroinsulfat bzw. Heparinsulfat); (◆): Potentielle N-gebundene Glykosylierungsstellen; (■): Potentielle O-gebundene Glykosylierungsstellen; (P): Potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen; -S-S-: Disulfidbrücken

2.2.3 Regulation der Bindung von Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure-Bindung ist *in vivo* reguliert, da nicht alle CD44-positiven Zellen wie z.B. primäre Lymphozyten und Monozyten Hyaluronsäure binden (Levesque et al., 1996; Weiss et al., 1998). Mechanismen, die die Hyaluronsäure-Bindung regulieren, sind: Erstens Quervernetzen bzw. die Dimerisation von CD44 mit Hilfe der Transmembran-Domäne; zweitens „inside-out signaling“ unterstützt durch die zytosolische Domäne, drittens eine Wechselwirkung von CD44 mit dem Zytoskelett z.B. über Ankyrin; und viertens posttranslationelle

Modifikationen wie z.B. Chondroitinsulfatierung, Glykosylierungen und Phosphorylierungen (Bartolazzi et al., 1996; Liu et al., 1996; Esford et al., 1998; English et al., 1998; Li et al., 1998).

Ein Quervernetzen der varianten CD44 Isoformen verstärkt ihre Hyaluronsäure-Bindung (Sleeman et al., 1996a). Die Dimerisation von CD44 mit Hilfe der Transmembran-Domäne wird durch ein Cystein vermittelt, das eine Disulfidbrücke bildet (Liu und Sy, 1996; Liu und Sy, 1997). Ein Austausch dieses Cysteins gegen eine andere Aminosäure verhindert die Hyaluronsäure-Bindung.

Auch die zytoplasmatische Domäne scheint für die Hyaluronsäure-Bindung wichtig zu sein. So binden bestimmte CD44-Konstrukte, denen die zytoplasmatische Domäne fehlt, Hyaluronsäure nicht (Lesley et al., 1992a; Liao et al., 1993). Vermutlich unterstützt die zytoplasmatische Domäne einen Konformationswechsel in der extrazellulären Domäne. Lokeshar et al. (1994) konnten in CD44s zeigen, daß die zytoplasmatische Domäne, die die Ankyrin-Bindestelle beinhaltet, für die Hyaluronsäure-Bindung notwendig ist. Dagegen konnten Sleeman et al. (1996a) zeigen, daß variante CD44v4-v7 Isoformen, denen bis auf die ersten drei Aminosäuren die gesamte zytoplasmatische Domäne fehlt, sehr wohl lösliche Hyaluronsäure binden.

Eine spezifische Anzahl von Glykosylierungen scheint für die Bindung optimal zu sein. Das Glykosylierungsmuster der CD44 Proteine ist zelltypspezifisch. Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Bindungsfähigkeit vom Zelltyp abhängig ist (He et al., 1992; Liao et al., 1993; Katoh et al., 1995; Sleeman et al., 1996b).

Eine Modifikation von CD44 mit Sialinsäure erniedrigt die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit (Katoh et al., 1995; Skelton et al., 1998). Dies könnte an der abstoßenden Wirkung liegen, die die beiden negativen Ladungsgruppen der Sialinsäure und Hyaluronsäure aufeinander ausüben. Aktivierte T-Zellen sind schwächer N-glykosyliert als unaktivierte Zellen. Da eine Deglykosylierung z.T. die Hyaluronsäure-Bindung induziert, ist es nicht verwunderlich, daß aktivierte Zellen stärker Hyaluronsäure binden.

Die varianten Isoformen haben vor allem mehr O-Glykosylierungsstellen und binden schwächer an Hyaluronsäure (Bennett et al., 1995b; siehe auch Abbildung 2).

Serin-Phosphorylierungen der zytoplasmatischen Domäne könnten das „inside-out signaling“ regulieren und so die Hyaluronsäure-Bindung beeinflussen. So zeigten Puré et al. (1995), daß die konstitutive Phosphorylierung zweier Serin-Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne von murinem CD44 für die Hyaluronsäure-Bindung notwendig ist. In anderen Beschreibungen sind jedoch diese Serin-Phosphorylierungsstellen nicht für die Hyaluronsäure-Bindung notwendig (Peck und Isacke, 1998).

Ein Quervernetzen von mehreren CD44-Molekülen als Voraussetzung für die Bindung eines Hyaluronsäure-Moleküls würde erklären, warum ein minimales Expressionsniveau von CD44 zur Hyaluronsäure-Bindung benötigt wird (Perschl et al., 1995; Uff et al., 1995).

Der Phorbol ester TPA, ein PKC- und Ras-Aktivator, und CD3-Antikörper stimulieren die Hyaluronsäure-Bindung von CD44 in murinen T-Zellen (Liao et al., 1993; DeGrendele et al., 1997a). So binden die varianten Isoformen, die Exon v6 und v9 kodierte Sequenzen enthalten, nach Aktivierung der T-Zellen Hyaluronsäure (Galluzzo et al., 1995). Dieser Prozeß beinhaltet die „de novo“-Proteinsynthese und deutet auf eine Zelldifferenzierung hin (Murakami et al., 1994).

CD44-Antikörper (wie IRAWB14 und R7166.7) induzieren in einem kurzfristigen Prozeß die Hyaluronsäure-Bindung in bestimmten T-Zellen (Lesley et al., 1992b; Lesley et al., 1993a;

Lesley et al., 1993b; Perschl et al., 1995; Zheng et al., 1995; Esford et al., 1998). Die Induktion erfolgt direkt nach der Bindung des Antikörpers an die Hyaluronsäure-Bindungsdomäne und beinhaltet keine „*de novo*“-Synthese von CD44. Dieser Vorgang benötigt jedoch multivalente Antikörper. Diese und andere Beobachtungen lassen vermuten, daß die Induktion ein Quervernetzen von CD44-Molekülen in eine multimere Konfiguration (Liu und Sy, 1996), eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von CD44 oder eine Veränderung der CD44-Verteilung auf der Zelloberfläche beinhaltet.

Es sind jedoch keine physiologischen Faktoren bekannt, die wie diese „induzierenden“ Antikörper die Hyaluronsäure-Bindung induzieren.

Es gibt also in Bezug auf die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit drei verschiedene Aktivierungszustände von CD44 (J. Lesley in Laurent, 1998): Erstens nicht induzierbares CD44, eine Veränderung dieses Zustandes ist nur z.T. durch eine Zellaktivierung oder Differenzierung möglich, zweitens durch Antikörper induzierbares CD44 und drittens aktives CD44, das konstitutiv Hyaluronsäure bindet z.B. in einigen T-Zelllinien.

2.2.4 Wechselwirkung von CD44 mit dem Zytoskelett

CD44 ist über seine zytoplasmatischen Domäne über die Adaptorproteine Ankyrin und die ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-Proteine mit dem Zytoskelett assoziiert. Die ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin sind als Quervernetzer in die Aktin-Filament/Plasmamembran-Wechselwirkung verwickelt. Sie sind bei Zytoskelettumorganisationen über ihre carboxy-terminalen Hälften mit dem Aktin-Zytoskelett (Algrain et al., 1993) und mit den amino-terminalen Hälften mit Membranproteinen wie z.B. CD44 assoziiert (Tsukita et al., 1994). Die Bindung zwischen den ERM-Proteinen und einem positiv geladenen Aminosäure-Motiv des zytoplasmatischen Teils von CD44 wird durch Phosphatidylinoside und der Rho-GTPase ermöglicht (Hirao et al., 1996; Legg und Isacke, 1998; Yonemura et al., 1998). Die ERM-Proteine sind nicht die direkten Substrate der Rho-GTPase, vielmehr wird die Bindung der ERM-Proteine mit CD44 und dem Aktin-Zytoskelett durch die Aktivierung der Rho-Kinase, einer Serin-Threonin-Kinase, ermöglicht (Matsui et al., 1996; Amano et al., 1997; Hall, 1998; Matsui et al., 1998).

Die von Rho induzierten Signalübertragungswege sind sehr komplex (Khosravi-Far et al., 1998). So ist Rho auch in die durch CD44 aktivierte und LFA-1 abhängige Lymphozyten-Aggregation verwickelt (Koopman et al., 1990; Tominaga et al., 1993). Hierbei ist die zytoplasmatische Domäne von LFA-1 mit dem sich umorganisierenden Zytoskelett assoziiert (Pardi et al., 1992a; Pardi et al., 1992b; Vermot-Desroches et al., 1995). Dies zeigt die unmittelbare Verbindung zwischen der Umorganisation des Zytoskeletts und der T-Zellaggregation.

2.2.5 Signalübertragung von CD44 in T-Zellen

CD44 hat die Fähigkeit, Signale in die Zelle zu übertragen, die letztlich zum Zellwachstum führen. Evidenzen für die CD44-vermittelte Signalübertragung, die für die Weiterleitung von Wachstumssignalen verantwortlich ist, lieferten Experimente an T-Lymphozyten. Jedoch binden ruhende Lymphozyten Hyaluronsäure nicht. Ein Weg, die Signalübertragung durch CD44

in T-Zellen zu imitieren, ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Jedoch ist die Aktivierung der Signalübertragung nicht von der Bindung von Antikörpern an die Hyaluronsäure-Bindungsstelle abhängig (Lesley et al., 1993a).

Pan-CD44-Antikörper, welche alle Mitglieder der CD44 Proteine erkennen, sind als aktivierende, koaktivierende oder inhibierende Signalauslöser in T-Zellproliferations- oder Zytokinsekretions-Experimenten in humanen und murinen T-Lymphozyten beschrieben.

Der humane CD44-Antikörper J-173 aktiviert ruhende T-Lymphozyten ohne Kostimulus (Galandrini et al., 1993; Funaro et al., 1994). Andere CD44-Antikörper wirken nur in Kombination mit einem der Kostimuli CD2 oder CD3 als Signalauslöser (Huet et al., 1989; Shimizu et al., 1989; Denning et al., 1990; Chong et al., 1992; Conrad et al., 1992; Pierres et al., 1992; Galluzzo et al., 1995; Sommer et al., 1995). Wieder andere CD44-Antikörper wie z.B. IM7 und 212.3 sind in der Lage, eine CD3-induzierte T-Zellproliferation zu inhibieren (Rothman et al., 1991; Guo et al., 1993; Guo et al., 1994). 212.3 inhibiert die Ca^{2+} -Mobilisierung, die IL-2-Produktion und die Expression der IL-2-Rezeptor- α -Kette (Rothman et al., 1993). Es ist daher nicht verwunderlich, daß 212.3 ein anderes Epitop auf CD44 als J-173 erkennt. Dieselben Antikörper, die eine CD3-induzierte T-Zellproliferation hemmen, induzieren eine Palmitoylierung von gebundenem CD44. Dies läßt vermuten, daß eine Lipidmodifikation von CD44 mit der Signalübertragung interferiert.

CD44 induziert in zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen zusammen mit seinem natürlichen Liganden Hyaluronsäure eine Signalkette, die die zytotoxische Aktivität dieser Zellen beeinflußt (Matsumoto et al., 1998). Die Behandlung dieser Zellen mit verschiedenen CD44-Antikörpern induziert oder inhibiert die zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen (Seth et al., 1991; Lesley et al., 1993b; Sconocchia et al., 1994). Die Aktivierung der PI3-Kinase ist für diese Aktivität in natürlichen Killerzellen notwendig (Sconocchia et al., 1997). Die zytotoxische Aktivität ist von einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den Effektorzellen begleitet (Galandrini et al., 1994b).

Die Signalweiterleitung von CD44, die zur T-Zellproliferation und zytotoxischen Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen führt, verläuft über PTK (Kelleher et al., 1995). Dies wurde dadurch gezeigt, daß der PTK-Inhibitor Genestein beide Vorgänge hemmt (Galandrini et al., 1993; Galandrini et al., 1996). Die Aktivierung von humanen T-Zellen mit den aktivierenden CD44-Antikörpern J-173 und Hermes 3 induziert die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine (Taher et al., 1996; Ilangumaran et al., 1998). J-173 ist im Gegensatz zu Hermes 3 gegen die Hyaluronsäure-Bindestelle von CD44 gerichtet. Jedoch aktiviert J-173 nicht die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Dies zeigt, daß unterschiedliche Epitope von CD44 für die Aktivierung der PTK und der zytotoxischen Aktivität notwendig sind.

Die Behandlung mit mitogenen CD3-Antikörpern induziert eine Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht (Galandrini et al., 1993). Dies zeigt, daß in die Signalübertragung von CD44 und CD3 ähnliche Proteine verwickelt sind. Unter diesen Proteinen konnte die PTK ZAP-70 identifiziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der zytoplasmatische Teil von CD44 nach Aktivierung mit J-173 an die PTKs Lck und Fyn bindet und sie aktiviert (Ilangumaran et al., 1998).

Wie CD44 an Lck und Fyn bindet und so die Signalübertragung induziert, ist noch unklar. Ein Sequenzmotiv ähnlich dem, welches die Assoziation von CD4 oder CD8 mit Lck ermöglicht, ist in der zytoplasmatischen Domäne von CD44 nicht vorhanden (Turner et al., 1990). Die

Wechselwirkung könnte durch Serin-Phosphorylierungen von CD44 reguliert sein oder über ein Adaptorprotein vermittelt werden.

Eine Signalübertragung durch variante CD44 Isoformen konnte nachgewiesen werden. So stimulieren humane CD44-Antikörpern, die gegen die varianten Sequenzen v6 (vFF7) und v9 (11.24) gerichtet sind, die Ca^{2+} -Mobilisation in voraktivierten T-Zellen. Diese Antikörper wirken zugleich koaktivierend auf die IL-2-Produktion und das T-Zellwachstum (Galluzo et al., 1995).

Hyaluronsäure als ein natürlicher Stimulus wirkt in T-Zellen auf die IL-2-Produktion, das T-Zellwachstum und die Granzym-Freisetzung im Zusammenwirken mit CD3-Antikörpern oder Phorbolestern (Galandrini et al., 1994a). Die durch Hyaluronsäure induzierte Proliferation kann durch den CD44-Antikörper KM81 blockiert werden (Guo et al., 1993). Dies zeigt, daß CD44 für die Weiterleitung von Wachstumssignalen verantwortlich ist.

Die Bindung von Hyaluronsäure an CD44 induziert auch eine Signalübertragung, die zu einer Ca^{2+} -Mobilisierung führt (Bourguignon et al., 1993).

Eine Plasmamembran-assoziierte PKC phosphoryliert zwei Serin-Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne von CD44 in Lymphozyten. Dies verstärkt die Bindung von CD44 an Ankyrin und induziert so eventuell eine Signalübertragung (Kalomiris und Bourguignon, 1989). Daher stellt die Serin-Phosphorylierung von CD44 einen weiteren Mechanismus für eine Stimulierung der Signalübertragung dar.

2.2.6 Signalübertragung von CD44/Hyaluronsäure in anderen Zelltypen des Immunsystems

In murinen B-Lymphozyten stimuliert die Aktivierung von CD44 mit CD44-Antikörpern oder Hyaluronsäure das B-Zellwachstum und die Differenzierung (Rafi et al., 1997). Ob die Signalübertragung von CD44 hierbei PTK aktiviert, ist unklar.

In anderen Zellen des Immunsystems wie z.B. Makrophagen führt die Aktivierung von CD44 durch Hyaluronsäure oder CD44-Antikörper zu einer Expression von Tumor-Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL- β) und IGF-1 (für „insulin-like growth factor“) (Noble et al., 1993). Diese Expression konnte durch den CD44-Antikörper KM201 inhibiert werden (Noble et al., 1993).

Auch in Monozyten stimulieren CD44-Antikörper die Produktion von TNF- α , IL- β und dem Kolonie-stimulierenden Faktor für Makrophagen (Webb et al., 1990; Gruber et al., 1992;). Es ist jedoch unklar, welche Signalübertragungswege in beiden Zelltypen wichtig sind. So exprimieren Monozyten und Makrophagen die PTK Lck und Blk nicht.

In dendritischen Zellen induziert Hyaluronsäure, J-173 und CD44-Antikörper, die gegen die varianten Isoformen v6 und v9, aber nicht gegen v3 gerichtet sind, die Produktion von IL-8, TNF- α , IL-1 β und GM-CSF (Haegel-Kronenberger et al., 1998). Dies ist von der phänotypischen und funktionellen Reifung dieser Zellen begleitet. Hyaluronsäure und J-173 stimulieren zusätzlich die Freisetzung von IL-6, IL-10 und IL-12.

2.2.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von CD44 in der Signalübertragung in T-Zellen der Maus und des Menschen zu untersuchen. Die Annahme war naheliegend, daß die Signalübermittlung von CD44 in der Maus ähnlich wie im menschlichem Organismus über PTK verläuft. Die Realisierung dieser Aufgabe beinhaltete:

- I. Stimulierung der Signalübertragung von CD44 in primären T-Zellen und T-Zelllinien aus Mensch und Maus mit CD44-Antikörpern und Identifizierung von PTK, die an der Signalübertragung beteiligt sind
- II. Untersuchung der Signalübermittlung der CD44v-Isoformen mit dem CD44-Antikörper 1.1ASML
- III. Induktion der Signalübertragung mit Hyaluronsäure, dem natürlichen Liganden von CD44, in primären T-Zellen und T-Zelllinien aus der Maus
- IV. Aufklärung der Signalübertragungswege mit Hilfe von Inhibitoren, die bekannte Kinasen spezifischen blockieren

3 Material

3.1 Versuchstiere

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Charles River Deutschland (Sulzfeld) bezogen.

Ratte CD44v4-7 überexprimierende transgene Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Jürgen Moll zur Verfügung gestellt (Zöller et al., 1997).

CD44 „Knockout“-Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. T.W. Mak zur Verfügung gestellt (Schmits et al., 1997).

Die Tiere wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen in den Experimenten eingesetzt.

3.2 Zellen bzw. Zelllinien und Kulturbedingungen

Vorbemerkung: Alle Zelllinien werden in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Murine T-Zellen

T-Zellen wurden aus murinen Lymphknoten isoliert und in RPMI 1640, 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM Hepes pH 7,4 und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol kultiviert.

Leukozytenfiltrat (engl. *buffy coats*) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Reichel (Städtisches Klinikum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung der peripheren Blutzellen und T-Lymphozyten erfolgte in RPMI 1640, 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM Hepes pH 7,4 und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol.

IRAWB14

IRAWB14 ist eine Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper (Ratte IgG_{2a}) erzeugt, der gegen murines CD44 gerichtet ist. Dieser CD44-Antikörper induziert die Bindung an Hyaluronsäure in T-Zelllinien (Lesley et al., 1992b). IRAWB14-Zellen werden in DMEM, 10 % Hitze-inaktiviertem Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. J. Lesley zur Verfügung gestellt.

KM81

KM81 (ATCC TIB 241) ist eine Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper (Ratte IgG_{2a}) erzeugt, der gegen murines CD44 gerichtet ist. KM81-Zellen wurden in RPMI 1640, 20 % Hitze inaktiviertem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol kultiviert.

LB17

LB-17 ist eine T-Zell Lymphom-Zelllinie aus der Balb/c Maus (Lugasi et al., 1990). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. D. Naor zur Verfügung gestellt. LB-Zellen werden in RPMI 1640, 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM Hepes pH 7,4, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 1 µg/ml Insulin und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol kultiviert.

R7166.7

R7166.7 ist eine Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper (Ratte IgM) erzeugt, der gegen murines CD44 gerichtet ist. Dieser CD44-Antikörper induziert die Bindung an Hyaluronsäure T-Zelllinien (Lesley et al., 1990). R7166.7-Zellen werden in D-MEM, 10% Hitze inaktiviertem Pferdeserum, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin kultiviert. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. J. Lesley zur Verfügung gestellt.

3.3 Antikörper

In Tabelle 2a und 2b sind die für die T-Zellaktivierungsexperimente, Western Blots und FACS-Färbungen verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgeführt.

Tabelle 2a (Primäre Antikörper)

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
CD2	AICD.M1	IgG ₁	gerichtet gegen Domäne 1 des humanen CD2	monoklonal, aus der Maus	von Prof. S. Meuer, Uni Heidelberg (Wild et al., 1997)
CD2	AICD.M2	IgG ₁	gerichtet gegen Domäne 2 des humanen CD2	monoklonal, aus der Maus	von Prof. S. Meuer, Uni Heidelberg (Wild et al., 1997)
CD2	3PT		gerichtet gegen humanes CD2	monoklonal, aus der Maus	von Prof. S. Meuer, Uni Heidelberg
CD3ε	OKT3	IgG _{2a}	gerichtet gegen humanes CD3	monoklonal, aus der Maus	von Prof. S. Meuer, Uni Heidelberg (Hoffman et al., 1980)
CD3	1452C11	IgG	gerichtet gegen die murine CD3 ε Kette des TCR-Komplexes	(ohne Natriumazid) monoklonal, aus armenischem Hamster	Pharmingen, San Diego, USA Leo et al., 1987

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
CD3 bio (biotinyliert)	1452C11	IgG	s.o.	s.o.	Pharmingen, San Diego, USA
CD4 FITC (Fluoreszin- isothiocya- nat)	H129.19	IgG _{2a}	gerichtet gegen murines CD4	monoklonal	Life Technologies, Gaithersburg, USA
CD44v6	1.1ASML	IgG ₁	gerichtet gegen CD44v6 aus der Ratte	monoklonal, aus der Maus	Günthert et al., 1991
CD44	D2.1		gerichtet gegen die Hyaluronsäure Binde- stelle von humanem CD44	monoklonal, aus der Maus	Aideen Long, Dublin, UK
CD44	IM7.8.1 (IM7)	IgG _{2b,κ}	gerichtet gegen murines CD44; reagiert auch mit humanem CD44	monoklonal, aus der Ratte	Pharmingen, San Diego, USA Budd et al., 1987
CD44 FITC	IM7.8.1	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.
CD44 Cy- Chrome	IM7.8.1	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.
CD44	IRAWB14	IgG _{2a}	gerichtet gegen murines CD44, induziert die Bindung an Hyaluronsäure	monoklonal, aus der Ratte	Lesley et al., 1992b
CD44	J-173	IgG ₁	gerichtet gegen humanes CD44	monoklonal, aus der Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD44	KM81	IgG _{2a}	gerichtet gegen die Hyaluronsäure Binde- stelle von murinem CD44	monoklonal, aus der Ratte	ATCC TIB 241
CD44	KM81 (Fab') ₂		Enzymatischer Verdau des KM81 Antikörpers mit Pepsin	s.o.	Eurogentec Bel S.A.
CD44	R7166.7	IgM	gerichtet gegen murines CD44, induziert die Bindung an Hyaluronsäure	monoklonal, aus der Ratte	Lesley et al., 1990

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
Erk-1,2	K-23	IgG	gerichtet gegen die Aminosäuren 305-327 des Ratten-Erk-1; reagiert mit humanem und rattem Erk	polyklonal, aus dem Kaninchen	Santa Cruz, Kalifornien, USA
phospho Erk-1,2	-	IgG	gerichtet gegen die Aminosäuren 196-209 des humanen Erk-1	polyklonal, aus dem Kaninchen	Biolabs, Beverly, USA
Ezrin	-	IgG ₁	gerichtet gegen murines Ezrin	monoklonal	Transduction Labs, Lexington, USA
Lck	2102	IgG	gerichtet gegen die Aminosäuren 476-505 des humanen Lck; reagiert mit murinem Lck	polyklonal, aus dem Kaninchen	Santa Cruz, Kalifornien, USA
Phospho-Tyrosin	PY-20	IgG _{2b}	gerichtet gegen phosphorylierte Tyrosinreste	monoklonal, aus der Maus	Transduction Labs, Lexington, USA
Phospho-Tyrosin HPR (Mee-rettich Peroxidasegekoppelt)	PY-20	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.
Phospho-Tyrosin Agarose (Agarosegekoppelt)	PY-20	s.o.	s.o.	s.o.	Santa Cruz, USA
PI3 Kinase	-	-	gerichtet gegen den c-Terminus der α Untereinheit der humanen PI3-Kinase	polyklonal, aus dem Kaninchen	Transduction Labs, Lexington, USA
Stat1	1	IgG ₁	gerichtet gegen den N-Terminus des humanen Stat 1	monoklonal, aus der Maus	Transduction Labs, Lexington, USA

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
Stat3	84	IgG ₁	gerichtet gegen den N-Terminus des ratten Stat 3; reagiert mit humanem Stat3	monoklonal, aus der Maus	Transduction, Labs, Lexington, USA
TCR ζ	6B10	IgG	gerichtet gegen die humane TCR ζ Kette, reagiert mit muriner TCR ζ Kette	monoklonal,	Zymed, San Francisco, USA
TCR ζ	387	-	gerichtet gegen die humane TCR ζ Kette reagiert mit muriner TCR ζ Kette	polyklonal, aus der Ratte	Von Dr. Larry Samelson, Maryland, USA; (Orloff et al., 1989)

Tabelle 2b (Sekundäre Antikörper):

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
Kaninchen HRP	-	gepooltes Antiserum	IgG Subklassen	polyklonal, aus der Ziege	Dako, Hamburg
Maus	-	gepooltes Antiserum	IgM+IgG+IgA (H+L)	polyklonal, aus der Ziege	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
Maus FITC	-	s.o.	IgG Subklassen	polyklonal, aus dem Kaninchen	Dako, Hamburg
Maus HRP	-	s.o.	IgG Subklassen	polyklonal, aus dem Kaninchen	Dako, Hamburg
Maus PE (Phytoerythrin)	-	s.o.	IgG Subklassen	polyklonal, aus dem Kaninchen	Dako, Hamburg
Ratte	-	gepooltes Antiserum	IgM+IgG (H+L)	polyklonal, aus dem Kaninchen	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
Ratte FITC	-	s.o.	IgG (H+L) Subklassen	polyklonal, aus der Ziege	Jackson Immuno Research Laboratories, Baltimore, USA

Antikörper	Klon	Isotyp	Epitop	Species	Quelle
Steptavidin FITC	-	s.o.	-	-	Pharmingen, San Diego, USA
Ziegen bio.	-	s.o.	IgG (H+L) Subklassen	polyklonal, aus Kanin- chen, mini- male Kross- reaktivität mit mensch- lichen Serum Proteinen	Dako, Hamburg

3.4 Puffer und Lösungen

Nährmedien und Puffer für die Zellkultur:

ACK-Puffer zur Erythrozytenlyse

150 mM NH₄Cl
 1 mM KHCO₃
 0,1 mM Na₂EDTA
 auf pH 7,2-7,4 mit HCl eingestellt

FACS-Medium

Zur Inkubation der Zellen mit Antikörpern in der FACS-Analyse wurde PBS unter Zusatz von 3 % FCS verwendet.

Trypanblau-Vitalfärbung

Trypanblau reichert sich selektiv im Zytoplasma abgestorbener Zellen an, da es die Zytoplasmamembran lebender Zellen nicht passieren kann. Auf diese Weise werden tote Zellen blau angefärbt und lassen sich von den ungefärbten lebenden Zellen unterscheiden.

Trypanblaulösung: 0,4 % w/v in PBS, steril (gefiltriert)

Waschmedium

Waschmedium wurde für die Aufreinigung von PBL verwendet. Dem Medium RPMI 1640 wurden folgende Supplemente zugefügt:

10 % Hitze inaktiviertes FCS
 2 mM Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 10 mM HEPES pH 7,4
 0,05 mM β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer:**2 D Puffer**

5 %	β -Mercaptoethanol
12 %	NP-40
6 %	Ampholine pH 3,5-10

Elektrophorese-Puffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,5 %	SDS

Probenübersichtungspuffer

8 M	Harnstoff (ultra pure)
5 %	NP-40
1 %	Ampholine pH 3,5-10

Protein-Probenpuffer

62,5 mM	Tris	pH 8
2 %	SDS	
10 %	Glycerol	
0,00 1%	Bromphenolblau	
100 mM	β -Mercaptoethanol	

Protein-Extraktionspuffer (Taher et al., 1996)

50 mM	Tris	pH 8
150 mM	NaCl	
1 %	NP-40	
10 μ g/ml	Leupeptin	
10 μ g/ml	Aprotinin	
1 mM	PMSF	
1 mM	Natriumorthovanadat	
5 mM	Natriumfluorid	
2 mM	EDTA	

Western Blot-Puffer:**PBS**

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
0,7 mM	CaCl ₂
0,6 mM	MgCl ₂
6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,6	

Färbelösung für Western Blots

0,1 %	Ponceau-Rot S
5%	Essigsäure

„Stripp-Puffer“

62,5 mM	Tris pH 6,8
2 %	SDS
100 mM	β-Mercaptoethanol

Transferpuffer für Proteinblots

48 mM	Tris
39 mM	Glycin
	pH 9,2 mit HCl eingestellt
20 %	Methanol

Alle aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Zur Sterilfiltration wurden 0,22 µm Zelluloseacetat-Filter verwendet.

3.5 Induktoren und Inhibitoren

Aprotinin	Boehringer, Mannheim
Concanavalin A	Sigma, Deisenhofen
Healon vom Hahnenkamm	Pharmacia, Freiburg
Hyaluronsäure vom Hahnenkamm	Sigma, Deisenhofen
Rekombinantes Interleukin 2, muriner, konditionierter-X63/IL-2 Kulturüberstand	Dr. H. Karasuyama, Basel, Schweiz
IL-2 mouse precoated ELISA Endogen	Endogen, Woburn, USA
Ionomycin (f.c. 500 ng/ml)	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen

PD98059 (f.c. 50 μ M)	Calbiochem, Cambridge, Great Britain
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
SB203580 (f.c. 50 μ M)	Calbiochem, Cambridge Great Britain
12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA; f.c. 20 ng/ml)	Sigma, Deisenhofen
Wortmannin (f.c. 1 μ M)	Sigma, Deisenhofen

Von diesen Substanzen wurden konzentrierte Stammlösungen in Wasser (Concanavalin A, Aprotinin, Leupeptin), PBS (Hyaluronsäure), Ethanol (PMSF) oder DMSO (TPA, PD98059, SB203580, Wortmannin, Ionomycin) angesetzt und bei -20°C gelagert.

3.6 Radiochemikalien

6^3H Thymidin (37 MBq/ml, 1 mCi/ml)	Amersham Buchler (Braunschweig)
--	---------------------------------

3.7 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ II (SeaKem LE)	Biozym, Hess. Oldendorf
Amberlite	Serva, Heidelberg
Ampholyte pH 5-8	Pharmacia, Freiburg
Ampholyte pH 3,5-10	Pharmacia, Freiburg
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
β -Mercaptoethanol	LifeTechnologies, Gaitersburg, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dibutylzinndilaurat	Merck, Darmstadt
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
D-MEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt für den Bereich 193-33 kDa	Sigma, Deisenhofen
Eichproteine, vorgefärbt für den Bereich 102-19,9 kDa	Bio Rad, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ficoll Paque Typ 400	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszin Isothiocyanat Isomer I	Fluka, Buchs, Schweiz
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Bio Whittaker, Walkersville, USA
Fötales Rinderserum	HyClone Laboratories, Logan, USA
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Harnstoff, ultrapure	Pharmacia, Freiburg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MEM (nicht essentielle Aminosäuren)	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
3MM Whatman Papier	Whatman, Maidstone, GB
N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin (TEMED)	BioRad, München
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorit	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP-40)	Boehringer, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Ponceau Rot S	Sigma, Deisenhofen
Protein A Agarose	Calbiochem, Cambridge, Großbritannien

Protein G-Plus Agarose	Calbiochem, Cambridge, Großbritannien
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
Schafserythrozyten (SRBC)	ICN, Costa Mesa, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween R20	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

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

3.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte:

Brutschrank	Labotect, Göttingen
2D Gelelektrophorese GT3	Hoefer Scientific Instru- ments, San Francisco, USA
Durchflußzytometer (FACS Star Plus)	Becton Dickinson, San Jo- se, USA
Elektrophorese-Apparatur 1000/500	BioRad, München
Elektrophorese-Apparatur 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven, USA
Ionenaustauschersäulen (HiTrap IEX Test Kit)	Pharmacia, Freiburg
Kühlzentrifuge Hermle ZK 401	Hermle, Gosheim
Laserdensitometer (Bromma Ultra Scan XL Enhanced Laser Densitometer)	Pharmacia, Freiburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop (Axioskop MC100)	Zeiss, Jena
Naß-Transferapparat für Western-Blot	BioRad, München
Schüttler (Polymax 2040)	Heidolph, Kehlheim
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron, Gosheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 2-HS	Beckman, Stuttgart
Titertek Multiscan PLUS MKII ELISA-Reader	Labsystems, Finnland
Transferkammer (TransBlot)	BioRad, München
Zellerntegerät (Combi Cell Harvester 7025)	Skraton, Lier, Norwegen

Verbrauchsmaterial:

8-Kammer-Objekträger (Chamber Slides)	Nunc, Wiesbaden
Chromatographie-Säulen Poly Prep	BioRad, München
Dialysierschläuche Visking	Roth, Karlsruhe
Dünnschichtchromatographieplatte (Polygram Sil G)	Macherey-Nagel, Düren
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Skraton, Lier, Norwegen
Fujichrome 64T Kunstlichtfilm	Fuji, Tokio, Japan
Gewebekulturschale (100 mm)	Costar, Bodenheim
Hyperfilm MP	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hybond N ⁺ Nylonmembran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Polystyren-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Bedford, USA
Protein A Sepharose® CL-4B	Pharmacia, Freiburg
StrataClean™ Resin	Stratagene, La Jolla, USA
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
Szintillationsflüssigkeit	Pachard, Holland
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb (70 µm)	Becton Dickinson, San Jose, USA

4 Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus „Maniatis et al.“ (1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (1992) abgeleitet.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Alle Zellen wurden bei 6 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen an den Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Alle Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert (120 °C; 1,4 bar; 20 min). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Plastik-Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen.

Die Suspensionszellen wurden zur Passage bei 170 g für 3 min pellettiert, in frischem Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach „Neubauer“ verwendet.

4.1.2 Einfrieren von Suspensionszelllinien

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden sie abzentrifugiert (170 g, 5 bis 10 min) und in kaltem Einfriermedium (RPMI mit 10 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert, so daß die Zellzahl 2-5 x 10⁶/ml betrug. Je 1,8 ml der Suspension wurden in Einfrierröhrchen verteilt und zum Abkühlen 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen langsam auf -77 °C (möglichst 1 °C/min) abgekühlt und nach ein paar Tagen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

4.1.3 Einfrieren von Blutlymphozyten (PBL)

Zum Einfrieren wurden 2 bis 20 x 10⁶ PBL in 0,9 ml eiskaltem FCS aufgenommen und in ein auf Eis stehendes Einfrierröhrchen überführt. Danach wurden 0,9 ml kaltes FCS mit 20 % DMSO zugetropft. Erst direkt vor dem Transfer in die -77 °C-Truhe wurde der Inhalt des Röhrchens durch mehrmaliges Schütteln gemischt.

4.1.4 Auftauen von Suspensionszelllinien

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen sehr schnell im 37 °C Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 170 g zentrifugiert und mit 10 ml PBS gewaschen, um das DMSO aus dem Einfriermedium zu beseitigen. Die Zellen wurden dann in geeigneter Verdünnung mit frischem Kulturmedium auf Zellkulturgefäße verteilt und kultiviert.

4.1.5 Auftauen von Blutlymphozyten

Zum Auftauen wurden die Zellen sehr schnell im 37 °C Wasserbad erwärmt, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 ml eiskaltes Waschmedium wurde zugegeben. Danach wurden weitere 20 ml Waschmedium schnell zugegeben und die Suspension durchgemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 250 g und 4 °C wurden die Zellen nochmals mit 20 ml Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden 5×10^6 Zellen/ml Medium in Zellkulturflaschen ausgesät.

4.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl

Ein Aliquot aus einer homogen resuspendierten Zellsuspension wurde mit einem definierten Volumen Trypanblaulösung vermischt. Aus dieser Mischung wurde ein Aliquot in eine Neubauer Zählkammer übertragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden die lebenden, d.h. ungefärbten Zellen gezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bei der Herstellung der Trypanblaususpension und der Konstanten der Zählkammer ($\times 10^4$) ließ sich der Zelltitel (Zellzahl/ml) bestimmen.

4.2 Immunologische Methoden

4.2.1 Isolierung von murinen T-Zellen aus Lymphknoten

Um die Signalübertragung von CD44 in murinen T-Zellen zu untersuchen, mußten zunächst aus den Lymphknotenzellen Antigen-präsentierende Zellen (z.B. B-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen) abgetrennt werden. Für die Isolierung von murinen T-Zellen aus Lymphknoten gibt es verschiedene Protokolle. Zu Beginn der Arbeit wurden einige von ihnen ausgetestet, die besten Ergebnisse konnten mit der hier beschriebenen Aufreinigungsmethode erzielt werden. Als ausschlaggebendes Kriterium für die Reinheit der T-Lymphozyten wurde eine FACS-Analyse vorgenommen. Es wurden Mäuse des BALB/c-Mausstamms ausgewählt, weil sie das Oberflächenmolekül CD44 auf T-Zellen relativ stark exprimieren (Lynch und Ceredig, 1989).

Murine B-Lymphozyten binden über den Fc-Rezeptor an IgG1-Antikörper, und Monozyten adhären an Plastik. Diese Eigenschaften der beiden Zellpopulationen konnten ausgenutzt werden, um aus Lymphknotenzellen T-Zellen abzutrennen (negative Selektion).

Folgende Lymphknoten von Balb/c Mäusen wurden in Kulturmedium gesammelt: *Lymphocentrum (lc.) mandibulare*, *lc. cervicale superficiale*, *Noduli lymphatici (lnn.) axillares proprii*, *lnn. iliaci mediales*, *lc. inguinofemorale*, *lc. popliteum*, *lc. mesenterium craniale*.

Die Lymphknoten wurden mit Kulturmedium behutsam durch Zellsiebe passagiert um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 5 ml ACK-Lysepuffer zugegeben und für 4 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen (10 min bei 250 g zentrifugiert). Die Ausbeute betrug $2-1,5 \times 10^7$ Lymphknotenzellen pro Balb/c Maus.

Vorbereitung der Zellkulturschalen zum Koppeln (panning) der B-Zellen:

Es wurden 10 µg/ml Ziege Anti-Maus-Antikörper (IgM+IgG+IgA) in 5 ml PBS in einer Zellkulturschale (10 cm, Costar) für 3 Stunden bei RT inkubiert. Die Antikörper binden in dieser Zeit an das Plastik. Ungebundene Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen der Zellkulturschale mit jeweils 10 ml PBS entfernt und direkt zur Koppelung der T-Zellen eingesetzt.

Durchführung der Kopplung und zugleich Abtrennung der Monozyten durch Adhärenz:

$4,5-6 \times 10^7$ Lymphknotenzellen wurden in 4 ml Kulturmedium resuspendiert und in der zuvor mit Maus-Antikörpern (IgM+IgG+IgA) gekoppelten Zellkulturschale eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Hierbei binden B-Lymphozyten an die an IgG1-Antikörper. Zusätzlich haften vor allem Vorläufer von dendritischen Zellen und Monozyten an der Plastikplatte, während T-Lymphozyten im Überstand bleiben. Die nicht am Plastik adhärenen Zellen ($5,5-3,5 \times 10^7$ Zellen) wurden entnommen und 10 min bei 250 g zentrifugiert. Die T-Zellen wurden danach noch einmal mit je 15 ml Waschmedium gewaschen, und in 4 ml Kulturmedium aufgenommen, bevor die Kopplung ein zweites Mal durchgeführt wurde. Nach der zweiten Koppelung inkubierten die T-Zellen über Nacht in Kulturmedium bei RT. Die Ausbeute betrug 1,0-1,5 x 10^7 T-Zellen pro Balb/c Maus. Zur Kontrolle der Reinheit wurden die T-Zellen einer FACS-Analyse (Abschnitt 4.2.8) unterzogen, in der die Zellen mit Antikörpern gegen den spezifischen T-Zell-Marker CD3 gefärbt wurden. CD3 ist ein mit dem T-Zell Rezeptor assoziierter Komplex, der nur auf T-Lymphozyten beobachtet wird (Weiss et al., 1986). Daher ist der Anteil CD3-positiver Zellen bei der Durchflußzytometrie ein direktes Maß für die Reinheit der T-Zell-Population. Diese lag in jedem Fall zwischen 95-99 %. Die murinen T-Zellen wurden danach in IL-2-ELISAs, Proliferationstests oder biochemischen Analysen verwendet.

4.2.2 Isolierung von humanen Blutlymphozyten aus Leukozytenkonzentraten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (verändert nach Reinherz et al., 1979)

Leukozytenkonzentrate bestehen aus Leukozyten, die aus humanem Blut isoliert wurden. Das Leukozytenkonzentrat („buffy coat“) wurde in Fraktionen zu je 15 ml aufgeteilt und jeweils mit 35 ml Waschmedium gemischt. In einem 50 ml Röhrchen wurden 15 ml Ficoll-Paque vorgelegt und das Leukozytenkonzentrat wurde behutsam über den Rand des Röhrchens zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min mit 700 g bei RT ohne Bremse zentrifugiert.

Während der Zentrifugation passieren die Erythrozyten und Granulozyten die Ficollschicht und bilden ein Zellsediment. T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen/Monozyten sammeln sich dagegen in einer Schicht über dem Ficollkissen an und können mit einer Pipette abgenommen werden.

Die geernteten PBL wurden anschließend noch dreimal gewaschen (das erste Mal wurde mit 700 g zentrifugiert, dann nur noch mit 250 g), um Ficoll-Rückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen in einer 1:10 Verdünnung mit 3 %-iger Essigsäure gezählt und in Aliquots von 2 bis 20×10^6 PBL bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Ausbeute betrug $4-6 \times 10^8$ PBL pro (75 ml) Leukozytenkonzentrat.

4.2.3 Aufreinigung von humanen T-Zellen

Humane T-Lymphozyten bilden mit Schafserythrozyten Rosetten, und Monozyten adhäreren an Plastik. Diese Eigenschaften der beiden Zellpopulationen konnten ausgenutzt werden, um aus PBL T-Zellen aufzureinigen.

Abtrennung der Monozyten durch Adhärenz:

Die Abtrennung der Monozyten mußte vorgenommen werden, da sie professionelle antigen-präsentierende Zellen sind um eine Voraktivierung der T-Zellen durch diese Zellen zu verhindern.

4-6 x 10⁸ PBL wurden in 15 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (150 cm²) zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Hierbei haften vor allem Vorläufer von dendritischen Zellen und Monozyten auf dem Plastik, während Lymphozyten im Überstand bleiben. Die nicht am Plastik adhärenen Zellen (1,5-3 x 10⁸ Zellen) wurden entnommen, 10 min bei 250 g zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert (5 x 10⁶/ml) und dann für die Rosettierung mit Schafserythrozyten verwendet.

Vorbereitung der Schafserythrozyten zur Rosettierung der T-Zellen:

Es wurden 2 ml einer konzentrierten Schafserythrozyten-Lösung dreimal mit 20 ml Waschmedium gewaschen (250 g, 4 °C, Omnifuge). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Schafserythrozyten (SRBC)-Sediment im 20-fachen Volumen Kulturmedium resuspendiert (normalerweise 2 ml SRBC-Sediment *ad* 40 ml Medium). Diese 5%-ige Schafserythrozyten-Suspension konnte zur Rosettierung der T-Zellen eingesetzt oder bis zu 7 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Durchführung der Rosettierung:

5 x 10⁷ nicht-adhärenente PBL wurden in 15 ml Kulturmedium resuspendiert, mit 1,5 ml der 5 %-igen SRBC-Lösung vermischt und 5 min bei 70 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde, ohne den Überstand abzunehmen, für 45 min bei RT inkubiert und anschließend sehr vorsichtig vollständig resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 15 ml Ficoll-Paque unterschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 20 min bei 130 g und dann 10 min bei 475 g bei RT ohne Bremse. Die Interphase des Dichtegradienten enthielt die als E-negative-Zellen bezeichnete, angereicherte B-Zellfraktion.

T-Zellen, die mit den SRBC Rosetten gebildet hatten, waren im Sediment des Gradienten enthalten. Sie werden als E-positive-Zellen bezeichnet. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 15 ml ACK-Lysepuffer zu den T-Zell-Erythrozyten-Rosetten gegeben und für 4 min bei RT inkubiert. Die T-Zellen wurden danach noch zweimal mit je 15 ml Waschmedium gewaschen, bevor die Rosettierung ein zweites Mal durchgeführt wurde. Nach der zweiten Rosettierung wurden die T-Zellen über Nacht in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Die Ausbeute betrug 5-15 x 10⁸ T-Zellen pro (75 ml) Leukozytenkonzentrat. Die Reinheit der Aufreinigung lag typischerweise 95-97 % und wurde mittels Durchflußzytometrie ermittelt (Abschnitt 4.2.8). Die humanen T-Zellen wurden danach in Proliferationstests oder biochemischen Analysen verwendet.

4.2.4 Lichtmikroskopische Analyse

Primäre humane T-Zellen wurden in sterilen 8-Kammer-Objektträgern mit verschiedenen Antikörpern (CD3ε-Antikörper OKT3, CD44-Antikörper J-173 und D2.1) in unterschiedlichen Konzentrationen (suboptimale Anti-CD3 Konzentration 5 µg/ml; Anti-CD44 Konzentration 20 µg/ml) 72 Stunden kultiviert, bevor sie für eine Trypanblaufärbung verwendet wurden. Die Zellen wurden vor der Färbung einmal mit 500 µl PBS gespült. Dann wurden die Zellen in 100 µl der Trypanblaulösung aufgenommen. Die Zellen wurden schließlich in kaltem (-20 °C) Methanol/Essigsäure (19:1) bei RT für 15 min fixiert, mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Präparate wurden danach mit Deckgläsern versehen und bei zweihundertfacher Gesamtvergrößerung photographiert.

4.2.5 Nachweis der Interleukin-2 Sekretion mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)

Stimulierung von murinen T-Zellen mit Antikörpern:

Die Interleukin-2 (IL-2) Sekretion von T-Zellen in das Zellkulturmedium nach Antikörperstimulation wurde durch einen Sandwich-ELISA entsprechend dem Herstellerprotokoll (Abschnitt 3.5) quantitativ bestimmt.

Die Testansätze wurden in Triplikaten im entsprechenden Kulturmedium (200 µl) in 96-Loch Rundbodenplatten durchgeführt. Die Vertiefungen der 96-Loch Platte wurden z.T. mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C beschichtet. Sie wurden dann fünf Mal mit PBS gewaschen. Es wurden 1×10^6 murine T-Zellen pro Vertiefung mit verschiedenen Antikörperstimuli (20 µg/ml der CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81 (Fab')₂, R7166.7 bzw. IRAWB14 in Kombination mit 10 µg/ml des CD3-Antikörpers) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Als Negativkontrollen wurden die zu testenden T-Lymphozyten nur in Kulturmedium kultiviert. Positivkontrollen enthielten nur CD3-Antikörper, um den Effekt der Inhibierung der IL-2 Produktion mit den CD44-Antikörper quantifizieren zu können. Der Ansatz wurde 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA's bestimmt.

Bestimmung der IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulierung mit CD3-Antikörpern bzw. Blockierung mit verschiedenen CD44-Antikörpern:

Hierzu wurde in jede Vertiefung, der mit einem monoklonalen IL-2-Antikörper vorgekoppelten 96-Loch Platte, 50 µl Platten-Reagenz gegeben, um die Antikörper zu aktivieren. Die Zellkulturüberstände oder rekombinante murine IL-2 Standards (50 µl) wurden zugegeben und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Matrix wurde nach Ausbildung des Antikörper-Antigen-Komplexes fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Das gebundene IL-2 ließ sich durch einen zweiten, mit einem Enzym markierten IL-2-Antikörper nachweisen, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist. Hierzu wurde die Platte mit 100 µl Konjugat Reagenz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und intensiv gewaschen. Die Zugabe von TMB Substrat Lösung (100 µl) für 30 min bei RT im Dunkeln führte zur enzymkatalysierten Farbreaktion (gelb).

Hierbei gilt, daß die Intensität der Gelbfärbung innerhalb bestimmter Grenzen proportional zur IL-2-Konzentration ist.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stop-Lösung (100 µl) beendet. Dann wurde die Absorption der Platte bei 450 nm und 550 nm gemessen. Die Subtraktion der Werte, gemessen bei 450 nm und 550 nm, ermöglicht mit Hilfe der bekannten rekombinanten murinen IL-2 Standard Konzentration (mittels einer Eichgerade) die Berechnung der IL-2 Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Nachweisgrenze des Tests war kleiner als 3 pg/ml murines IL-2.

4.2.6 Statistische Auswertung der Daten

Arithmetisches Mittel:
$$x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Parameter:
$$t_o = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 * N_2} \cdot \frac{(N_1 - 1) \cdot s_1^2 + (N_2 - 1) \cdot s_2^2}{(N_1 - 1) + (N_2 - 1)}}} \quad (3)$$

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den durchschnittlichen IL-2 Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurde mit dem Student's Test berechnet (Brandt, 1970; Altman, 1991). Der Student's Test vergleicht zwei Stichproben, ob sie mit der Hypothese verträglich sind, aus einer Grundgesamtheit mit dem gleichen Mittelwert zu stammen. Die Rechnung (Gleichung 3) liefert einen Parameter t_o , der vom Umfang der beiden Stichproben (N_1, N_2) sowie von ihren jeweiligen Mittelwerten (x_1, x_2 ; Gleichung 1) und Standardabweichungen (s_1, s_2 ; Gleichung 2) abhängt. Dieses t_o vergleicht man nun mit einem tabellierten Wert t_α , der wiederum von der Anzahl der Freiheitsgrade $f = N_1 + N_2 - 2$ und dem gewünschten Signifikanzniveau abhängt. Ist $t_o > t_\alpha$, so sind x_1 und x_2 mit dem Signifikanzniveau P verschieden.

4.2.7 Ermittlung der Proliferation von T-Zellen

Stimulierung von humanen oder murinen T-Zellen mit Antikörpern und Interleukinen:

Die Proliferation von T-Zellen nach Antikörperstimulation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zell-DNS bestimmt. Dazu wurden 5×10^5 humane T-Zellen oder 1×10^6 murine T-Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch Platte mit verschiedenen Antikörperstimuli in unterschiedlichen Konzentrationen (20 µg/ml der CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81

(Fab')₂, R7166.7 bzw. IRAWB14 in Kombination mit 10 µg/ml des CD3ε-Antikörpers 1452C11 bei murinen T-Zellen und 20 µg/ml der CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 in Kombination mit 5 µg/ml des CD3ε-Antikörpers OKT3 bei humanen T-Zellen) inkubiert. Die Vertiefungen der 96-Loch Platte wurden z.T. mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C beschichtet. Sie wurden dann fünf Mal mit PBS gewaschen. Die Testansätze wurden in Triplicaten im entsprechenden Kulturmedium (200 µl) in 96-Loch Rundbodenplatten durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden die zu testenden T-Lymphozyten nur in Kulturmedium kultiviert. Positivkontrollen enthielten CD3-Antikörper (humane T-Zellen) oder CD3-Antikörper und konditioniertes murines IL-2 Medium (0,3 %; Abschnitt 3.5). Am Tag 3 nach Ansatz der Tests wurden jeder Vertiefung 18,5 kBq ³H-Thymidin zugegeben und die Kulturen anschließend nochmals 4,5 Stunden inkubiert. Die Zell-DNS wurde dann mit einem Zell-Erntegerät auf Filterpapier übertragen, wobei nicht eingebautes ³H-Thymidin abgetrennt wurde. Die Filterpapiere wurden in einem Szintillationsmeßgerät nach Zugabe von 3 ml Szintillatorflüssigkeit gemessen (Counts per minute (cpm)).

4.2.8 Behandlung von Zellen mit Induktoren

Vor der Behandlung von Zellen (primären murinen T-Zellen oder LB17-Zellen) mit 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) und Ionomycin oder mit IL-2 wurden die Zellen einmal mit warmem Kulturmedium gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen und IL-2 bzw. TPA wurden direkt aus konzentrierten Stammlösungen ins Medium pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für die entsprechenden Inkubationszeiten bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert.

Für bestimmte Versuche wurden die Zellen für 12 Stunden in serumfreiem Medium gehungert. Dies sollte vermeiden, daß Serum-Komponenten zur Rezeptor-Stimulation führen.

4.2.9 Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflußzytometrie

Indirekte Einfarbenfluoreszenzfärbungen:

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie die Wellenlängen des von ihnen emittierten Fluoreszenzlichts und die Bezeichnungen, unter denen sie in der Auswertung aufgeführt wurden. Die Anregungswellenlänge war 488 nm.

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Emittierte Wellenlänge	Bezeichnung
Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)	530 ± 30 nm (grüne Fl.)	Fluoreszenz 1 (Fl. 1)
Phycoerythrin (PE)	575 ± 26 nm (rote Fl.)	Fluoreszenz 2 (Fl. 2)
Propidiumiodid (PI)	575 ± 26 nm (rote Fl.)	Fluoreszenz 2 (Fl. 2) und Fluoreszenz 3-1 (Fl. 3-1)
Cy-Chrome	660 ± 20 nm (blaue Fl.)	Fluoreszenz 3-1 (Fl. 3-1)

Färbung von Zellen für die Durchflußzytometrie:

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Anzahl der zu färbenden Zellen schwankte je nach Ansatz zwischen 10^5 und 10^6 Zellen pro Färbung. Suspensionszellen (primäre T- und LB17 -Zellen) konnten nach dem Waschen in PBS direkt gefärbt werden. Die Zellen wurden pro Ansatz in 1 ml FACS-Medium (Abschnitt 3.4) resuspendiert, abzentrifugiert (3 min, 800 g) und nach der Entfernung des Überstands in 50 μ l unverdünntem Hybridomüberstand oder gereinigtem Erstantikörper (1-10 μ g/ml; vgl. Abschnitt 3.3 Tabelle 2a) in geeigneter Verdünnung in FACS-Medium aufgenommen. Zur Blockierung der Bindung von FITC-Hyaluronsäure an das Oberflächenantigen CD44 wurden 100 μ g/ml des CD44-Antikörpers KM81 für 15 min vor Zugabe von Hyaluronsäure zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min bei 4 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit FACS-Medium gewaschen (3 min, 800 g) bevor sie in 50 μ l der Zweitantikörperlösung (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in FACS-Medium; Abschnitt 3.3 Tabelle 2b) resuspendiert wurden. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min bei 4 °C und drei Waschschritten (wie oben beschrieben), fand die Messung im Durchflußzytometer in 0,2 ml FACS-Medium, dem z.T. Propidiumiodid (1 μ g/ml) zugefügt wurde, statt. In einigen Fällen wurden die Zellen in 0,2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und konnten so bis zu drei Tage nach der Färbung noch analysiert werden.

Durchflußzytometrie:

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen fanden an einem Durchflußzytometer (ausgestattet mit einem 50/135 mW Enterprise Laser) statt.

Zur Erfassung der abgestorbenen Zellen wurde den Zellsuspensionen z.T. vor der Messung Propidiumiodid zugegeben. Da sich Propidiumiodid selektiv im Zytoplasma toter Zellen anreichert, fallen abgestorbene Zellen durch ihre dunkelrote Fluoreszenz auf und können so von lebenden Zellen unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“, FSC) diene als Maß für die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht („Sideward Scatter“, SSC) diene als Maß für die Granularität der Zellen. Anschließend wurden die Intensitäten der relativen Fluoreszenz gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand von Histogramm-Plots und zweidimensionalen Dot-, Kontur-Plots (Software: Lysis II). Dabei wird der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Populationen statistisch ausgewertet und die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität verschiedener Populationen bestimmt.

4.2.10 Kopplung von Fluoreszinisothiocyanat (FITC) an Hyaluronsäure (De Belder und Wik, 1975)

Es wurden 200 mg Hyaluronsäure (aus dem Hahnenkamm) in 40 ml Formamid während 12-24 Stunden bei RT langsam gelöst. DMSO (50 ml), Natriumhydrogencarbonat (0,1 g), Dibutylzinndilaurat (0,1 g) und Fluoreszinisothiocyanat (0,3 g) wurden zugegeben und für 30 min bei 100 °C gerührt. Der Ansatz wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und mit zwei Liter Ethanol und 100-200 μ l gesättigter NaCl-Lösung gefällt. Das gelartige Hyaluronsäuresediment wurde mit einem Glasstab entfernt und 3-4 mal erneut mit Ethanol/NaCl gefällt, um ungebundenes Fluoreszin zu entfernen. Zur Überprüfung der Reinheit wurden je 20 μ l vom

Endprodukt und von einer der ersten Waschfraktionen, als Kontrolle, auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in Chloroform-Methanol (3:1) für 1 Stunde bei RT im Dunkeln. Danach wurde unter UV-Licht getestet, ob sich noch schnellbewegliche, freie fluoreszierende Substanzen im Endprodukt befanden. Wenn dies der Fall war, wurden die Waschschrte wiederholt. Die aufgereinigte FITC-Hyaluronsäure wurde im Dunkeln unter dem Abzug für 1-2 Stunden getrocknet, in PBS gelöst und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die optimale Verdünnung für die Fluoreszenzfärbung von Zellen wurde in einer Immunfluoreszenzfärbung ermittelt.

4.3 Protein-Methoden

4.3.1 Herstellung einer Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)-Stammlösung (Krypta et al., 1988)

Um die Dephosphorylierung von Proteinen zu verhindern, wurde Natriumorthovanadat als Tyrosinphosphatase-Hemmer mit einer Konzentration von 1-3 mM bei der Präparation von Proteinextrakten verwendet. Dieser Hemmer komplexiert mit der Phosphatase in ihrem aktiven Zentrum und verhindert so Bindung des eigentlichen Substrats Phospho-Aminosäure. Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 0,183 g Na_3VO_4 (100 mM) eingewogen und in 10 ml Wasser gelöst. Mit 80 μl 37 % HCl wurde ein pH von 10 eingestellt, wobei sich die Lösung gelb färbte. Die Lösung wurde anschließend gekocht bis sie farblos war und der pH-Wert wurde nach Abkühlen auf RT kontrolliert. Die Lösung ist bei Lagerung bei + 4 °C etwa 4 Wochen verwendbar.

4.3.2 Aktivierung der T-Zellen

Die T-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Inhibitoren von Signalübertragungsproteinen wie PD98059 (f.c. 50 μM), SB203580 (f.c. 50 μM) und Wortmannin (f.c. 1 μM) wurden 15 min vor Zugabe der Antikörper bei 37 °C in PBS inkubiert. Anschließend wurden murine T-Zellen mit 10-20 $\mu\text{g/ml}$ Erstantikörper (CD3-Antikörper 145-2C11 und/oder CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81 (Fab')₂, R7166.7, IRAWB14 bzw. 1.1ASML), 150-500 $\mu\text{g/ml}$ Hyaluronsäure oder Concanavalin A (10 $\mu\text{g/ml}$) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ Zweitantikörper für 2,5 min bei 37 °C in 50 μl PBS inkubiert. Zur Vernetzung der CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81 (Fab')₂, R7166.7, IRAWB14 wurde ein Ratte-Antikörper verwendet, da diese aus der Ratte isoliert worden waren. Zur Vernetzung von 1.1ASML wurde ein Maus-Antikörper verwendet, da dieser aus der Maus isoliert worden war.

Humane T-Zellen wurden mit 10-20 $\mu\text{g/ml}$ Erstantikörper (CD3 ϵ -Antikörper OKT3, CD44-Antikörper J-173 bzw. D2.1 oder eine Kombination der CD2-Antikörper AICD.M1, AICD.M2 und 3PT; alle aus der Maus) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A für 5 min bei 37 °C inkubiert. Mit Ausnahme der CD2-Antikörper-Ansatzes wurden die Zellen nach Erstantikörperstimulation abzentrifugiert, in 50 $\mu\text{g/ml}$ Zweitantikörper (Maus-Antikörper) aufgenommen und für 2 min bei 37 °C inkubiert.

4.3.3 Präparation von Zytoplasmaextrakten (Taher et al., 1996)

Die Aktivierung der T-Zellen wurde durch die Zugabe von eiskaltem, vierfach konzentriertem Protein-Extraktionspuffer (Abschnitt 3.4) beendet. Die Zellen wurden 30 min auf Eis lysiert. Durch NP-40 im Proteinextraktionspuffer wird die Zellmembran lysiert, die Kernmembran bleibt aber intakt. Unlösliches Kernmaterial wurde durch die Zentrifugation bei 13000 g bei 4 °C für 20 min pelletiert. Die klaren Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte wurden durch Western-Blot Analyse, Ionenaustauschersäule bzw. Immunpräzipitation und anschließender Proteingelelektrophorese untersucht.

4.3.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Mittels Immunpräzipitation (IP) kann ein spezifisches Antigen aus einem Proteingemisch isoliert werden. Die löslichen Proteine im Proteinextraktionspuffer (siehe Präparation von Zytoplasmaextrakten: 4.3.3) wurden einer IP unterzogen. Hierzu wurde die zytoplasmatische Fraktion von $0,2-7 \times 10^8$ stimulierten oder unstimulierten Zellen verwendet. Sie wurde mit Proteinextraktionspuffer auf 500 µl aufgefüllt. 50 µl dieser Fraktion wurden mit 25 µl 3 x Protein-Probenpuffer gemischt und als spätere Totallysat-Kontrolle bei -20°C aufgehoben. Der Rest des Überstands wurde zum Blockieren unspezifischer Bindestellen in Gegenwart von 30 µl Protein A-Agarose bei der Verwendung von polyklonalem Serum oder Protein G-Plus Agarose bei monoklonalen Antikörpern für 1 h im Kühlraum bei 4 °C im Drehschüttler rotiert („preclearing“). Die Immunpräzipitation erfolgte im „Batch-Verfahren“. Dazu wurden der Überstand mit 3-5 µl polyklonalem Antiserum oder 0,5-1 µg des entsprechenden monoklonalen Antikörpers versetzt. Die Ansätze wurden für eine Stunde bis über Nacht bei 4 °C rotiert. Danach wurden 30 µl Protein A-Agarose oder 30 µl Protein G-Plus Agarose (entsprechend dem Antikörper) zugegeben und für 2-3 h im Kühlraum gerollt.

Eine zweite Koppelungsmöglichkeit wurde benutzt, bei der zuerst der Antikörper mit der Protein A-Agarose oder Protein G-Plus-Agarose zwei Stunden bei RT inkubiert wurde und dann nach drei Waschschritten mit 1 ml Proteinextraktionspuffer mit dem Antigen und 500 µl Proteinextraktionspuffer für eine Stunde bis über Nacht bei 4 °C gerollt wurde.

Die beiden Reihenfolgen der Kopplungsschritte zur Bindung von Protein-A/G-Agarose-Antikörper-Antigen waren gleichwertig.

Im Fall der Verwendung von Phospho-Tyrosin-Antikörpern (10-20 µg/ml; Phospho-Tyrosin Agarose) wurde auf die Agarose-Zugabe verzichtet, da der Antikörper bereits kovalent an die Agarose gebunden ist. Auf den „Preclearing“ Schritt wurde bei geringen Zellzahlen ($2-5 \times 10^7$ Zellen) ebenfalls verzichtet. Bei höheren Zellzahlen wurden zwei „Preclearing“ Schritte mit Streptavidin-Agarose (30 µl) für jeweils eine Stunde durchgeführt. Die an die Agarose gekoppelten Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (2 min bei 13.000 g) pelletiert und dreimal mit je 1 ml eiskaltem Proteinextraktionspuffer und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Überstand der IP - vor dem ersten Waschschriff - wurden abgenommen und nach Zugabe von 120 µl 5x Protein-Probenpuffer als spätere Kontrolle der IP bei -20 °C aufgehoben. Nach dem letzten Waschen wurde die Agarose mit Hilfe einer Kanüle trocken gesaugt und in 45 µl 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Probe wurde vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel je zweimal für 5 min aufgekocht, kurz gemischt und abzentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden, mit Ausnahme von kovalent an

die Agarose gekoppelter Antikörper, Antigen und Antikörper von der Agarose abgekoppelt und denaturiert. Das Proteingel wurde entweder einer Western Blot Analyse oder direkt einer Silberfärbung unterzogen.

4.3.5 Aufreinigung von Proteinen durch Ionenaustauschersäulen

Zur Aufreinigung des Tyrosin-phosphorylierten 84 kDa Proteins wurden die Proteinextrakte lysierter T-Zellen (siehe Präparation von Zytoplasmaextrakten: 4.3.3) mittels Ionenaustauscherchromatographie (HiTrap IEX Test Kit) aufgetrennt. Proteine werden bei diesem Verfahren aufgrund ihrer Nettoladung getrennt. Der isoelektrische Punkt (IEP) dieses Proteins war mittels 2D-Elektrophorese bestimmt worden und betrug pH 7,5. Die Puffer- und pH-Bedingungen für die Ionenaustauschersäulen wurden aufgrund dieses IEP ausgewählt. Die Ionenaustauschersäulen wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll zuerst mit 5 ml Startpuffer (CM - bzw. SP - Sepharose Säulen mit 50 mM Natriumacetat pH 5; Q - bzw. DEAE - Sepharose Säulen mit 20 mM Diethanolamin pH 9), gefolgt von 7 ml Elutionspuffer (Startpuffer mit 1 M NaCl) gewaschen und mit 10 ml Startpuffer äquilibriert. Die Proteine im Proteinextraktionspuffer wurden auf die Säule aufgetragen und die Säule wurde mit 10 ml Startpuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Gebundene Proteine wurden mit 3 ml Elutionspuffer eluiert und in 450 μ l Fraktionen gesammelt. Die im Elutionspuffer gelösten Proteine wurden vor der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgelen mit 50 μ l (1M) Tris/HCl-Puffer pH 7 neutralisiert und entweder einer Immunpräzipitation (siehe Immunpräzipitation von Proteinen: 4.3.4) oder einer Konzentrierung mit StrataCleanTM Resin unterzogen. Zu letzterem wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll 5 μ l StrataCleanTM Resin zu den Fraktionen gegeben. Die Ansätze wurden 2 min gemischt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 45 μ l 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Probe wurde vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel je zweimal für 5 min aufgeköcht, kurz gemischt und abzentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden die Proteine vom StrataCleanTM Resin abgekoppelt und denaturiert. Das Proteingel wurde entweder einer Western Blot Analyse unterzogen oder direkt mit Silber gefärbt. Die Säulen wurden mit 7 ml Elutionspuffer, gefolgt von 10 ml Startpuffer regeneriert und mit 5 ml 20 % -igem Ethanol gewaschen. Die Säulen wurden in 20 % -igem Ethanol gelagert.

4.3.6 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen findet aufgrund ihrer relativen Molekülmasse statt. Die Proteine wandern bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) zuerst durch ein Sammelgel und dann durch ein Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine aufgrund des pH-Wertes und der geringeren Polyacrylamidkonzentration fokussiert, um eine gute Auftrennung auch größerer Probenvolumina im nachfolgenden Trenngel zu ermöglichen. Dort werden sie aufgrund des Molekularsiebeffekts ihrer Molekülmasse nach aufgetrennt.

Zuerst wurden zwei mit Ethanol gesäuberte Gelplatten (Gelmaße 16 x 14 cm) mit 1 mm dicken Abstandshaltern mit Hilfe von Federblechklammern zusammengesetzt und mit 1,5 % Agarose abgedichtet. Zwischen die Glasplatten wurde das Trenngel gegossen, so daß noch

3 cm Höhe für das Sammelgel blieben. Die Trenngele wurden, wie in Tabelle 4 angegeben, angesetzt. Das Trenngel wurde während des Polymerisationsvorgangs in vertikaler Lage mit Propanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Propanol abgegossen, mit Wasser nachgespült und die Sammelgel-Lösung (4,9 % Acrylamid; 0,13 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) direkt auf das Trenngel gegossen. Der Geltaschenformer (Kamm) wurde sofort eingesetzt.

Zur Auftrennung von Proteinen um 20 kDa wurden Trenngele von 12 % -igem Acrylamid verwendet. Für die Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung wurde i.A. ein 8 % -iges Trenngel gegossen.

Anschließend wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Puffer-Reservoirs mit Protein-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proteinproben wurden zum Denaturieren 5 min in Protein-Probenpuffer gekocht, anschließend kurz zentrifugiert und 35 µl/Tasche mit einer 100 µl-Hamilton Glasspritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel einer Silberfärbung unterzogen, photographiert oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Western-Blot).

Tabelle 4: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Trenngel	20 ml 6,5 %	20 ml 8 %	20 ml 12 %	20 ml 13 %
Gelstock 30 *	4,3 ml	5,3 ml	6,6 ml	8,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
20 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	10,3 ml	9,3 ml	6,6 ml	5,9 ml
10 % APS **	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	0,015 ml	0,012 ml	0,008 ml	0,008 ml

* Gelstock 30: Acrylamid 30 % / N,N'-Methylenbisacrylamid 0,8 % (Rotiphorese 30, Roth, Karlsruhe)

** APS: Ammoniumpersulfat

4.3.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975)

Zur Charakterisierung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurde eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist aufgrund ihrer hohen Auflösung ein hervorragendes Verfahren zur Unterscheidung kleinster Proteinmengen. Die erste Dimension entspricht einer isoelektrischen Fokussierung (IEF). Die Proteine werden hierbei entsprechend ihrem isoelektrischem Punkt aufgetrennt, also aufgrund des pH-Wertes, bei dem die Nettoladung eines Moleküls gleich Null ist. Senkrecht dazu schließt sich in der zweiten Dimension eine SDS-Gelelektrophorese an, die eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erzielt.

Zur Isoelektrischen Fokussierung wurden 10 mit Ethanol gesäuberte Glasröhrchen (Gelmaße: 16 x 2 cm) mit Parafilm am unteren Ende abgedichtet. In die Glasröhrchen wurde das Polyacrylamidgel gegossen, so daß noch 1 cm Höhe für die Probe blieben. Die Gele wurden wie in der Tabelle 5 angegeben angesetzt.

Das Gel wurde während des Polymerisationsvorganges in vertikaler Lage mit 8 M Harnstoff überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde der Harnstoff mit einer Hamilton Glasspritze abgenommen und der Parafilm durch Mull ersetzt. Anschließend wurde die Glasröhrchen in eine 2 D Gelelektrophorese GT3-Elektrophorese-Kammer eingespannt und das untere Reservoir mit Kathodenpuffer (20 mM Natronlauge), und das obere Reservoir mit Anodenpuffer (10 mM Phosphorsäure) gefüllt. Die Proteinproben wurden im Protein-Extraktionspuffer zum Denaturieren 2 min gekocht, anschließend kurz zentrifugiert und der Überstand in 2 D Puffer (1:1) verdünnt. Die Probe wurde dann mit 0,786 mg/ μ l Harnstoff (ultra pure) versetzt und 5 min bei 30 °C geschüttelt, bis der Harnstoff gelöst war. Der Ansatz wurde mit einer 100 μ l-Hamilton Glasspritze aufgetragen (in der Regel 70 μ l/Glasröhrchen) und mit 25 μ l Probenüberschichtungspuffer überschichtet. Die Proteine wurden bei 0,5 W aufgetrennt. Die Laufzeit der Fokussierung betrug insgesamt 17 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele bei – 20 °C gelagert.

Die zweite Dimension entsprach einer SDS-Gelelektrophorese, die in Abschnitt 4.3.6 beschrieben wurde. Hierzu wurden Polyacrylamidgele angefertigt. Für eine Analyse der Tyrosin-Phosphorylierungen wurden meistens 8 % -ige Trenngele gegossen. Die Sammelgele wurden ohne Geltaschenformer gegossen. Die Röhrchengele wurden zuerst 30 min in 2 x Protein-Probenpuffer dialysiert und dann einzeln, waagrecht auf einem Sammelgel mit einem auf 37 °C erwärmtem Gemisch aus 2 x Probenpuffer und 1,9 % -iger Agaroselösung (1:1) fixiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel nach Anfärbung der Proteine mit Silber photographiert oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Western-Blot).

Tabelle 5: Herstellung von Polyacrylamidröhrchengelen

10 Röhrchengele	
Harnstoff (ultra pure)	4,4 g
Gelstock (28,38:1,62)*	1,06 ml
NP-40	1,60 ml
H ₂ O	1,60 ml
Ampholyte pH 5-8	0,5 ml
10 % APS	0,020 ml
TEMED	0,011 ml

* Gelstock (28,38:1,62): Acrylamid 28,38 %/N,N'-Methylenbisacrylamid 1,62 %;

4.3.8 Silberfärbung von Proteingelen

Alle Arbeitsgänge wurden unter leichtem Schütteln bei RT ausgeführt. Das Proteingel wurde nach der Elektrophorese für eine Stunde bis über Nacht in 200 ml 50 % Methanol/ 12 % Essigsäure fixiert. Das Gel wurde dann zweimal für je 20 min in 30 % -igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Oberflächenbehandlung in 0,02 % -igem Natrium-Thiosulfat für 1 min. Das Gel wurde noch je dreimal für 30 Sekunden in Wasser gewaschen, in 0,2 % Silbernitrat / 0,03 % Formaldehyd für 20 min gefärbt und erneut zweimal in Wasser für 1 min gewaschen. Der Entwickler (6 % Natriumcarbonat, 0,02 % Natrium-Thiosulfat) wurde solange zugegeben, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Das Gel wurde noch zweimal für je 2 min in Wasser gewaschen und nach Photographierung in Fixierer aufbewahrt.

4.3.9 Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern ("Western-Blot")

Mit Hilfe der Western-Blot Analyse können Antigene, die in einem Proteingemisch vorhanden sind, durch an Antikörper gekoppelte Enzyme mit Hilfe einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Proteingemische in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Immobilon PVDF-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Die Membran wird mit dem spezifischen Antikörper inkubiert, so daß der Antikörper an das Antigen binden kann. Diese Immunkomplexe werden später mit enzymgekoppelten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. Die Zweitantikörper binden hierbei an die konstanten Ketten der Erstantikörper.

Mit Hilfe einer Naßtransferkammer wurden die Proteine aus dem Gel auf die PVDF ImmobilonTM-P Transfermembran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und auf drei Lagen „Whatman 3MM“-Papier gelegt, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren. Darauf wurde das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und von drei weiteren Lagen „Whatman 3MM“-Papier bedeckt. Diese Blotpackung wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blotzelle eingesetzt und die Elektroden so angelegt, daß die PVDF-Membran zum Pluspol der Spannungsquelle gerichtet war. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 250 mA im Kühlraum.

Nach erfolgtem Transfer wurde der Blot mit Ponceau-Proteinfärbelösung angefärbt und dadurch die transferierten Proteine sichtbar gemacht. Hierdurch konnte überprüft werden, ob gleiche Proteinmengen in den verschiedenen Ansätzen auf das Gel aufgetragen und auf die Membran übertragen worden waren. Die Ponceau Rot Färbung wurde mit PBS-Tween (PBST: PBS mit 0,16 % Tween-20) wieder entfernt.

Der Blot wurde mit 3 %-igem BSA in PBST unter ständigem Schwenken bei RT für zwei Stunden inkubiert, um unspezifischen Bindungsstellen auf dem Filter abzusättigen. Für die Bindung des primären Antikörpers an das zu detektierende Protein wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt, welche eine geeignete Verdünnung des Antikörpers (meist 1:1000) in 3 %-igem BSA in PBST enthielt und für zwei Stunden auf einer Wippe unter ständiger Bewegung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal in einem großen Volumen an PBST für je 7 min gewaschen und mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:1000) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Zur fluorographischen Detektion wurde die Membran fünfmal in PBST für je 7 min gewaschen, mit einer ECL-Lösung für 1 min bedeckt und je nach Signalstärke für Sekunden oder Minuten gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Röntgenfilme wurden mit einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

4.3.10 Behandlung der Membran zur Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“)

Die Membran wurde für 30 min bei 50 °C in Stripp-Puffer inkubiert und dann dreimal für 15 min bei RT in PBST (PBS mit 0,16 % Tween-20) gewaschen. Danach wurde mit Hilfe der fluorographische Detektion (ECL) überprüft, ob die Antikörper vollständig von der Membran entfernt worden waren.

4.3.11 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus dem Kulturüberstand von Hybridomzelllinien

Zellen von Hybridomzelllinien (IRAWB14, KM81 und R7166.7) wurden bis zur Erzielung von einem Liter Kulturüberstand kultiviert. Die Zellen wurden dann solange im gleichen Medium belassen (circa eine Woche), bis das Medium gelb war und ungefähr 60 % der Zellen abgestorben waren. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und 10 min bei 2000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann unter langsamem Rühren bei RT mit 313 g Ammoniumsulfat versetzt und über Nacht bei 4 °C gefällt. Das Präzipitat wurde 10 min mit 1600 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10 ml Dialysepuffer (150 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7) aufgenommen. Das Pellet wurde dann in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht bei 4 °C in zwei Liter Dialysierpuffer dialysiert. Der Ansatz wurde 30 min mit 7000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2,5 ml Protein-G-Plus Agarose versetzt und für 3 Stunden im Kühlraum im Drehschüttler rotiert, um eine Bindung der monoklonalen Antikörper an die Agarose zu ermöglichen. Danach wurde der Ansatz viermal mit je 40 ml Dialysepuffer gewaschen (1000 g, 5 min, Omnifuge). Die an die Protein-G-Plus Agarose gebundenen Antikörper wurden auf eine Chromatographie-Säule gegeben. Die Antikörper wurden mit 100 mM Glycin pH 2,5 von der Säule eluiert und mit 1 M Tris pH 9,6 neutralisiert. Es wurden 10 Fraktionen des Eluats gesammelt und im Photometer bei 280 nm vermessen. Fraktionen mit Extinktionswerten $E_{280 \text{ nm}}$ über 0,2 wurden vereinigt, in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht bei 4 °C in einem Liter PBS dialysiert. Der Ansatz wurde dann 10 min mit 8000 g zentrifugiert und der Überstand erneut im Photometer bei 280 nm vermessen, um die Konzentration des monoklonalen Antikörpers zu ermitteln. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1,35 bei 280 nm einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Die aufgereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

5 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Proteine, die an der Signalübertragung des Oberflächenproteins CD44 in T-Lymphozyten beteiligt sind. CD44 ist in eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie die Unterstützung des Anheftungsschritts (engl. „rolling“) im Verlauf der Auswanderung von Leukozyten von den Blutgefäßen in das Gewebe (DeGrendele et al., 1996; DeGrendele et al., 1997b; Estess et al., 1998), verwickelt. Die Wechselwirkung von aktivierten Lymphozyten mit Endothelzellen wird hierbei durch CD44 und seinem natürlichen Liganden Hyaluronsäure, welcher von Endothelzellen präsentiert wird, erzielt. Dieser Anheftungsschritt ist nur nach Aktivierung von Lymphozyten möglich, da diese die Hyaluronsäure-Bindung induziert (DeGrendele et al., 1997a). Lösliche Hyaluronsäure bzw. der CD44-Antikörper IM7 hemmen diesen Schritt. Die Wechselwirkung ist also CD44-spezifisch. Eine weitere Funktion als Adhäsionsmolekül in Lymphozyten ist die Unterstützung von Zellwanderungen wie die Wanderung von Lymphozyten vom Blutstrom zu Venolen mit hohem Endothel (Jalkanen et al., 1988).

Als Signalmolekül dient CD44 der Weiterleitung von Wachstumssignalen, die zur Zellaktivierung führen. So werden Gene für den Kolonie-stimulierenden Faktor für Makrophagen, Tumor-Nekrose Faktor- α , Interleukin-1 β und IGF-1 mRNA (für „insulin-like growth factor“) in anderen Zellen des Immunsystems wie Makrophagen nach Stimulierung von CD44 exprimiert (Webb et al., 1990; Gruber et al., 1992). Insbesondere während der T-Zellaktivierung ist die Signalübertragung *via* CD44 schon teilweise bekannt. Hyaluronsäure als ein natürlicher Stimulus wirkt in T-Zellen auf das T-Zellwachstum in Zusammenarbeit mit Antikörpern, die gegen das Oberflächenprotein CD3 gerichtet sind, oder Phorbolestern kostimulierend (Galandrini et al., 1994a). Die durch Hyaluronsäure induzierte Proliferation kann durch den CD44-Antikörper KM81 blockiert werden (Guo et al., 1993). Auch verschiedene CD44-Antikörper sind als aktivierende, koaktivierende oder inhibierende Signalauslöser, in T-Zellproliferations- oder Zytokinsekretionsexperimenten in humanen und murinen T-Lymphozyten beschrieben.

Die Familie der CD44-Proteine beinhaltet verschiedene CD44v-Isoformen. Nach T-Zellaktivierung mit CD3-Antikörpern kann eine Erhöhung der Expression von CD44v-Isoformen beobachtet werden (Arch et al., 1992). In der Ratte kann diese Aktivierung durch einen Antikörper, der gegen die variante Isoform CD44v6 gerichtet ist, inhibiert werden (Reber et al., 1990). Dies weist darauf hin, daß verschiedene CD44-Isoformen bei der Aktivierung von T-Zellen unterschiedliche Funktionen auf die Signalübertragung haben können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit aktivierende oder inhibierende Antikörper oder der Ligand Hyaluronsäure die Signalübertragung in T-Zellen beeinflussen. Dies wurde sowohl während einer Kostimulation mit CD3-Antikörpern als auch unabhängig von einem primären Stimulus untersucht.

5.1 Signalübertragung von CD44 in humanen T-Zellen

Die Signalübertragung von CD44 wurde zuerst in humanen T-Zellen mit aktivierenden CD44-Antikörpern stimuliert, da die Signalübermittlung im Menschen bereits am besten untersucht worden ist. Die Signalübertragung von CD44, welche durch den aktivierenden CD44-Antikörper J-173 induziert wird und zur Proliferation von ruhenden T-Zellen führt, verläuft über Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Sie kann z.B. durch Inhibitoren von Tyrosin-Kinasen gehemmt werden (Galandrini et al., 1993; Kelleher et al., 1995, Galandrini et al., 1996). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß dieser CD44-Antikörper in Kombination mit einem vernetzenden Zweitantikörper die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine in primären humanen T-Zellen induziert. Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht werden auch nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern phosphoryliert. Tatsächlich konnten einige dieser Proteine identifiziert werden: die PTK p56^{lck} (Lck), p59^{fyn} (Fyn) und ZAP-70 (Galandrini et al., 1993; Taher et al., 1996; Ilangumaran et al., 1998). Ein zweiter humaner CD44-Antikörper D2.1 aktiviert die T-Zell-Proliferation in der humanen T-Zelllinie HUT78 (Kelleher; persönliche Mitteilung). Die Wirkung, die D2.1 auf die Signalübertragung in primären T-Zellen hat, ist noch nicht bekannt, auch war D2.1 noch nicht in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten eingesetzt worden.

Neben der Fähigkeit die Tyrosin-Phosphorylierung zu induzieren, wurde zunächst die Wirkung von D2.1 und J-173 in Bezug auf die Proliferation von T-Zellen verglichen. Es sollte geklärt werden, ob D2.1 wie J-173 in der Lage ist, die Proliferation von ruhenden T-Zellen zu stimulieren, so wie das z.B. für einige Antikörper, welche CD3 erkennen, der Fall ist. Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst T-Lymphozyten aufgereinigt.

5.1.1 Isolierung und Reinheit von T-Zellen isoliert aus Leukozytenkonzentrat

Humane T-Zellen wurden aus Leukozytenkonzentrat mit Hilfe von Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Schafserythrozyten-Rosettierungen isoliert (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Die Ausbeute betrug $5-15 \times 10^8$ T-Zellen pro Leukozytenkonzentrat, was der Ausbeute aus 500 ml Blut entspricht.

Die Reinheit der humanen T-Zellen wurden mit dem Antikörper OKT3, der gegen die T-Zellspezifische CD3 ϵ -Kette gerichtet ist, in einer FACS-Analyse überprüft. Parallel hierzu wurde die Expression von CD44 mit den CD44-Antikörpern D2.1 und J-173 überprüft (Abbildung 3).

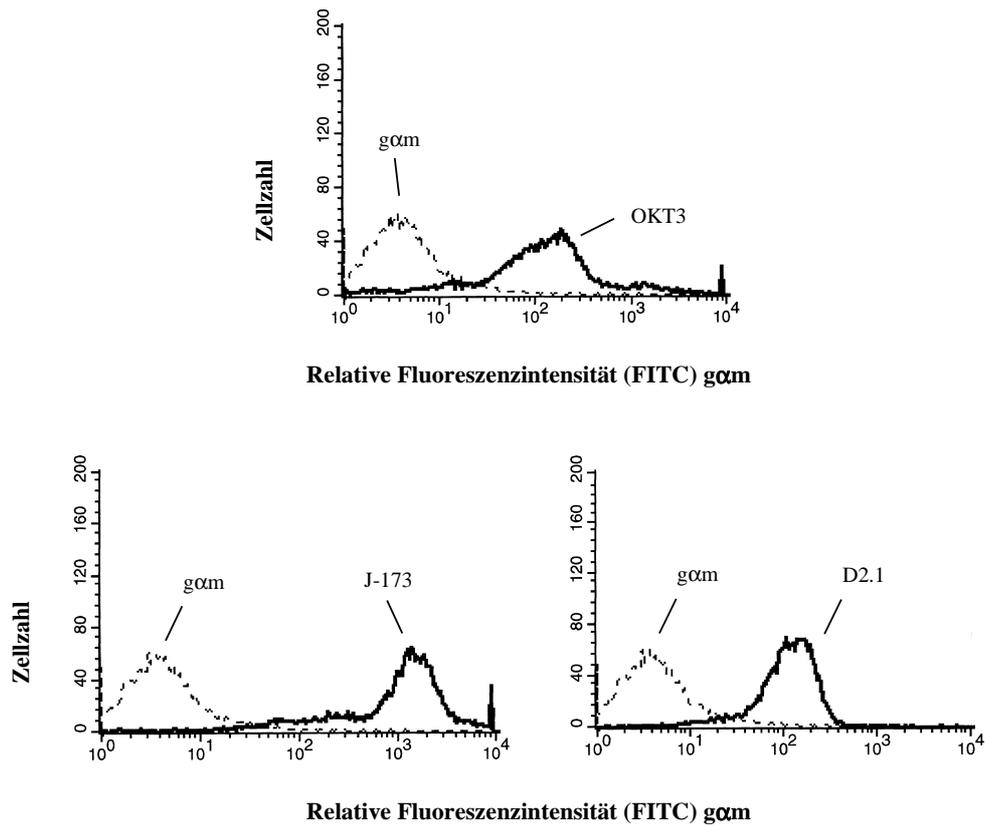


Abbildung 3: CD3 – und CD44 – Färbung der isolierten humanen T-Zellen.

Aufgereinigte T-Zellen (10^6 Zellen) wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 oder dem CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 (wie indiziert; jeweils 10 μ g/ml) und anschließend mit einem FITC-konjugierten Kaninchenserum gegen Ratten IgG (1:500) inkubiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In den Diagrammen ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

Die Reinheit der T-Zell-Präparation lag zwischen 90 und 95 %. In Abbildung 3 ist das Ergebnis einer Messung exemplarisch dargestellt. Alle T-Zellen haben in der FACS-Analyse die CD44-Antikörper gebunden. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationen wurde die Reinheit der eingesetzten T-Lymphozyten durch eine FACS-Analyse kontrolliert und nur Präparationen verwendet, die eine Reinheit von größer 90 % aufwiesen.

5.1.2 Einfluß von CD44-Antikörpern auf den Phänotyp und die Proliferation von humanen T-Zellen

Die humanen T-Zellen wurden mit den aktivierenden CD44-Antikörpern J-173 und D2.1 behandelt, um zu prüfen, ob sie die homotypische T-Zellaggregation ermöglichen. Die mitogene Wirkung des humanen CD3 ϵ -Antikörpers OKT3 auf T-Zellen ist bekannt (van Wauwe et al., 1980). Daher wurde dieser Antikörper als positive Kontrolle verwendet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob CD3- und CD44-Antikörper synergistisch wirken können. Hierfür wurde der CD3-Antikörper gemeinsam mit den CD44-Antikörpern D2.1 und J-173 verwendet. Die Konzentration von OKT3 wurde austitriert und suboptimal gewählt, um auch einen schwachen synergistischen Effekt der CD44-Antikörper besser erkennen zu können. Unter suboptimalen CD3 Bedingungen bildeten sich nur kleine T-Zellkolonien. Die humanen T-Zellen wurden zur Beurteilung ihres Phänotyps nach Aktivierung mit OKT3 und/oder D2.1 bzw. J-173 lichtmikroskopisch dargestellt (Abbildung 4), um die Entstehung von Kolonien und später von Blasten als ein Maß für die erfolgte Aktivierung beurteilen zu können. Die Vitalität der T-Zellen konnte durch eine Trypanblaufärbung festgestellt werden. Tote Zellen erkennt man an ihrer Eigenschaft, den blauen Farbstoff aufzunehmen.

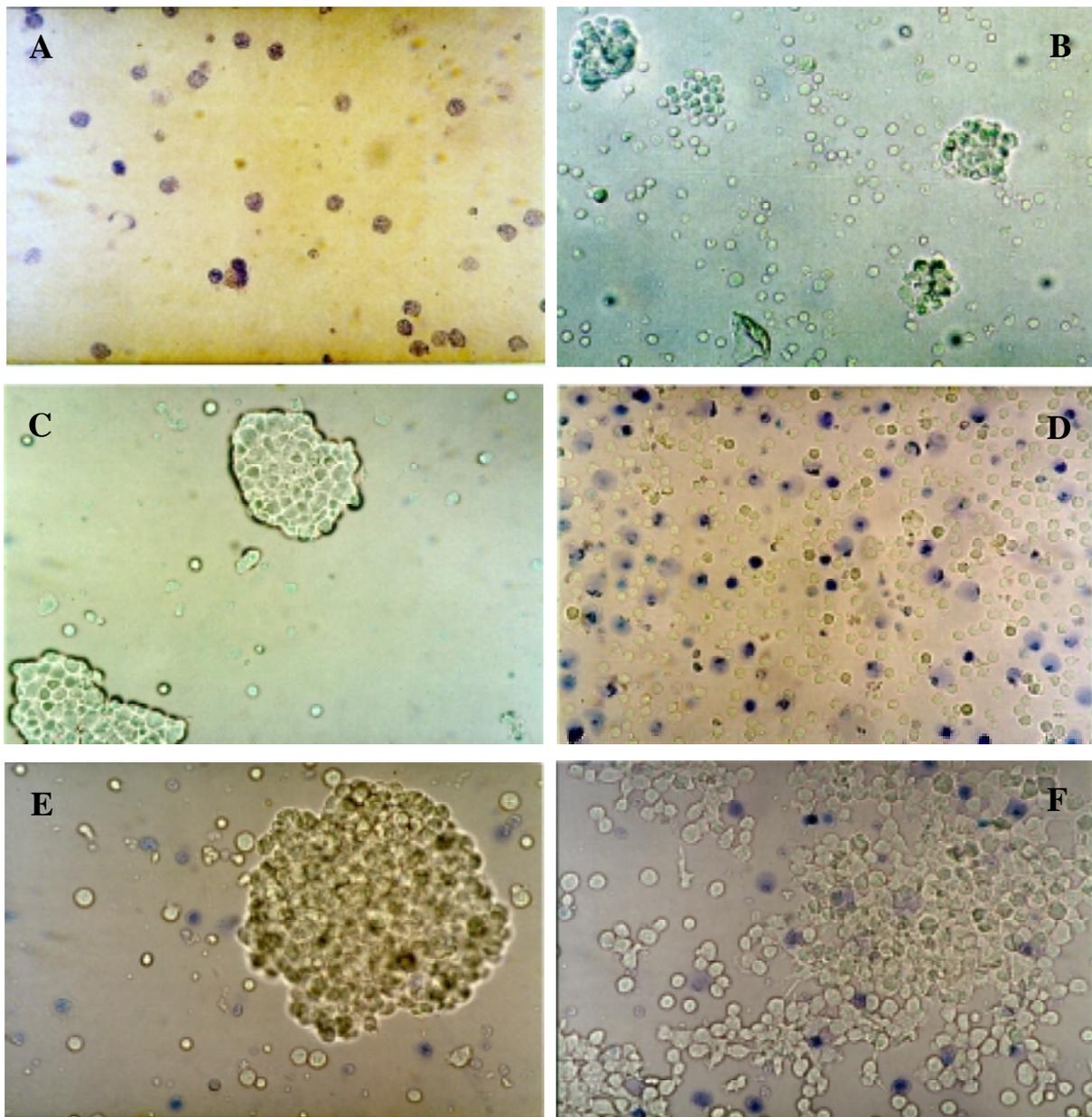


Abbildung 4A: T-Zellen nicht aktiviert

Abbildung 4B: T-Zellen aktiviert mit dem CD3-Antikörper OKT3

Abbildung 4C: T-Zellen aktiviert mit dem CD44-Antikörper D2.1

Abbildung 4D: T-Zellen aktiviert mit dem CD44-Antikörper J-173

Abbildung 4E: T-Zellen aktiviert mit dem CD3-Antikörper OKT3 und dem CD44-Antikörper D2.1

Abbildung 4F: T-Zellen aktiviert mit dem CD3-Antikörper OKT3 und dem CD44-Antikörper J-173

Abbildung 4: Effekt der CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 und des CD3 ϵ -Antikörpers OKT3 auf die Morphologie von humanen T-Zellen.

Lichtmikroskopische Bilder wurden nach einer Trypanblaufärbung (siehe 4.2.4) von 5×10^5 primären T-Zellen nach Aktivierung mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (5 $\mu\text{g/ml}$) und/oder dem CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$) nach 72 Stunden Kultur erstellt. Eine Kontrollkultur enthielt keine Antikörper (wie indiziert). Die Gesamtvergrößerung ist 200-fach.

Es zeigte sich, daß nicht aktivierte Kontrollzellen rund und oft tot waren (Abbildung 4A). Die Aktivierung mit dem CD3-Antikörper OKT3 induzierte, wie erwartet, die Bildung von T-Zellblasten und die homotypische T-Zellaggregation. Diese Zellen bildeten auch unter suboptimalen Anti-CD3 Konzentrationen kleine Kolonien (Abbildung 4B). Eine Behandlung mit dem CD44-Antikörper D2.1 alleine führte ebenfalls zur Blastenbildung und zur homotypische T-Zellaggregation (Abbildung 4C). Im Gegensatz dazu induzierte J-173 keine Kolonien. J-173 veranlasste die T-Zellen die Oberfläche der Plastikschalen zu überziehen (Abbildung 4D). Zudem wurden mehr tote Zellen gefunden. Die Kombination von OKT3 mit D2.1 ermöglichte die Bildung von größeren lebenden Zellkolonien als D2.1 bzw. OKT3 allein (Abbildung 4B/E). T-Zellen, die mit OKT3 und J-173 induziert worden waren, bildeten etwas größere Kolonien, als mit OKT3 allein, und überzogen zusätzlich die Oberfläche der Plastikschale, was auf einen kombinierten Effekt schließen lässt (Abbildung 4F). Diese Ergebnisse zeigen, daß D2.1 allein und J-173 gemeinsam mit OKT3 einen aktivierenden Effekt auf die Kolonienbildung ausüben. Die Kolonienbildung ist ein Zeichen für die erfolgte T-Zellaktivierung.

Nach Untersuchung des Effekts auf die Kolonienbildung sollte herausgefunden werden, ob CD44-Antikörpergabe nicht nur mit der Blastenbildung, sondern auch mit der T-Zellproliferation korreliert. Humane T-Zellen wurden mit J-173 und D2.1 mit bzw. ohne Koaktivierung durch suboptimale Konzentrationen des CD3-Antikörpers OKT3 induziert (Abbildung 5) und dann die Proliferation nach 72 Stunden mittels ^3H -Thymidin-Einbau gemessen.

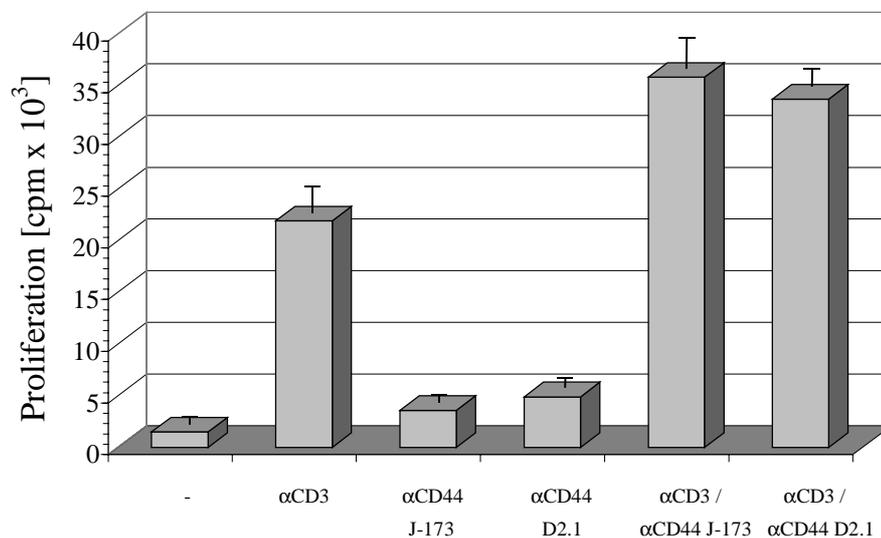


Abbildung 5: Induktion der T-Zellproliferation in humanen T-Lymphozyten durch die CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 und den CD3-Antikörper OKT3.

Die Proliferation von 5×10^5 primären T-Zellen nach Aktivierung mit dem CD3ε-Antikörper OKT3 (5 µg/ml) und/oder dem CD44-Antikörper D2.1 bzw. J-173 (jeweils 20 µg/ml) nach 72 Stunden Kultur wurde durch das Ausmaß des ^3H -Thymidin-Einbaus ermittelt (siehe 4.2.7). Eine Kontrollkultur enthielt keine Antikörper. Die Proliferation, gemessen in cpm, ist in dem Diagramm gegen die unterschiedlichen Antikörperansätze aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils 3 parallelen Ansätzen.

J-173 und D2.1 wirkten allein nur sehr schwach auf die T-Zellproliferation. Eine Koaktivierung von J-173 bzw. D2.1 mit dem CD3-Antikörper OKT3 induzierte die T-Zellproliferation in ca. 1,5 mal höherem Maße als mit OKT3 allein. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, daß D2.1 neben J-173 ein aktivierender CD44-Antikörper ist. D2.1 hat eine stärkere Wirkung auf die homotypische T-Zellaggregation und auf die T-Zellproliferation als J-173.

5.1.3 Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Behandlung humaner T-Zellen mit den CD44-Antikörpern D2.1 und J-173

Da D2.1 eine aktivierende Wirkung auf humane T-Zellen hat, stellte sich die Frage, ob D2.1 auch die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine wie J-173 induziert. Zur Untersuchung der Signalübertragung von CD44 wurden humane T-Zellen mit D2.1 und J-173 stimuliert. Dies geschah in Kombination mit einem Zweitantikörper, da nur die Quervernetzung von J-173 die Tyrosin-Phosphorylierung induziert. Der Zweitantikörper erkennt diese CD44-Antikörper, die aus der Maus stammen. Die so aktivierten T-Zellen wurden in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten analysiert (Abbildung 6).

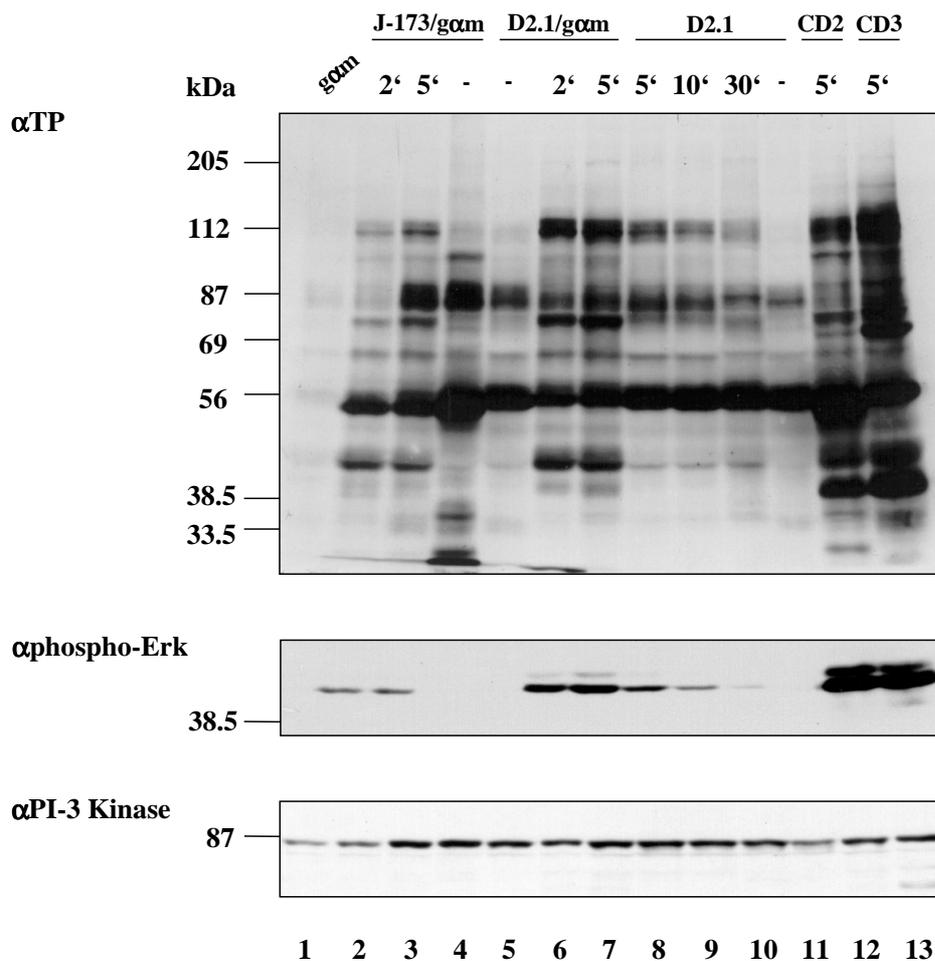


Abbildung 6: Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Stimulierung mit den CD44-Antikörpern D2.1 und J-173. Identifizierung von Erk2 durch einen phosphospezifischen Erk-Antikörper.

Legende auf nächster Seite oben

Legende zu Abbildung 6

5×10^6 primäre humane T-Zellen wurden mit dem CD44-Antikörper J-173 bzw. D2.1 (jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$; Spur 8-11) alleine, oder in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgG ($\text{g}\alpha\text{m}$); jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2-7) für die angegebenen Zeiten aktiviert (siehe 4.3.2). Die Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 $\mu\text{g/ml}$) in Kombination mit dem Zweitantikörper (Spur 13) oder den CD2-Antikörpern AICD.M1, AICD.M2 und 3PT (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 12) aktiviert. In den mit einem Strich (-) markierten Spuren wurden die entsprechenden Antikörper, nach 5 minütiger Aktivierung, als Kontrolle erst nach der Zellyse zugegeben. Ein Kontrollansatz (Spur 1) wurde nur mit dem Zweitantikörper für 2 min aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit einem Antikörper, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt (Blot αTP ; 1:1000) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Kaninchen-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:1000) behandelt. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben. Phosphoryliertes Erk Protein wurde nach „Strippen“ der Membran (siehe 4.3.10) mit Hilfe eines Erk-Antikörpers nachgewiesen, der nur phosphorylierte Erk-Formen erkennt (1:500; Blot $\alpha\text{phospho Erk}$). Als Zweitantikörper wurde Meerrettichperoxidase-konjugiertes Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-Immunglobuline (1:1000) verwendet. Nach erneutem „Strippen“ wurde die PI3-Kinase (1:1000; Blot $\alpha\text{PI3-Kinase}$) nachgewiesen. Als Zweitantikörper diente Meerrettichperoxidase-konjugiertes Kaninchen-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:1000).

D2.1 und J-173 induzierten die Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen mit einem Molekulargewicht von 200, 150, 120, 112, 100, 84, 59, 56, 42, 38 und 35 kDa, allerdings mit unterschiedlichen Intensitäten. D2.1 induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung stärker und benötigte keinen Zweitantikörper (Spur 6 und 7). Die Tyrosin-phosphorylierten Proteine sind nach zwei Minuten nachweisbar. Eine halbe Stunde nach der Aktivierung sind noch etwa 10 % der Proteine Tyrosin-phosphoryliert.

Die Aktivierung mit einer Kombination von mitogenen Antikörpern, die gegen das Adhäsionsmolekül CD2 gerichtet sind, oder mit CD3-Antikörpern induzierte ebenfalls die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit vergleichbaren Molekulargewichten wie die oben erwähnten Proteine; zusätzlich wurden aber auch weitere Proteine phosphoryliert (Spur 12 und 13; Galandrini et al., 1993). Eine Zusammenfassung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten nach Stimulierung mit CD44-, CD3- und CD2-Antikörpern ist in der nachfolgenden Tabelle 6 erstellt. Bekannte Proteine, die nach CD3-Antikörper Behandlung Tyrosin-phosphoryliert werden, sind angegeben. Es ist naheliegend, daß Proteine mit gleichem Molekulargewicht nach Stimulierung mit CD44- bzw. CD3-Antikörpern identisch sind. Unter den mit den CD44-Antikörpern Tyrosin-phosphorylierten Proteinen war das Protein von 42 kDa am stärksten Tyrosin-phosphoryliert. Dieses wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der nur phosphorylierte d.h. aktivierte Erk-Formen erkennt, als Erk2 identifiziert (Abbildung 5: Blot $\alpha\text{phospho-Erk}$). Dies bedeutet, daß die Signalübertragung von CD44 nach Aktivierung mit D2.1 bzw. J-173 über Erk2 verläuft. Die Identität der anderen Tyrosin-phosphorylierten Proteine von 200, 150, 120, 112, 100, 84, 59, 56, 38 und 35 kDa ist unbekannt. Proteine von 56 kDa (Lck) und 59 kDa (Fyn) wurden aber schon zuvor in der Signalübertragung von CD44 identifiziert (Taher et al., 1996; Ilangumaran et al., 1998). Die Tyrosin-phosphorylierten Proteine von 84 kDa und 120 kDa waren von besonderem Interesse, da Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht auch nach Aktivierung muriner T-Zellen mit Hyaluronsäure, dem natürlichen Liganden von CD44, Tyrosin-phosphoryliert wurden (siehe Abschnitt 5.3.). Bei dem 120 kDa Protein könnte es sich um c-Cbl (120 kDa) handeln, da c-Cbl in T-Zellen nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern besonders stark Tyrosin-phosphoryliert wird (Donovan et al., 1994). Ein möglicher Kandidat für das nach Aktivierung

mit CD44- und CD3-Antikörper Tyrosin-phosphorylierte Protein von 84 kDa war die 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase (Sconocchia et al., 1997). In T-Zellen wird diese Untereinheit nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern Tyrosin-phosphoryliert (von Willebrand et al., 1994). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Abbildung 6: Blot α PI3-Kinase) konnte gezeigt werden, daß das gefundene 84 kDa Protein nicht der 85 kDa Untereinheit entspricht, da es nicht auf gleicher Höhe im Proteingel migriert. Die Signalübertragung von CD44 induziert also nicht die Tyrosin-Phosphorylierung der PI3-Kinase. Weitere Kandidaten wie die Stat1 β - und Stat3 β -Isoformen mit einem Molekulargewicht von circa 84 kDa wurden ebenfalls ausgeschlossen (Abbildung 28). Weiterhin sollten Proteine identifiziert werden, die an der Signalübertragung, die zur Tyrosin-Phosphorylierung des 84 kDa und 120 kDa Proteins führen, beteiligt sind. Dies geschah mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren gegen bekannte Kinasen.

Tabelle 6: Molekulargewichte der Tyrosin-phosphorylierten Proteine nach Aktivierung mit den CD44-Antikörpern J-173 bzw. D2.1 oder CD3- bzw. CD2-Antikörpern:

MW	J-173	D2.1	CD3	CD2	mögliche Kandidaten*
200	-	?	+	+	CD45 (180-220 kDa)
150	-	?	+	+	PLC γ 1 (135 kDa)
120	?	?	+	+	c-Cbl (120 kDa), FAK (120 kDa), Pyk2 (120), FYB (= p120/130), CrkL (130 kDa)
112	?	?	+	?	Cas-L (105 kDa)
100	-	?	+	+	VCP (100 kDa),
90	-	-	+	-	VAV (95 kDa)
88	-	-	?	-	?
87	-	-	?	-	?
84	?	?	+	-	Ezrin (81 kDa), PI3-Kinase (85 kDa), Stat1 β (85 kDa)**, Stat3 β (84 kDa)**
80	-	-	+	+	CPK γ (77-84 kDa), Syk (78 kDa), SLP-76 (76 kDa), ZAP-70 (70 kDa), Paxillin (70-80 kDa)
59	p59 ^{fyn}				
56	p56 ^{lck}				
54	-	-	-	+	Csk (50 kDa), Shc (46, 52 kDa)
42	Erk2	Erk2	Erk2	Erk2	Erk2
40	-	-	?	?	?
38	?	?	+	+	p38-Kinase
35	-	?	+	?	LAT (36 kDa)
33	-	-	-	?	Lnk (34 kDa)

? : unbekanntes, phosphoryliertes Protein

- : nicht phosphoryliertes Protein

+ : bekanntes, phosphoryliertes Protein

* : Protein wird nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern phosphoryliert; ein möglicher Kandidat für die Aktivierung mit CD44-Antikörper

** : Protein wird nach Aktivierung mit Interleukin-2 phosphoryliert; ein möglicher Kandidat für die Aktivierung mit CD44-Antikörper

5.1.4 Hemmung der Signalübertragungswege mit Inhibitoren

Um Evidenzen zu sammeln, daß die durch den CD44-Antikörper D2.1 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des 84 kDa Proteins bzw. des 120 kDa Proteins und die Erk2-Kinase-Aktivierung im gleichen Signalübertragungsweg liegen, wurde die Signalübertragung, die zur Erk2-Aktivierung führt, mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren unterbrochen und die Auswirkungen auf die Tyrosin-Phosphorylierung des 84 kDa und des 120 kDa Proteins untersucht. Da die Stimulierung mit D2.1 auch mit der Tyrosin-Phosphorylierung eines 38 kDa Proteins induzierte (Abbildung 6) wurden, mit der Annahme, daß es sich hierbei um die p38-Kinase handelt, auch p38-Kinase Inhibitoren verwendet. Es wurden der MEK-Inhibitor PD98059 und der p38-Kinase Inhibitor SB203580 eingesetzt (Lee et al., 1994; Cuenda et al., 1995). Um herauszufinden, ob die Aktivierung der PI3-Kinase mit der Tyrosin-Phosphorylierung des 84 kDa in Zusammenhang steht, wurde außerdem der spezifische Inhibitor Wortmannin benutzt. Die humanen T-Zellen wurden mit den entsprechenden Inhibitoren vorbehandelt, mit D2.1 bzw. OKT3 induziert und in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten analysiert.

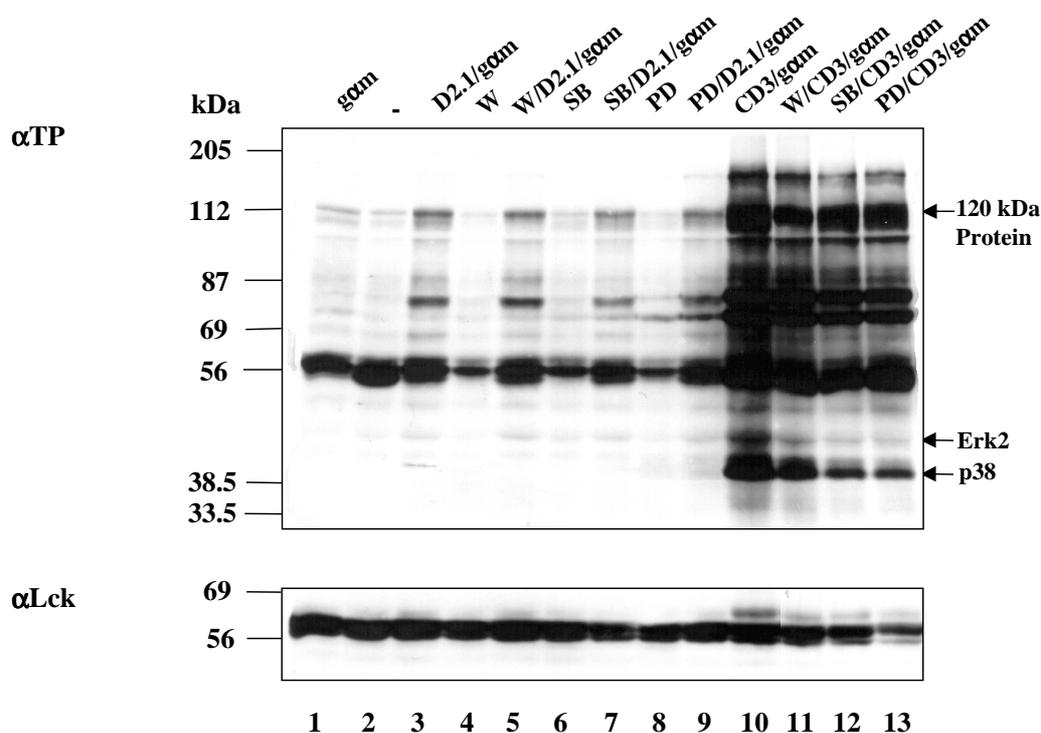


Abbildung 7: Keine Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung von HARP durch Inhibitoren der PI3 -, p38 - und Mek-Kinase.

6×10^6 primäre humane T-Zellen wurden mit Wortmannin (W), SB203580 (SB) bzw. PD98059 (PD) für 15 min behandelt (siehe 4.3.2). Die Zellen wurden dann mit dem CD44-Antikörpern D2.1 (jeweils 20 μ g/ml) in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgG (γ m)); jeweils 50 μ g/ml) für 5 min aktiviert. Die Zellen wurden in parallel mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 μ g/ml) in Kombination mit dem Zweitantikörper aktiviert. In der mit einem Strich (-) markierten Spur wurde D2.1 und γ m, nach 5 minütiger Aktivierung, als Kontrolle erst nach der Zellyse zugegeben. Ein Kontrollansatz (Spur 1) wurde nur mit dem Zweitantikörper für 2 min aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert. Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Die Membran wurde nacheinan-

der mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot α TP; 1:1000) und Lck (1:1000; Blot α Lck) erkennen, behandelt. Das Protein von 38 kDa, HARP und die Erk2-Kinase sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Aktivierung mit D2.1 induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung des 38 kDa, 84 kDa und 120 kDa Proteins und von Erk2 (Abbildung 7: Spur 3), obwohl die Aktivierung mit D2.1 in diesem Experiment insgesamt schwach war. Die Vorbehandlung mit Wortmannin oder SB203580 inhibierte die Phosphorylierung des 38 kDa Proteins. Wortmannin ist in nanomolaren Konzentrationen spezifisch für die PI3-Kinase, inhibiert aber indirekt andere Signalübertragungswege (von Willebrand et al., 1996). Dementsprechend könnte es auch Signalübermittlungswege, die die p38-Kinase phosphorylieren, hemmen. Wortmannin hemmte die Phosphorylierung des 84 kDa Proteins nicht. Daher wurde bestätigt, daß es sich hierbei nicht um die PI3-Kinase handelt.

In der Arbeit hemmte der Erk-Inhibitor PD98059 die Phosphorylierung von Erk2 nicht. Die Bedingungen für die Vorbehandlung der T-Zellen mit PD98059 müßten in weiteren Versuchen optimiert werden. PD98059 ist ein spezifischer Inhibitor, die Stärke der Hemmung der Erk2-Phosphorylierung ist jedoch abhängig von der Art und Intensität des Stimulus (Alessi et al., 1995). Dumont et al (1998) inhibierten die Erk2-Phosphorylierung in primären humanen T-Zellen mit dem gleichen Inhibitor, aber nach einer längeren Vorbehandlung und einer höheren Konzentration.

Mit den verwendeten Inhibitoren wurde die Tyrosin-Phosphorylierung des 84 kDa und des 120 kDa Proteins nicht gehemmt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Tyrosin-Phosphorylierung dieser Proteine entweder „upstream“ von Erk2 bzw. von dem 38 kDa Protein erfolgt oder durch einen anderen Signalübertragungsweg erfolgt. Die Aktivierung mit OKT3 war deutlich stärker im Vergleich zur D2.1-Aktivierung. Deshalb kann eine unspezifische Inhibierung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine mit den verwendeten Inhibitoren beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen sollten die Signalübertragung von CD44 in anderen Organismen klären. Die Signalübertragung des TCR/CD3-Komplexes wurde z.B. auch in der Maus detailliert untersucht. Ein Vorteil in der Untersuchung der CD44-Signalübertragung in der Maus lag in der Verwendung von genetisch identischen Inzuchtstämmen. Damit ließ sich die Variabilität der Ergebnisse durch unterschiedliche genetische Faktoren ausschließen. In murinen T-Zellen konnten CD44-Antikörper verwendet werden, die die Signalübertragung hemmen. Ein weiterer Vorteil von Experimenten in Mäusen war, daß CD44 transgenen Mäuse zur Untersuchung der Signalübertragung der varianten CD44v-Isoformen verwendet werden konnten.

5.2 Signalübertragung von CD44 in murinen T-Zellen

In den nun folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob Erk2 in der Signalübertragung von CD44 in der Maus beteiligt ist. Es war von Interesse, ob die anderen Tyrosinphosphorylierten Proteine, insbesondere die 84 und 120 kDa Proteine, auch in die murine Signalübermittlung verwickelt sind. Im murinen System steht zudem eine weitere wichtige Kontrolle - ein Mausstamm, in dem das CD44 Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde - zur Verfügung. Zur Kontrolle der Spezifität wurden die bei normalen Mäusen erhaltenen Ergebnisse mit denen von CD44 „Knockout“ Mäusen verglichen. Ein weiteres gutes Modellsystem zur Untersuchung der Signalübertragung durch die CD44v-Isoformen stellen transgene Mäuse dar, die CD44v4-v7 spezifisch auf T-Zellen konstitutiv exprimieren. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort dieser Mäuse ist beschleunigt. Dieses beschleunigte T-Zellwachstum kann mit dem CD44-Antikörper 1.1ASML, der gegen die variante Isoform v6 aus der Ratte gerichtet ist, gehemmt werden. Dies läßt vermuten, daß diese CD44-Isoform bei der Signalübertragung von T-Zellen, die zur T-Zellproliferation führt, eine Funktion hat.

5.2.1 Kontrolle der Reinheit der murinen T-Zellpopulationen

Murine T-Zellen wurden aus Lymphknoten isoliert. B-Zellen und Monozyten wurden durch Koppelung des Fc-Rezeptor an IgG₁ Antikörper bzw. Adhärenz an Plastik von T-Zellen abgetrennt (negative Selektion; siehe 4.2.1).

Die Reinheit der aufgereinigten murinen T-Zellen wurde, wie vorher bei humanen T-Zellen beschrieben, mit Hilfe einer FACS-Analyse überprüft. Die Zellen wurden mit dem Antikörpern 145-2C11, der gegen den T-Zell-Marker CD3 ϵ gerichtet ist, gefärbt. Der Anteil CD3 ϵ -positiver Zellen lag in allen Experimenten zwischen 90 und 99 %. In Abbildung 8 ist eine Messung exemplarisch dargestellt.

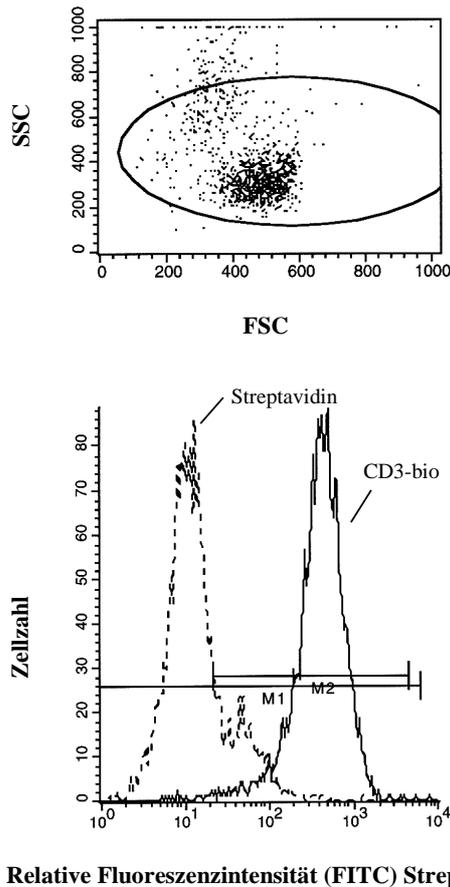


Abbildung 8: Anti-CD3-Färbung der isolierten murinen T-Lymphozyten.

Aufgereinigte T-Zellen (10^6 Zellen) wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11biotinyliert (bio; jeweils 10 μ g/ml) und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antiserum gegen Streptavidin (1:500) inkubiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In dem Dot-Diagramm ist das Seitwärtstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtstreulicht (FSC) aufgetragen. In dem Histogramm-Diagramm ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

5.2.2 Hemmung der CD3 induzierten Proliferation von primären murinen T-Lymphozyten nach Zugabe von CD44-Antikörpern

Aktivierende CD44-Antikörper wie die humanen CD44-Antikörper D2.1 und J-173, die zuvor zur Untersuchung der Signalübertragung von CD44 verwendet worden waren, sind nicht in Mäusen beschrieben. Um die Signalübertragung von CD44 in Mäusen zu untersuchen, wurde daher der inhibierende Effekt der CD44-Antikörper IM7, KM81 und KM201 untersucht. Diese Antikörper inhibieren eine durch CD3-Antikörper induzierte T-Zellproliferation und scheinen daher eine Wirkung auf die Signalübertragungswege innerhalb der Zelle zu besitzen, wenn auch eine negative (Guo et al., 1993; Guo et al., 1994). Die Wirkung der CD44-Antikörper IRAWB14 und R7166.7 auf die Signalübertragung von CD44 ist unklar (Lesley und Hyman, 1992b; Lesley et al., 1993b; Perschl et al., 1995). Die T-Zellproliferation wird durch den mitogenen CD3 ϵ -Antikörper 1452-C11 induziert (Portoles et al., 1989; Neumann et al., 1992). Es wurde geprüft, ob IM7, KM81 und ein KM81 F(ab')₂-Fragment in der Lage sind, die so induzierte T-Zellproliferation zu hemmen. Desweiteren wurde untersucht, ob IRAWB14 und R7166.7 die induzierte T-Zellproliferation beeinflussen.

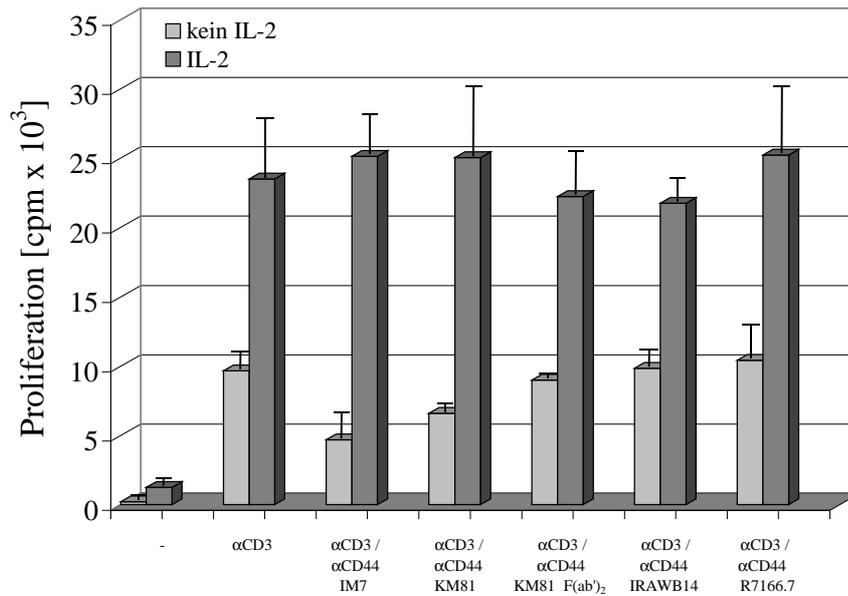


Abbildung 9: Hemmung der CD3 induzierten T-Zellproliferation nach Behandlung von murinen T-Lymphozyten mit den CD44-Antikörpern IM7 und KM81. Kompensierung der Hemmung mit exogen zugegebenem IL-2.

Die Proliferation von 10^6 primären T-Zellen nach Aktivierung mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (10 μ g/ml) und/oder dem CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81 (Fab \prime)₂, IRAWB14 bzw. R7166.7 (jeweils 20 μ g/ml) nach 72 Stunden Kultur wurde durch das Ausmaß des ³H-Thymidin-Einbaus ermittelt (siehe 4.2.6). Eine Kontrollkultur enthielt keine Antikörper. Den Kulturen war rekombinantes IL-2 (2 ng/ml) oder kein IL-2 zugefügt worden. Die Proliferation (gemessen in cpm) ist in dem Diagramm gegen die unterschiedlichen Antikörperansätze aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils 3 parallelen Ansätzen.

Wie erwartet verringerten IM7 und KM81 die mit dem CD3 ϵ -Antikörpern 145-2C11 aktivierte T-Zellproliferation (Abbildung 9; dunkelgraue Säulen). IM7 verringerte den Ausgangswert der T-Zellproliferation um 50 %, KM81 um 30 % und das KM81 F(ab \prime)₂-Fragment um 8 %. Die beiden CD44-Antikörper R7166.7 und IRAWB14 zeigten keinen Effekt.

5.2.3 Hemmung der CD3 induzierten Sekretion von murinem Interleukin-2 nach Behandlung mit CD44-Antikörpern

Die Signalübertragung in murinen T-Zellen resultiert nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptor (TCR) -Komplex z.B. mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in einer Interleukin-2 (IL-2) Sekretion (Lin et al., 1995b). Es wurde in diesem Experiment geprüft, ob die inhibierenden CD44-Antikörper IM7, KM81 bzw. ein F(ab \prime)₂-Fragment des KM81 eine Anti-CD3 induzierte IL-2 Sekretion hemmen können und welchen Einfluß die CD44-Antikörper IRAWB14 und R7166.7 auf die IL-2 Produktion haben.

Hierzu wurden primäre murine T-Zellen mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in Kombination mit den verschiedenen CD44-Antikörpern für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels eines IL-2 ELISAs gemessen (Abbildung 10).

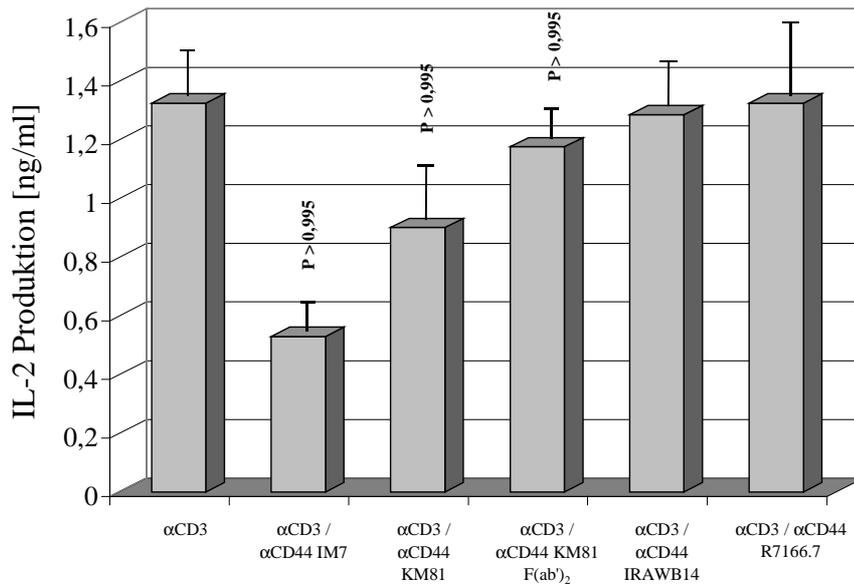


Abbildung 10: Hemmung der Anti-CD3 induzierten IL-2 Sekretion nach Behandlung von murinen T-Lymphozyten mit den CD44-Antikörpern IM7 und KM81.

Die IL-2 Produktion von 10^6 primären T-Zellen nach Aktivierung mit dem CD3ε-Antikörper 145-2C11 (10 µg/ml) und/oder dem CD44-Antikörper IM7, KM81, KM81 (Fab')₂, IRAWB14 bzw. R7166.7 (wie indiziert; jeweils 20 µg/ml) nach 24 Stunden Kultur wurde ermittelt (siehe 4.2.5). Die IL-2 Produktion (gemessen in ng/ml) ist in dem Diagramm gegen die unterschiedlichen Antikörperansätze aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils 3 Ansätzen. Das statistische Signifikanzniveau des Unterschiedes zwischen den durchschnittlichen IL-2-Konzentrationen der verschiedenen Antikörperansätze wurde mittels Student's Test berechnet (siehe 4.2.6). Die Signifikanzniveaus (P) sind angegeben.

In der Tat inhibierten die CD44-Antikörper IM7 und KM81 eine Anti-CD3induzierte IL-2 Produktion. IM7 zeigte den stärksten Effekt; er verringerte die IL-2 Produktion um 60 %. Der KM81 Antikörper verringerte die IL-2 Produktion um 30 % und das KM81 F(ab')₂-Fragment um 10 %. Die CD44-Antikörper R7166.7 und IRAWB14 zeigten diesen inhibierenden Effekt nicht. Diese Daten korrelieren gut mit dem vorherigen Experiment, in dem der Einfluß der CD44-Antikörper auf T-Zellwachstum getestet wurde.

Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigene induziert die Expression und Sekretion von IL-2 und die Expression hochaffiner IL-2-Rezeptoren. IL-2 bindet an diese Rezeptoren und unterstützt so die T-Zell-Proliferation auf autokrine Art.

Um festzustellen, ob die veränderte IL-2 Produktion direkt mit der Proliferation der T-Zellen korreliert, wurde überprüft, ob die durch CD44-Antikörper blockierte T-Zell-Proliferation durch Zufügung von rekombinanten IL-2 kompensiert werden kann.

Es konnte gezeigt werden, daß die durch CD44-Antikörper inhibierte T-Zellproliferation durch die Zugabe von exogenem IL-2 kompensiert werden kann (Abbildung 9; hellgraue Säulen). Die exogen zugegebene Menge an IL-2 war offensichtlich so groß, daß der Ausgangswert der CD3 induzierten T-Zellproliferation, ohne Zugabe der CD44-Antikörper, noch übertroffen wurde. Es wurde bewiesen, daß die Verringerung der T-Zellproliferation nach Antikörpergabe durch eine geringere Produktion von IL-2 hervorgerufen wird und, daß keine anderen Wachstumsfaktoren wie IL-4 bzw. IL-6 eine Rolle spielen. Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, daß möglicherweise mit Toxinen verunreinigte Antikörper-Lösungen den inhibierenden Effekt ausüben.

5.2.4 Optimierung der Methode zur Aktivierung muriner T-Lymphozyten mit CD3-Antikörpern

Es wurde geprüft, ob diese inhibierenden Antikörper, die die IL-2 Produktion und das T-Zellwachstum hemmen, eine durch CD3-Antikörper induzierte Aktivierung intrazellulärer Kinasen wie z.B. Erk2 oder Lck modulieren.

Es wurden die Aktivierungsbedingungen in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten (SDS-PAGE / Immunoblot mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist) der murinen T-Lymphozyten zunächst in einer Mengen- und Zeit- Kinetik mit dem aktivierenden CD3-Antikörpern 145-2C11 und dem mitogenen Lectin Concanavalin A ausgetestet (Abbildung 11 und 12). Dies war notwendig, weil in den folgenden Experimenten die inhibierenden CD44-Antikörper in Kombination mit suboptimal gewählten CD3-Antikörper Konzentrationen verwendet werden sollten. Unter suboptimalen Bedingungen kann ein schwaches Signal sowohl verstärkt als auch abgeschwächt moduliert werden.

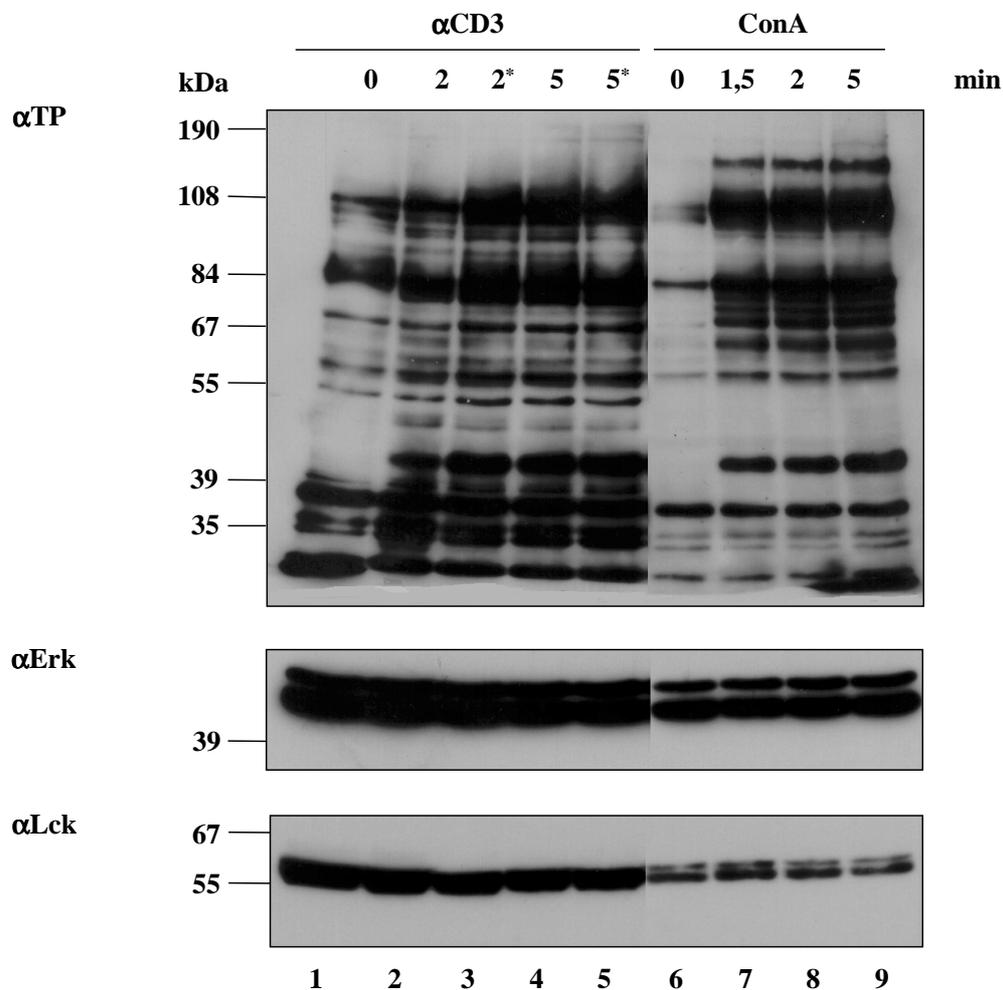
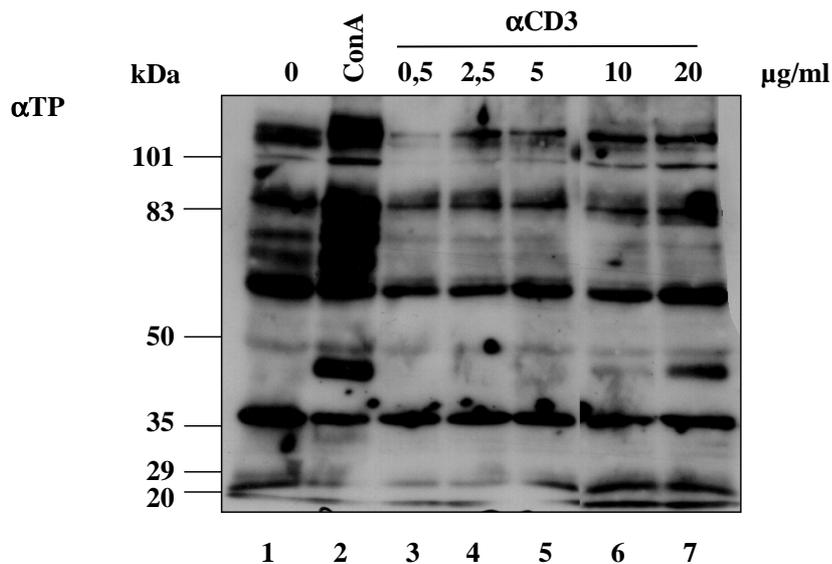


Abbildung 11: Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Stimulierung mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in einer Zeit-Kinetik.

Legende auf nächster Seite oben

Legende zu Abbildung 11

5×10^6 primäre murine T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (Spur 2 und 4 jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 3 und 5; jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$) oder mit Concanavalin A (Con A; jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 7-9) für die angegebenen Zeiten aktiviert (siehe 4.3.2). In Kontrollansätzen (Spur 1 und 6) wurde der CD3 ϵ -Antikörper bzw. Concanavalin A erst nach der Zellyse zugegeben. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosinphosphorylierte Proteine (Blot αTP ; 1:1000), Erk Proteine (1:2000; Blot αErk) bzw. Lck (1:1000; Blot αLck) erkennen, behandelt. Die zellulären Menge an Erk und Lck wurden bestimmt (Blot αErk und Blot αLck). Erk1 und Erk2 sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

**Abbildung 12: Konzentrations-Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Stimulierung mit dem CD3-Antikörper 145-2C11.**

5×10^6 primäre murine T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (Spur 3-7) in den angegebenen Konzentrationen für 2 min aktiviert (siehe 4.3.2). Die Zellen wurden parallel mit Concanavalin A (10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2) bzw. ohne Antikörper (Spur 1) für 2 min aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der Tyrosinphosphorylierte Proteine (Blot αTP ; 1:1000) erkennt, behandelt. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Eine Aktivierung primärer muriner T-Zellen mit dem aktivierenden CD3-Antikörper 145-2C11 oder Concanavalin A führte zur Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen. Es wurden Proteine mit einem Molekulargewicht von 42, 56, 59, 65, 80, 84, 100 und 120 kDa nach Aktivierung mit 145-2C11 in der SDS-PAGE / Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist, nachgewiesen (Abbildung 11). Aus Abbildung 11 und 12 (Blot αTP) ergibt sich, daß suboptimale Aktivierungsbedingungen für z.B. Erk (42 kDa) nach 2 min und 10 $\mu\text{g/ml}$ CD3-Antikörper erreicht waren. Unter diesen Bedingungen wird Erk2 nur sehr schwach Tyrosin-phosphoryliert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die murinen T-Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CD3 ϵ -Antikörpern für 2 min stimuliert. Dies entsprach suboptimalen Aktivierungsbedingungen.

5.2.5 Hemmung der CD3 induzierten Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine in Anwesenheit von blockierenden CD44-Antikörpern

Nach Optimierung der Aktivierungsbedingungen mit CD3-Antikörpern wurde versucht, eine durch CD3-Antikörper hervorgerufene Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen durch gleichzeitige Inkubation der T-Zellen mit CD44-Antikörpern zu blockieren. Die murinen T-Zellen wurden mit den CD44-Antikörpern IM7 und KM81 in Kombination mit suboptimalen Anti-CD3 Konzentrationen behandelt, um auch schwache, inhibierende Effekte nachweisen zu können, und in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten (SDS-PAGE / Immunoblot mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist) analysiert (Abbildung 13/14).

Ein alleiniger Effekt dieser CD44-Antikörpern, ohne Anti-CD3 Stimulierung, wurde zuvor ausgeschlossen (Abbildung 13; Daten für KM81 und KM201 nicht gezeigt).

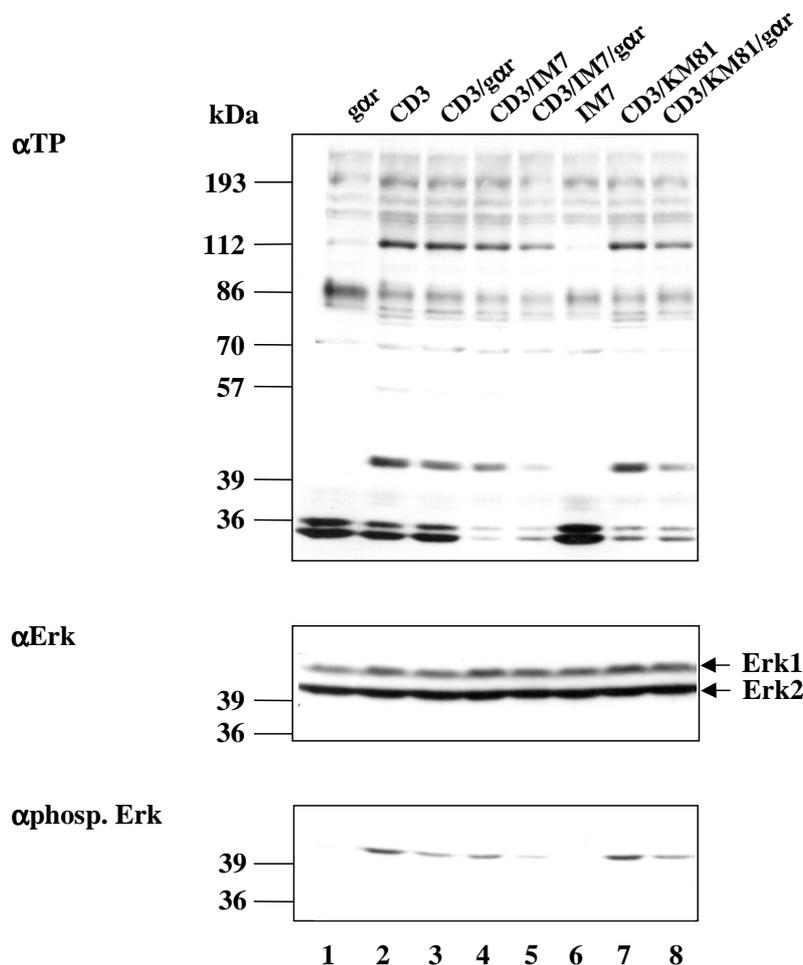


Abbildung 13: Inhibierung der CD3 vermittelten Erk2 Phosphorylierung durch die CD44-Antikörper IM7 und KM81. Verstärkung des Effekts durch einen vernetzenden Zweitantikörper.

Legende siehe nächste Seite oben.

Legende zu Abbildung 13:

1×10^7 primäre murine T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2-5, 7, 8) alleine, oder in Kombination mit dem CD44-Antikörper IM7 bzw. KM81 (jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$) oder in Kombination mit einem Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG ($\text{g}\alpha\text{r}$); jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$; Spur 3, 5, 8) aktiviert (siehe 4.3.2). Die Zellen wurden parallel mit dem Zweitantikörper ($\text{g}\alpha\text{r}$; Spur 1) oder mit dem CD44-Antikörper IM7 (Spur 6) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot $\alpha\text{TP-HPR}$; 1:1000), Erk Proteine (1:2000; Blot αErk) bzw. phosphorylierte Erk Proteine (1:500; Blot $\alpha\text{phospho Erk}$) erkennen, behandelt. Die zelluläre Menge an Erk wurde bestimmt. Erk1 und Erk2 sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

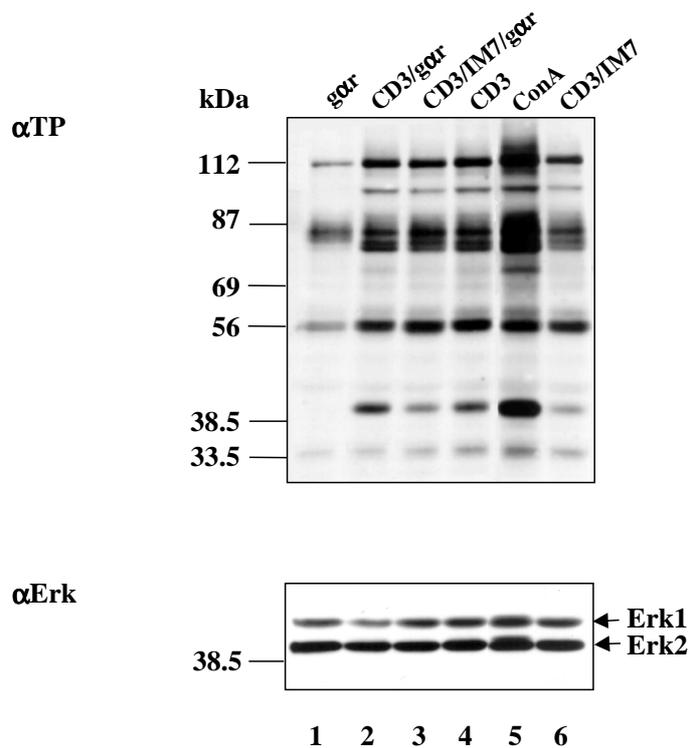


Abbildung 14: Inhibierung der CD3 vermittelten Erk2 Phosphorylierung durch den CD44-Antikörper IM7.

5×10^6 primäre murine T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2-4, 6) alleine, oder in Kombination dem CD44-Antikörper IM7 (Spur 3, 6; jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$) aktiviert (siehe 4.3.2). Zu den Ansätzen wurde gleichzeitig ein Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG ($\text{g}\alpha\text{r}$); Spur 2, 3; jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Zellen wurden parallel mit Concanavalin A (Spur 5; 10 $\mu\text{g/ml}$) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot αTP ; 1:1000) bzw. Erk Proteine (1:2000; Blot αErk) erkennen, behandelt. Die zelluläre Menge an Erk wurde bestimmt. Erk1 und Erk2 sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Behandlung mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in Kombination mit den CD44-Antikörpern IM7 (Abbildung 14), KM81 (Abbildung 13), KM81 F(ab')₂ (Abbildung 22) oder KM201 führte nach zwei Minuten zu einer Verminderung der Tyrosin-Phosphorylierung

eines 42 kDa Proteins (Daten für KM201 nicht gezeigt), verglichen mit der Tyrosin-Phosphorylierung dieses Proteins nach Aktivierung mit 145-2C11 allein. Dieser Effekt konnte durch die Verwendung eines quervernetzenden Zweitantikörpers (Ziege Anti-Ratte IgG) gesteigert werden. Dieser erkennt die CD44-Antikörper IM7 und KM81, die aus der Ratte stammen. Der CD44-Antikörper R7166.7 zeigte keinen Effekt auf die Tyrosin-Phosphorylierung (Abbildung 22). Egerton und Mitarbeiter konnten 1996 zeigen, daß der CD3-Antikörper 145-2C11 die Aktivierung von Erk2 in primären murinen T-Zellen induziert. Erk2 war also ein guter Kandidat für das 42 kDa Protein. Mit Hilfe eines Antikörpers, der die aktive Erk Kinase erkennt, konnte dieses Protein als Erk2 identifiziert werden (Abbildung 13; Blot α phospho Erk). Um die Stärke des inhibierenden Effekts der Antikörper ermitteln zu können, wurde die Erk2-Banden densitometrisch quantifiziert (Abbildung 15).

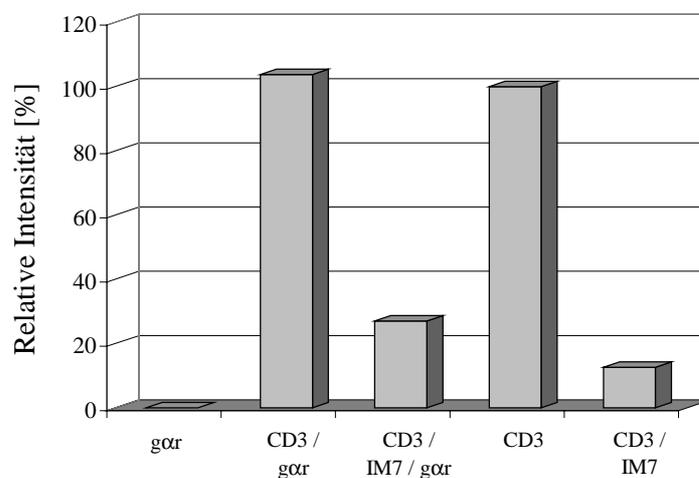


Abbildung 15: Quantifizierung der inhibierten Erk2 Tyrosin-Phosphorylierung.

Die Signalintensität der Erk2-Banden in den verschiedenen Spuren von Versuch 13 wurde laserdensitometrisch bestimmt. Die Intensität der Erk2 Tyrosin-Phosphorylierung nach Aktivierung mit dem CD3-Antikörper allein wurde zu 100 % gesetzt. Die relative Intensität ist in dem Diagramm gegen die unterschiedlichen Antikörperansätze aufgetragen.

IM7 verringerte die Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 auch ohne Zweitantikörper um 80 %. KM81 inhibierte in Kombination mit dem Zweitantikörper die Aktivierung von Erk2 um 60 % (Quantifizierung der Intensität der Erk2-Banden von Versuch 13). Weiterhin konnte eine leichte Hemmung, der durch den CD3-Antikörper induzierten Erk2-Tyrosin-Phosphorylierung nach Zugabe des Zweitantikörpers beobachtet werden (Abbildung 13; Spur 3).

Zur Erklärung des Zweitantikörpereffekts gibt es drei verschiedene theoretische Vernetzungsmöglichkeiten der Oberflächenantigene: Eine Vernetzung zweier CD44 Antigene bzw. zweier CD3 Antigene oder die Vernetzung von CD44 mit CD3. Die Bindungsfähigkeit des Zweitantikörpers wurde mit Hilfe einer FACS-Färbung analysiert. Hierdurch wurde geklärt, ob der Zweitantikörper neben den CD44-Antikörpern auch den CD3-Antikörper 145-2C11 binden kann und so die Hemmung der Erk2 Tyrosin-Phosphorylierung vermittelt.

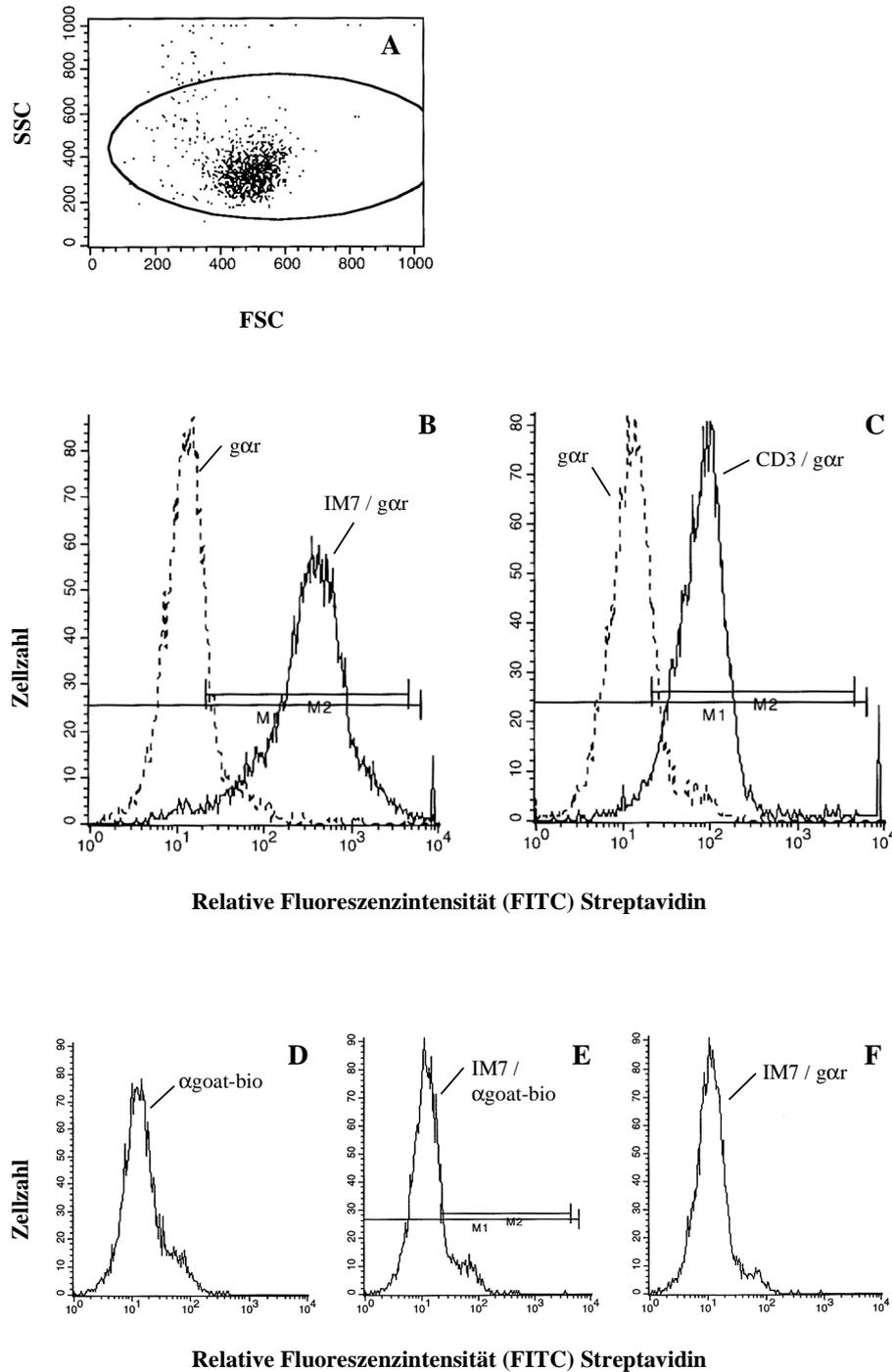


Abbildung 16: Der Zweitantikörper vernetzt CD3- und CD44-Antikörper.

Primäre murine T-Zellen (10^6 Zellen) wurden mit dem CD44-Antikörper IM7 (B) oder dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (C; jeweils $10 \mu\text{g/ml}$) in Kombination mit dem Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG; g α r) inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Drittantikörpers (Anti-Ziegen biotinyliert (α goat-bio); 1:100) und mit FITC-konjugiertem Streptavidin (1:200) der Antikörper-Komplex mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Als Kontrollen dienten Zellen, die mit dem Zweitantikörper, dem Drittantikörper und mit FITC-konjugiertem Streptavidin behandelt worden waren (g α r). Weiterer Kontrollen (Färbungen D-F) wurden durchgeführt, um sicherzustellen, daß IM7 nur den Zweitantikörper gebunden hat. In Färbung D wurden hierzu die Zellen mit dem Drittantikörper und Streptavidin gefärbt, in Färbung E mit IM7, dem Drittantikörper und Streptavidin, und in Färbung F mit IM7, dem Zweitantikörper und Streptavidin. Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In dem Dot-Diagramm (A) ist das Seitwärtstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtstreulicht (FSC) aufgetragen. In den Histogramm-Diagrammen (B-F) ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

Der Zweitantikörper Ziege Anti-Ratte (α r) hat den CD44-Antikörper IM7 (Abbildung 16.B) und den CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (Abbildung 16.C) in der FACS-Analyse gebunden.

In Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten wurde deutlich, daß die Vernetzung von zwei CD44-Molekülen keine Tyrosin-Phosphorylierung induziert (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß nur eine Rezeptorwechselwirkung von CD3 und CD44 die Erk2 Phosphorylierung reduziert.

Eine Änderung der Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen von 38, 80, 84, 100 und 120 kDa wurde, im Gegensatz zu humanen T-Zellen, in diesen Experimenten nicht beobachtet.

5.2.6 Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 nach Behandlung von T-Zellen aus CD44 „Knockout“ Mäusen mit CD3- und CD44-Antikörpern

Mit Hilfe von CD44 „Knockout“ Mäusen sollte geklärt werden, ob der inhibierende Effekt der CD44-Antikörper IM7 und KM81 auf die Signalübermittlung von CD44 spezifisch ist. Es wurde untersucht, ob die CD3-vermittelte Erk2-Aktivierung von primären murinen T-Zellen aus Mäusen, denen das CD44-Gen fehlt (Schmits et al., 1997), nicht mehr mit CD44-Antikörpern inhibiert wird. Für alle durchgeführten Stimulationen wurde die fehlende Expression des CD44-Gens in den eingesetzten Mäusen zuvor durch eine FACS-Analyse kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die T-Zellen wurden nach Aktivierung wie in den vorher beschriebenen Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten analysiert (Abbildung 17).

Die T-Zellen von CD44 „Knockout“ Mäusen und Kontrollmäusen wurden mit CD3-Antikörpern aktiviert. Das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der T-Zellen von CD44 „Knockout“ Mäusen und Kontrollmäusen nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern ist gleich. Eine Hemmung der Erk2 Tyrosin-Phosphorylierung konnte, im Gegensatz zu Kontrollmäusen, in CD44 „Knockout“ Mäusen, wie erwartet, nicht beobachtet werden. Dies zeigt, daß die CD44-Antikörper IM7 und KM81 spezifisch die Erk2-Phosphorylierung über das Oberflächenantigen CD44 inhibieren und keine anderen Faktoren, wie z.B. Kreuzreaktionen der Antikörper eine Rolle spielen.

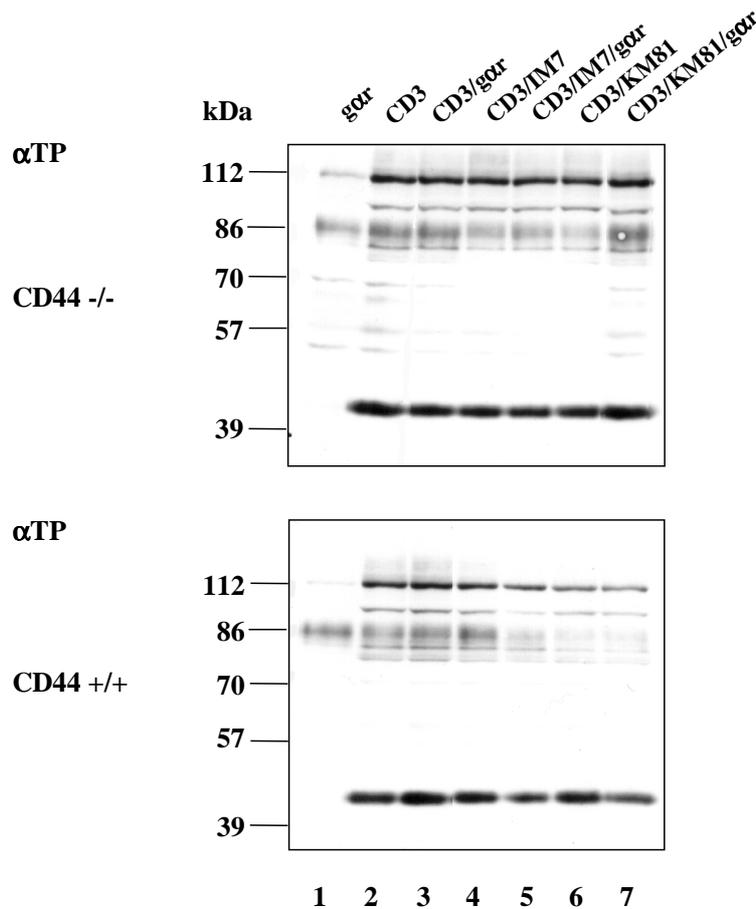


Abbildung 17: Keine Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 nach Stimulierung mit CD3- und CD44-Antikörpern in CD44 "Knockout" Mäusen.

5×10^6 murine T-Zellen, aus CD44 „Knockout“ Mäusen (in einem 129JxC57BL/6-Mäusestamm Hintergrund) und Kontrollmäusen (CD44+/+; C57BL/6), wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 μ g/ml; Spur 2-7) alleine, oder in Kombination mit dem CD44-Antikörper IM7 (Spur 4, 5) bzw. KM81 (Spur 6, 7; jeweils 20 μ g/ml) aktiviert (siehe 4.3.2). Zu den Ansätzen wurde gleichzeitig ein Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG (g α r); Spur 1, 3, 5, 7; jeweils 50 μ g/ml) zugegeben. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot α TP; 1:1000) erkennt, behandelt. Die Menge an Erk Protein wurde nicht quantifiziert, kann aber anhand des Tyrosin-Phosphorylierungsmusters abgeschätzt werden. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

5.2.7 Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 nach Stimulierung von T-Zelllinien mit CD3- und CD44-Antikörpern

Um die Wirkung der inhibierenden CD44-Antikörper auf die Signalübertragung in T-Zelllinien zu untersuchen und um festzustellen, ob ein vergleichbarer Signalübertragungsweg von CD44 über Erk2 wie in primären murinen T-Zellen existiert, wurden verschiedene Zelllinien in einem Vorversuch getestet. Wäre die Signalübertragung gleich, wäre für weitere Versuche das Problem der naturgemäß geringen Ausbeute an T-Zellen aus Mäusen beseitigt gewesen. Hierfür wurde zuerst die Oberflächenexpression von CD44 und CD3 auf verschiedenen murinen T-Zelllinien in einer FACS-Analyse überprüft, u.a. von 2.B.4.11- (von S. Pals freundlicherweise zur Verfügung gestellt), S49- (Hyman, 1973) und LB17-Zellen (Lugasi et al., 1990). Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen in der murinen T-Zelllinie 2.B.4.11 ($CD3^+$; $CD4^+$, $CD44^+$) war nicht mit CD3-Antikörpern induzierbar, da sie bereits voraktiviert war (Daten nicht gezeigt). Die Zelllinie S49 ($CD3^+$) exprimiert kein CD44 und war daher nicht verwendbar. Die murine T-Zelllinie LB17 exprimiert CD3, CD8 (Daten nicht gezeigt) und CD44 auf der Oberfläche (Abbildung 18). Nach Behandlung mit TPA exprimiert sie verstärkt die CD44-Standardform (CD44s) und zusätzlich die varianten CD44-Isoformen CD44v4 und CD44v6 (Sionov et al., 1997). Diese Eigenschaften machten diese Zelllinie zu einem Kandidaten für weitere Untersuchungen.

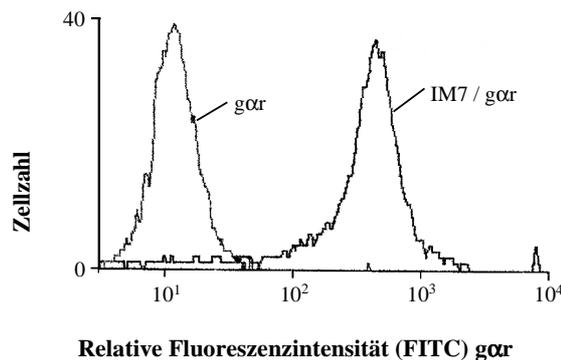


Abbildung 18: Anti-CD44-Färbung der murinen T-Zelllinie LB17.

LB17-Zellen (10^6 Zellen) wurden mit dem CD44-Antikörper IM7 ($10 \mu\text{g/ml}$) und anschließend mit einem FITC-konjugierten Ziegen Serum gegen Ratten IgG ($g\alpha r$; 1:500) inkubiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In den Diagrammen ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

Die murine T-Zelllinie LB17 wurde mit dem CD44-Antikörpern IM7 in Kombination mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 behandelt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen wurde in einer SDS-PAGE / Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist, nachgewiesen (Abbildung 19).

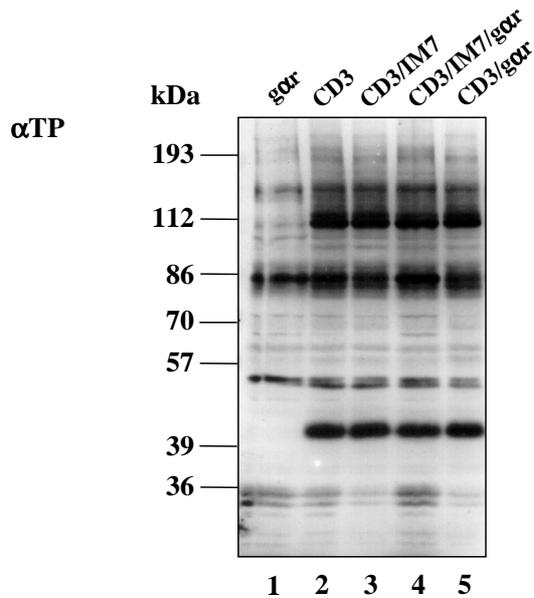


Abbildung 19: LB17-Zellen zeigen keine Hemmung der Anti-CD3 aktivierten Erk2 Phosphorylierung in Anwesenheit des CD44-Antikörpers IM7.

Die Zelllinie LB17 (5×10^6 Zellen) wurde mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2-5) alleine, oder in Kombination dem CD44-Antikörper IM7 (jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$; Spur 3, 4) aktiviert. Zu den Ansätzen wurde gleichzeitig ein Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG ($g\alpha r$); Spur 4, 5; jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Zellen wurden parallel nur mit dem Zweitantikörper ($g\alpha r$; Spur 1) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend

einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot αTP ; 1:1000) erkennt, behandelt. Die Menge an Erk Protein wurde nicht quantifiziert, kann aber anhand des Tyrosin-Phosphorylierungsmusters abgeschätzt werden. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Aktivierung der Zelllinie LB-17 mit CD3-Antikörpern bzw. Concanavalin A führte zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen, die sich in einigen Banden unterschieden (siehe auch Abbildung 26). Das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster von primären T-Zellen und LB17-Zellen nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern zeigt ebenfalls geringfügige Unterschiede (vergleiche Abbildungen 13 bzw. 14 mit Abbildung 19 bzw. 26) z.B. wird das 56 kDa Protein in LB17-Zellen nicht phosphoryliert und ein Protein von 52 kDa ist konstitutiv phosphoryliert. Die Aktivierung der T-Zelllinie mit 145-2C11 in Verbindung mit IM7 führte jedoch zu keiner verminderten Tyrosin-Phosphorylierung der Erk2-Kinase. Dies weist darauf hin, daß eventuell Signalübertragungskomponenten in dieser Zelllinie verloren gegangen sind.

5.2.8 Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Behandlung von T-Zellen aus CD44 v Transgenen Mäusen mit CD3- und CD44-Antikörpern

Die Wirkung verschiedener varianter CD44 Isoformen auf die Metastasierung und T-Zellaktivierung ist bekannt. Der Antikörper 1.1ASML, der gegen das variante Exon v6 aus der Ratte gerichtet ist, ist in der Lage, die T-Zell-Aktivierung, aber auch die Lungenmetastasierung der malignen, transformierten Zelllinie BSp73ASML zu blockieren und hat daher möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die Signalübermittlung dieser varianten CD44-Isoform (Günthert et al., 1991; Seiter et al., 1993). Ruhende T-Lymphozyten exprimieren keine varianten CD44-Isoformen. Daher wurden als ein gutes Modell zur Untersuchung der Signalübertragung dieser Isoformen transgene Mäuse herangezogen, deren T-Zellen konstitutiv auf ihrer Oberfläche eine CD44 Isoform exprimieren (Moll et al., 1996). Diese variante Isoform enthält die in den varianten Exons v4-v7 kodierte Aminosäuresequenzen aus der Ratte. Sie wird unter der Kontrolle des Thy-1-Promotors und eines IgG schwere Ketten-

Enhancers exprimiert. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort dieser Mäuse ist beschleunigt. Diese beschleunigte T-Zellantwort kann spezifisch durch den Antikörper 1.1ASML gehemmt werden, der nur die variante Isoform v6 aus der Ratte erkennt. Es wurde nun untersucht, ob sich dieses Phänomen auch auf die Aktivierung von PTK widerspiegelt. Hierfür wurden getestet, ob die Kinetik der CD3 induzierten Signalübermittlung in diesen Mäusen beschleunigt ist und ob diese beschleunigte Signalübertragung durch 1.1ASML gehemmt werden kann. Es wurde auch geprüft, ob die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Stimulierung dieser T-Zellen mit einem CD3-Antikörper durch den Antikörper 1.1ASML inhibiert werden kann. Schließlich wurde auch die Frage beantwortet, ob die Aktivierung von Erk2 durch die Signalübertragung über CD44-Standardformen, wie in normalen Mäusen bereits gezeigt, auch in CD44v transgenen Mäusen inhibiert wird. Die Expression des transgenen Konstrukts in den verwendeten Mäusen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse (Abbildung 20) überprüft. Die T-Zellen wurden mit dem CD44-Antikörper 1.1ASML und einem PE-konjugierten Kaninchenserum gegen Maus Immunglobuline inkubiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem T-Zellmarker CD4 gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

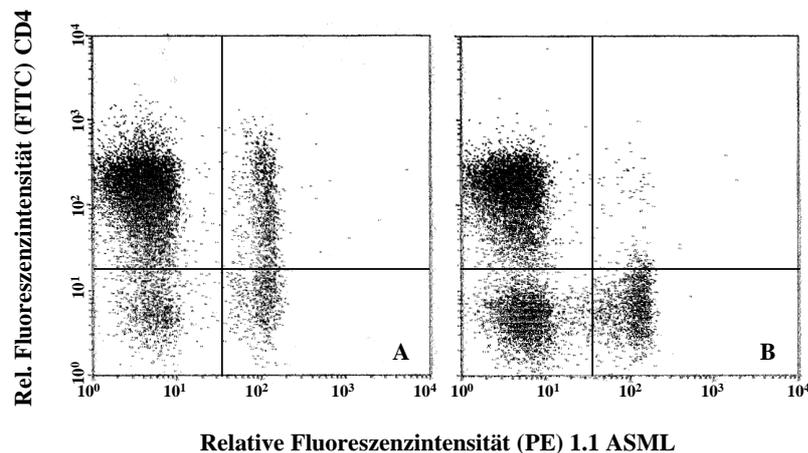


Abbildung 20: Oberflächenexpression von varianten CD44-Isoformen aus der Ratte auf T-Zellen von CD44v Transgenen Mäusen.

T-Zellen (5×10^5 Zellen) wurden mit dem CD44-Antikörper 1.1ASML (10 $\mu\text{g/ml}$) und anschließend mit einem PE-konjugierten Kaninchenserum gegen Maus IgG (1:500) inkubiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem T-Zellmarker CD4 gefärbt (Anti-CD4 FITC) und mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In den Diagrammen ist die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) der CD4-Färbung gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) der 1.1ASML-Färbung aufgetragen.

Anhand der FACS-Analyse wurde deutlich, daß die transgene Maus (A) die varianten CD44-Isoformen im Gegensatz zur Wildtyp Maus (B) exprimiert. Doppeltpositive Zellen sind nach Färbung mit 1.1ASML und CD4 nur in Abbildung A vorhanden (vergleiche die rechten, oberen Quadranten der Abbildung 20.A und B). Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationen wurde die Expression der varianten CD44-Isoformen der eingesetzten Mäuse durch eine FACS-Analyse kontrolliert.

Die T-Zellen wurden mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in Kombination mit den CD44-Antikörpern 1.1ASML bzw. IM7 für 2 Minuten behandelt und in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten wie beschrieben analysiert.

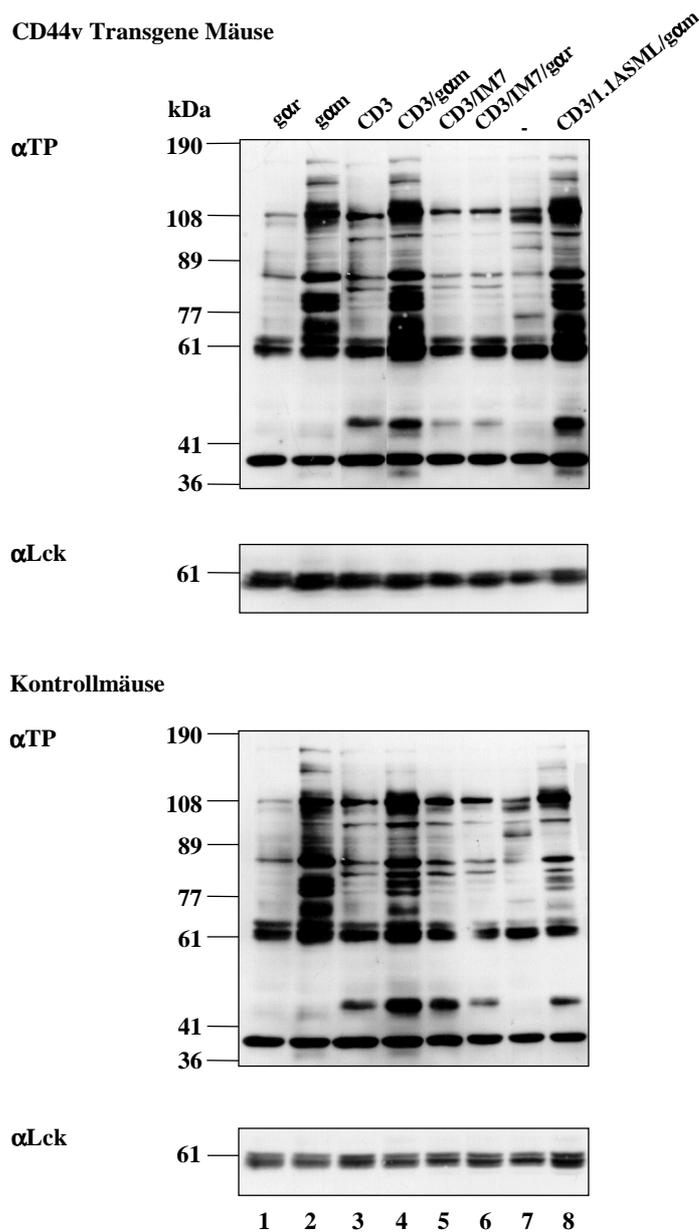


Abbildung 21: Der CD44v6-Antikörper 1.1ASML blockiert nicht die Tyrosin-Phosphorylierung von Erk2 bzw. anderer intrazellulärer Proteine nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern in CD44v Transgenen Mäusen.

5×10^6 murine T-Zellen, aus CD44v Transgenen Mäusen (in einem C57BL/6-Mäusestamm Hintergrund) und Kontrollmäusen (C57BL/6), wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Spur 3-8) alleine, oder in Kombination dem CD44-Antikörper IM7 (Spur 5, 6) bzw. 1.1ASML (Spur 7, 8; jeweils 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aktiviert (siehe 4.3.2). Zu den Ansätzen wurde gleichzeitig ein Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgG ($g\alpha r$); Spur 6 oder Goat Anti-Maus IgG ($g\alpha m$); Spur 8; jeweils 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. In der mit einem Strich (-) markierten Spur wurden die Antikörper 145-2C11, 1.1ASML und der Zweitantikörper als Kontrolle, nach 2 minütiger Aktivierung, erst nach der Zellyse zugegeben. Kontrollansätze (Spur 1, 2) wurden nur mit dem indizierten Zweitantikörper für 2 min aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot αTP ; 1:1000) und die $p56^{\text{Lck}}$ Kinase (1:1000; Blot αLck) erkennen, behandelt. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Es zeigte sich, daß das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der CD44v transgenen Mäuse und der Kontrollmäuse nach zweiminütiger Anti-CD3-Aktivierung ähnlich war (Abbildung 21; Spur 3). Proteine, aus CD44v transgenen Mäusen, von 56-85 kDa waren zwar stärker als Proteine aus Kontrollmäusen phosphoryliert, aber Erk2 war schwächer phosphoryliert (Spur 4). Dies zeigt, daß die Anti-CD3 induzierte Signalübermittlung in diesen Mäusen nicht beschleunigt ist. 1.1ASML induzierte per se keine Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen (Daten nicht gezeigt). In Kombination mit CD3-Antikörpern inhibiert er die Phosphorylierung von Proteine wie z.B. Erk2 nicht. Die Signalübermittlung über CD44 Standardformen inhibierte die Phosphorylierung von Erk2 wie in den Kontrollmäusen. Da CD44 variante Isoformen bei der Signalübertragung *via* Tyrosin-Phosphorylierung keine Rolle zu spielen scheinen oder die Signalübermittlung nicht über Erk2 verläuft, wurde diese Signalübertragung nicht weiter untersucht.

5.2.9 Tyrosin-Phosphorylierung der TCR ζ -Kette nach Behandlung der T-Zellen mit CD3- und CD44-Antikörpern

Die Stimulierung des TCR/CD3-Komplex führt zu einer Aktivierung von Kinasen, die z.T. linear angeordnet sind. Erk2 ist in dieser Abfolge „stromabwärts“ angeordnet. Eines der ersten Substrate der PTK ist die TCR ζ -Kette. Galandrini et al. (1993) konnten bereits zeigen, daß in primären humanen T-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 21 kDa mit dem CD3-Antikörper OKT3, aber nicht mit dem CD44-Antikörper J-173 induziert wird. Galandrini vermutete, daß es sich hierbei um die TCR ζ -Kette handelt. Die murine TCR ζ -Kette in T-Zellen aus Lymphknoten ist konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert und kann daher nicht durch CD3-Antikörper phosphoryliert werden (van Oers et al., 1994; Gary-Goug et al., 1997). Van Oers et al. (1993) konnten zeigen, daß die TCR ζ -Kette in Abhängigkeit von der Aufreinigungsmethode der T-Zellen entweder konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert bleibt oder dephosphoryliert wird. Eine Kultur der T-Zellen für 4 Stunden bei 37 °C induziert die Dephosphorylierung. Die erneute Tyrosin-Phosphorylierung der TCR ζ -Kette ist daraufhin mit CD3-Antikörpern induzierbar (Chan et al., 1991; van Oers et al., 1996). Es war also nicht klar, ob die murine TCR ζ -Kette unter den verwendeten Aufreinigungsbedingungen dephosphoryliert wird.

Die Signalübermittlung des TCR/CD3-Komplexes scheint in humanen und murinen T-Zellen unterschiedlich zu sein, so sind z.B. in humanen T-Zellen zwei verschiedene Isoformen der TCR ζ -Kette (p21 und p23) konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert, im Gegensatz zu murinen T-Zellen, in denen nur ein 21 kDa Protein Tyrosin-phosphoryliert ist (Orloff et al., 1989). Daher wurde geprüft, ob die inhibierenden CD44-Antikörper, die die Aktivierung von Erk2 hemmen, auch die Aktivierung der TCR ζ -Kette beeinflussen.

Die aufgereinigten T-Zellen wurden entweder nicht aktiviert oder mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 für zwei Minuten aktiviert und in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten analysiert. Hierdurch konnte ermittelt werden, ob mit der eingesetzten Aufreinigungsmethode die TCR ζ -Kette konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert bleibt oder dephosphoryliert wird und ob es möglich ist, die Tyrosin-Phosphorylierung der TCR ζ -Kette mit 145-2C11 zu induzieren. Um eine mögliche Wirkung der inhibierenden CD44-Antikörper auf die Tyrosin-Phosphorylierung der murinen TCR ζ -Kette zu untersuchen, wurden die T-Zellen zusätzlich mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 in Kombination mit IM7, KM81, einem KM81 F(ab')₂-Fragment bzw. R7166.7 behandelt.

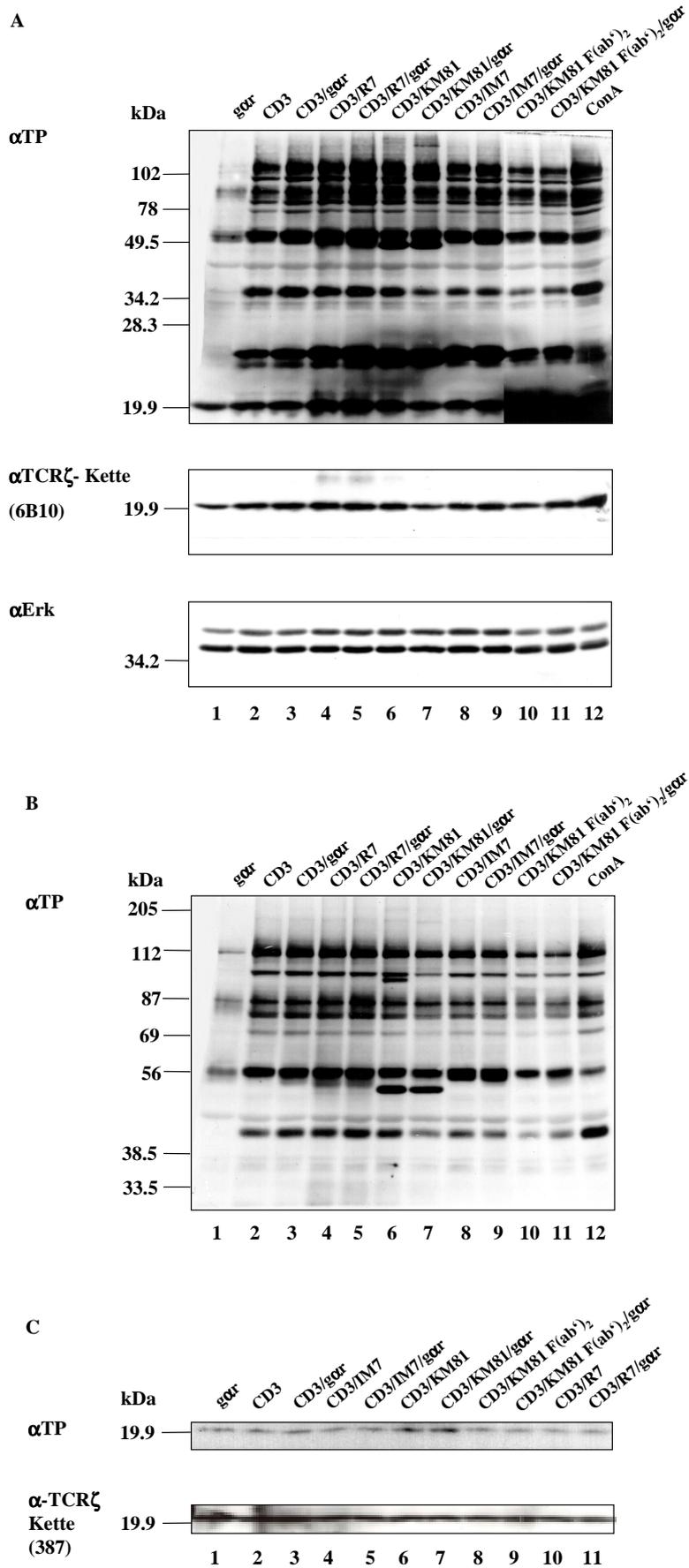


Abbildung 22: Keine Änderung der Tyrosin-Phosphorylierung der TCRζ Kette nach Aktivierung mit CD3- und CD44-Antikörpern. Legende auf nächster Seite oben

Legende zu Abbildung 22:

1×10^7 primäre murine T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper 145-2C11 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2-11) alleine, oder in Kombination mit den CD44-Antikörpern R7166.7 (R7), KM81, KM81 (Fab')₂ bzw. IM7 (jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$) und einem Zweitantikörper (Ziege Anti-Ratte IgGs (g α r); jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$; Spur 3, 5, 7, 9, 11) aktiviert (siehe 4.3.2). Die Zellen wurden parallel mit einem Zweitantikörper (g α r; Spur 1) oder mit Concanavalin A (10 $\mu\text{g/ml}$; wie indiziert) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden mittels 8 % (Abbildung 22.B), 12 % (Abbildung 22.A) bzw. 13 % (Abbildung 22.C) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membranen wurden mit den nachfolgend aufgeführten Antikörpern behandelt (Blot αTP ; 1:1000), die TCR ζ Kette (Blot $\alpha\text{TCR}\zeta$ Kette; Klon: 6B10); oder Blot $\alpha\text{TCR}\zeta$ Kette (Klon: 387; jeweils 1:500) bzw. die Erk-Kinase (1:2000; Blot αErk). Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Proteinextrakte wurden in 12 %-igen bzw 13 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, um die TCR ζ -Kette (21 kDa) in der Immunoblot-Analyse mit Antikörpern, die gegen die TCR ζ -Kette gerichtet sind (6B10; Abbildung 22.A bzw. 387; Abbildung 22.C), besser nachweisen zu können. Die TCR ζ -Kette war konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert (Abbildung 22.A und 22.C: Spur 1), und wurde mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 nicht verstärkt phosphoryliert (Abbildung 22.A und 22.C: Spur 2;). Eine verminderte Tyrosin-Phosphorylierung der konstitutiv phosphorylierten TCR ζ -Kette war nach Behandlung mit 145-2C11 in Kombination mit IM7 bzw. KM81, unter Bedingungen in denen Erk2 weniger Tyrosin-phosphoryliert wurde (Abbildung 22.B), nicht nachweisbar. Die mit dem TCR ζ -Kette Antikörper 6B10 erhaltenen Ergebnisse wurden mit dem Antikörper 387, der auch gegen die TCR ζ -Kette gerichtet ist, aber gegen ein anderes Epitop, bestätigt. Dies bedeutet, daß die gewählte Aufreinigungsmethode der T-Zellen so schonend war, daß die TCR ζ -Kette nicht dephosphoryliert wurde und daher nicht mit 145-2C11 hyperphosphoryliert werden konnte. Intramolekulare Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster der TCR ζ -Kette können mit der verwendeten Methode nicht ausgeschlossen werden.

In Abbildung 22.A und B ist erkennbar, daß IM7, KM81 und das KM81 F(ab')₂-Fragment eine 145-2C11 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen von 120, 100, 84, 80 42 (Erk2) und 35 kDa hemmten. KM81 inhibierte die Phosphorylierung in Kombination mit einem Zweitantikörper. Die Signale von ca. 50 kDa in Spur 6 und 7 der Abbildung 22.B sind unspezifisch, da sie auch nach Zugabe der Antikörper nach Zellyse ebenfalls sichtbar sind (Daten nicht gezeigt). Der Kontrollantikörper R7166.7 hemmte die Tyrosin-Phosphorylierung dieser Proteine und der TCR ζ -Kette nicht.

Eine Dephosphorylierung von Lck (56 kDa) ist unter geeigneten Bedingungen d.h. Auftrennung unter nichtreduzierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese als scheinbare Zunahme im Molekulargewicht festzustellen. Unter den von mir gewählten reduzierenden Auftrennungsbedingungen war diese nicht erkennbar.

5.3 Signalübermittlung von Hyaluronsäure in murinen T-Zellen

Die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit aktivierenden humanen CD44-Antikörpern und die Hemmung der Phosphorylierung mit inhibierenden murinen Antikörpern läßt vermuten, daß unter physiologischen Bedingungen ein Ligand durch Bindung an CD44 Signale auslöst. Ein natürlicher Ligand, der auch in der Lymphozytenaktivierung eine Rolle spielt, ist Hyaluronsäure. Es ist bekannt, daß Hyaluronsäure in Verbindung mit TCR/CD3-Stimuli ein kostimulierendes Signal für die T-Zellproliferation von humanen primären T-Zellen ist (Galandrini et al., 1994a) und daher einen Einfluß auf die Signalübertragung durch den TCR haben könnte. Die durch Hyaluronsäure induzierte T-Zellproliferation kann durch CD44-Antikörper wie z.B. IM7 verhindert werden (Hamann et al., 1995). Deshalb war ein wichtiges, weiteres Ziel dieser Arbeit, die Signalübermittlung nach Aktivierung mit Hyaluronsäure in T-Zellen zu untersuchen (Bourguignon et al., 1993).

Es wurde überprüft, ob die Aktivierung mit Hyaluronsäure die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine induziert. Wäre eine Aktivierung mit Hyaluronsäure auch in T-Zellen möglich, stellt sich vor allem die Frage, ob identische Proteine in humanen T-Zellen phosphoryliert werden wie sie nach Aktivierung mit den CD44-Antikörpern J-173 und D2.1 beobachtet werden.

5.3.1 Signalübertragung von Hyaluronsäure in primären murinen T-Lymphozyten

Primäre T-Zellen exprimieren CD44, binden aber Hyaluronsäure nicht. DeGrendele et al. (1997a) konnten zeigen, daß man primäre murine T-Zellen aus Lymphknoten dazu bringen kann Hyaluronsäure zu binden, indem man sie mit CD3-Antikörpern, Concanavalin A oder 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) aktiviert. Eine Teilpopulation von etwa 20 % der Gesamtpopulation bindet nach 48-stündiger Aktivierung Hyaluronsäure. Da die Hyaluronsäure-Bindung durch den CD44-Antikörper KM81 gehemmt werden kann, wird sie durch CD44 und nicht durch einen anderen Hyaluronsäure-Rezeptor vermittelt.

Zur Induktion der Hyaluronsäure-Bindung wurden primäre murine T-Zellen mit TPA/Ionomycin aktiviert. Zur Kontrolle der Hyaluronsäure-Bindung von CD44 exprimierenden Zellen wurden sie mit FITC-Hyaluronsäure und dem CD44-Antikörper IM7 (Abbildung 23.B) inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert. IM7 blockiert die Hyaluronsäure-Bindung nicht bei der hier eingesetzten Konzentration. Die Spezifität der Hyaluronsäure-Bindung an CD44 wurde dadurch bewiesen, daß die Hyaluronsäure-Bindung durch den KM81-Antikörper unterdrückt wurde (Abbildung 23.C).

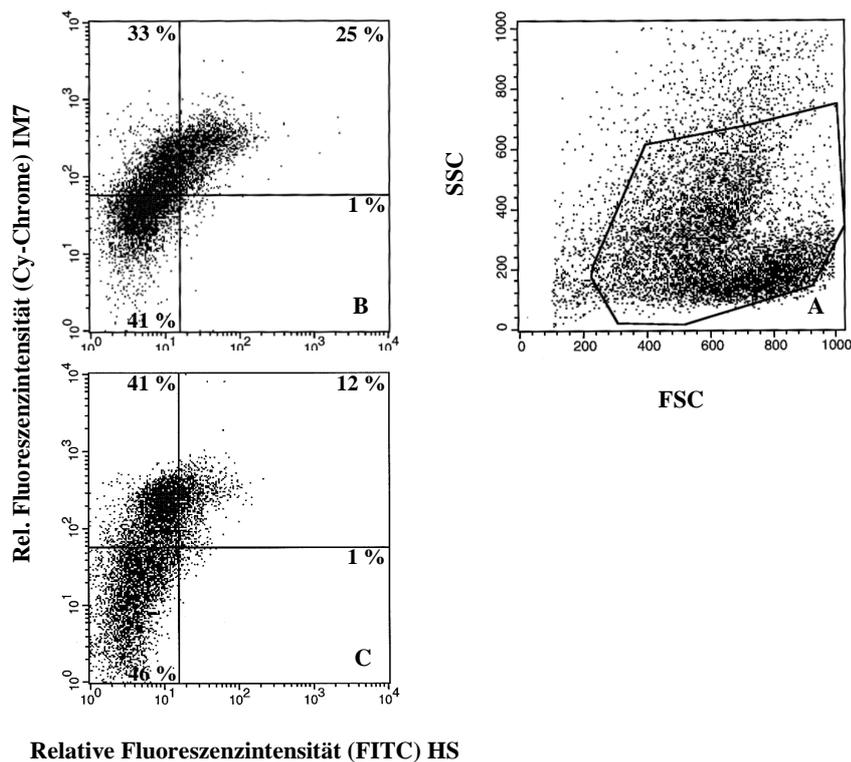


Abbildung 23: Induktion der Hyaluronsäure-Bindung in murinen T-Zellen mit TPA und Blockierung der Hyaluronsäure-Bindung durch den CD44-Antikörper KM81.

Zur Induktion der Hyaluronsäure-Bindung wurden aufgereinigte primäre murine T-Zellen 48 Stunden mit TPA (60 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (siehe 4.2.7). 10^6 Zellen wurden mit dem CD44-Antikörper IM7-Cy-Chrome (10 µg/ml) und mit FITC-Hyaluronsäure (1:50; siehe 4.2.9) gefärbt (Abbildung 21.A-B). Zur Blockierung der Bindung von FITC-Hyaluronsäure an CD44 wurden 100 µg/ml des CD44-Antikörpers KM81 für 15 min vor Zugabe von Hyaluronsäure zugegeben (23.C). Die gefärbten Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In den Diagrammen B und C ist die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) der IM7-Färbung gegen relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) der Hyaluronsäure-Färbung aufgetragen. In dem Dot-Diagramm A ist das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) aufgetragen.

Etwa 25 % der primären murinen T-Zellen haben nach Aktivierung mit Concanavalin A oder mit TPA und Ionomycin Hyaluronsäure und IM7 gebunden. Diese Bindung war mit KM81 zu 50 % blockierbar (vergleiche die statistische Auswertung der rechten, oberen Quadranten der Abbildung 23.B (25 %) und C (12 %)). In primären humanen T-Zellen war eine Induktion der Hyaluronsäure-Bindung, wie es bereits gezeigt worden war, nicht möglich (Daten nicht gezeigt; Levesque und Haynes, 1996).

Zur Induktion der Hyaluronsäure-Bindung wurden primäre murine T-Zellen mit TPA/Ionomycin aktiviert, danach mit Hyaluronsäure behandelt und in Tyrosin-Phosphorylierungsexperimenten eingesetzt. Eine Aktivierung der primären T-Zellen entweder mit TPA alleine oder in Anwesenheit von Ionomycin oder mit Hyaluronsäure für 2, 5, 15 oder 30 min induzierte keine Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen (Daten nicht gezeigt).

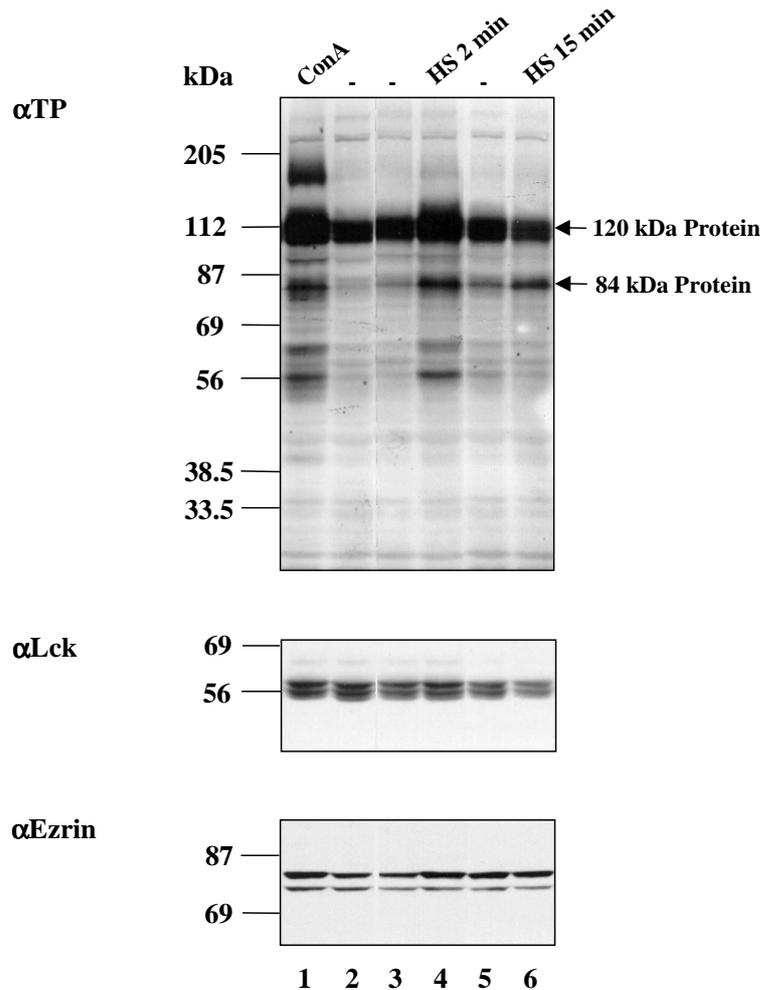


Abbildung 24: Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen nach Stimulierung mit Hyaluronsäure in murinen TPA behandelten T-Zellen.

Zur Induktion der Hyaluronsäure-Bindung wurden primäre murine T-Zellen 48 Stunden mit TPA (60 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (siehe 4.2.7). Die Zellen (5×10^6 Zellen) wurden mit Hyaluronsäure (HS; jeweils 500 μ g/ml; Spur 4, 6) für die angegebenen Zeiten aktiviert. Die mit einem Strich (-) markierten Spuren dienten als Kontrolle: Hyaluronsäure wurde ohne (Spur 2), nach 2 minütiger (Spur 3) bzw. nach 15 minütiger (Spur 5) Aktivierung, erst nach der Zellyse zugegeben. Die Zellen wurden parallel mit Concanavalin A (10 μ g/ml; Spur 1) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot α TP-HPR; 1:1000), Lck (1:1000; Blot α Lck) und Ezrin (1:500; Blot α Ezrin) erkennen, behandelt. Das Protein von 84 kDa und von 120 kDa ist indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Eine Induktion der Hyaluronsäure-Bindung mit TPA und anschließender Aktivierung der Zellen mit Hyaluronsäure induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung am stärksten bei einem 84 kDa Protein und weniger ausgeprägt bei einem 56 kDa und 120 kDa Protein (Abbildung 24). Die Aktivierung mit Concanavalin A induzierte ebenfalls die Phosphorylierung dieser Proteine und diente als positive Kontrolle. Die Erk2-Kinase (42 kDa) wurde nach Aktivierung mit Concanavalin A in diesem Experiment nur schwach phosphoryliert. Sie wurde nicht nach

Aktivierung mit Hyaluronsäure phosphoryliert. Bei dem 56 kDa Protein handelt es sich um Lck (Abbildung 24; Blot α Lck), bei dem 120 kDa Protein könnte es sich um c-Cbl (120 kDa) handeln. Ein naheliegender Kandidat für das 84 kDa Protein wäre Ezrin. Ezrin (81 kDa) ist ein Protein, das nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern in T-Zellen Tyrosin-phosphoryliert wird (Egerton et al., 1992a) und an CD44 bindet. Das Molekulargewicht des durch Hyaluronsäure induzierten Proteins stimmt nicht mit Ezrin überein. Dies konnte durch Überlagerung der Expositionen und Vergleich der Banden gezeigt werden (Blot α Ezrin). Da auch sämtliche andere in Frage kommenden Proteine wie z.B. Stat1- bzw. Stat3- Isoformen oder die PI3-Kinase (vergleiche Abschnitt 5.4.1 und 5.1.3) im Molekulargewicht von dem 84 kDa Protein abweichen, bleibt die Identität des 84 kDa Proteins somit unklar. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird das 84 kDa Protein HARP (**H**yaluronic **A**cid **R**esponding **P**hosphoprotein) genannt.

Die Aktivierung primärer muriner T-Zellen mit Hyaluronsäure von großem Molekulargewicht (Healon; > 600 kDa) führte nicht zur Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß kleinere Hyaluronsäure-Fragmente für die gezeigten Effekte verantwortlich sein müssen.

5.3.2 Signalübertragung von Hyaluronsäure in murinen T-Zelllinien

Um HARP zu isolieren und biochemisch zu charakterisieren, ist es nötig, größere Zellzahlen zu aktivieren. Naturgemäß ist die T-Zellzahl, die aus Mäusen gewonnen werden kann, begrenzt. Deshalb wurden verschiedene murine T-Zelllinien getestet, inwieweit diese auf Hyaluronsäure mit einer Tyrosin-Phosphorylierung von HARP reagieren. Um festzustellen, ob ein vergleichbarer Signalübertragungsweg von Hyaluronsäure in murinen T-Zelllinien wie in primären T-Zellen existiert, wurde erneut die Zelllinie LB17 herangezogen (vergleiche Abschnitt 5.2.7). TPA induziert in LB17 Zellen die Expression von CD44 Standardformen und eine CD44 abhängige Hyaluronsäure-Bindung (Abbildung 25; Zahalka et al., 1995; Naor et al., Manuskript in Vorbereitung).

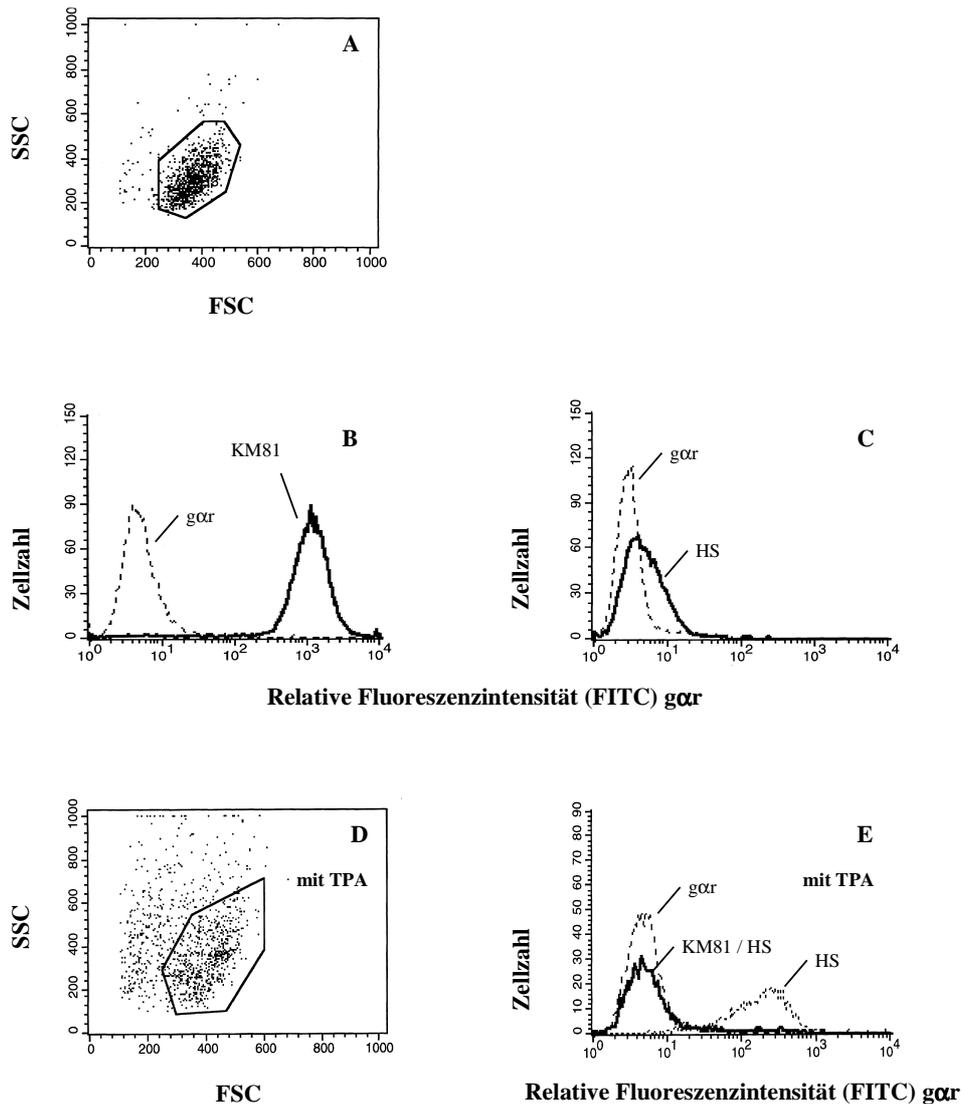


Abbildung 25.A-E: Blockierung der induzierten Hyaluronsäure-Bindung mit dem CD44-Antikörper KM81 in murinen T-Zelllinien.

LB17-Zellen (10^6 Zellen) wurden (Abbildung 23.A-B.) mit dem CD44-Antikörper KM81 (10 $\mu\text{g/ml}$) und anschließend mit einem FITC-konjugierten Ziegenserum gegen Ratten IgG ($\text{g}\alpha\text{r}$; 1:500) inkubiert. Parallel wurden die Zellen mit FITC-Hyaluronsäure (1:50; siehe 4.2.9) gefärbt (23.C). Zur Induktion der Hyaluronsäure-Bindung wurden die Zellen 12 Stunden mit TPA (60 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (siehe 4.2.7). Zur Blockierung der Bindung von FITC-Hyaluronsäure an CD44 wurden 100 $\mu\text{g/ml}$ des CD44-Antikörpers KM81 für 15 min vor Zugabe von Hyaluronsäure zugegeben (23.D-E). Die gefärbten Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 4.2.8). Jeweils 10 000 Zellen wurden ausgewertet. In den Histogramm-Diagrammen B,C und E ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. In den Dot-Diagrammen A und D ist das Seitwärtstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtstreulicht (FSC) aufgetragen.

Eine Aktivierung der LB-Zellen entweder mit TPA und Ionomycin für 5 min oder mit Hyaluronsäure für 2, 5, 15 oder 30 min induzierte keine Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen (vgl. 5.3.1; Daten nicht gezeigt). Wenn die Hyaluronsäure-Bindung in den Zellen hingegen mit TPA für 12 Stunden induziert wurde und dann erst die Hyaluronsäure für 2, 5 oder 10 min zugegeben wurde, konnte eine Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung eines 120 kDa und eines 84 kDa Proteins (HARP; Abbildung 26) beobachtet werden.

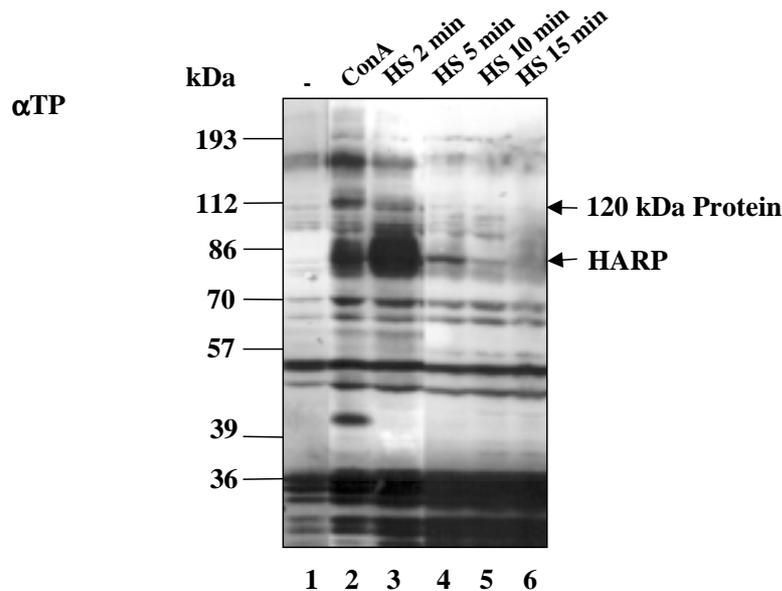


Abbildung 26: Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen nach Voraktivierung mit TPA und Stimulierung mit Hyaluronsäure.

Die Zelllinie LB17 wurde für 12 Stunden mit TPA (60 ng/ml) kultiviert (siehe 4.2.7). Die Zellen (5×10^6 Zellen) wurden mit Hyaluronsäure (HS; jeweils 500 $\mu\text{g/ml}$; Spur 3-6) für die angegebenen Zeiten aktiviert. In der mit einem Strich (-) markierten Spur wurde Hyaluronsäure, nach 2 min Aktivierung, als Kontrolle erst nach der Zellyse zugegeben. Die Zellen wurden parallel mit Concanavalin A (10 $\mu\text{g/ml}$; Spur 2) aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3). Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde mit einem Antikörpern, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot $\alpha\text{TP-HPR}$; 1:1000) erkennt, behandelt. Die Menge der geladenen Proteine wurde nicht kontrolliert, kann aber anhand des Tyrosin-Phosphorylierungsmusters z.B. des 36 kDa Proteins abgeschätzt werden. Das 84 kDa Protein (HARP) und das 120 kDa Protein sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Aktivierung mit CD3-Antikörpern und Concanavalin A induzierte ebenfalls die Phosphorylierung dieser Proteine. Die Erk2-Kinase (42 kDa) wurde nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern oder Concanavalin A, aber nicht nach Aktivierung mit Hyaluronsäure phosphoryliert. Im Gegensatz zur Aktivierung von Lck ist die Tyrosin-Phosphorylierung von HARP und des 120 kDa Proteins nach Stimulierung mit Hyaluronsäure also in murinen primären T-Zellen und T-Zelllinien gleich.

Die Zelllinie H9 bindet konstitutiv Hyaluronsäure (Sionov und Naor, 1997) und ist durch Selektion von LB17-Zellen auf Hyaluronsäure-Bindung hervorgegangen. Eine Verwendung dieser Zelllinie wäre von Vorteil, da die Voraktivierung mit TPA wegfallen würde. Es zeigte sich, daß viele Proteine nicht aktivierter Zellen bereits Tyrosin-phosphoryliert waren und eine weitere Aktivierung mit CD3-Antikörpern, Concanavalin A oder Hyaluronsäure nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

5.4 Identifizierung von HARP

Die Bindung von Hyaluronsäure und von CD44-Antikörpern an CD44 induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen (siehe Abschnitt 5.1.3 und 5.3). Ein Protein von 84 kDa (HARP) und ein Protein von 120 kDa wurde mit beiden Stimuli Tyrosin-phosphoryliert. Daß es sich in murinen und humanen T-Zellen bei beiden Proteinen um homologe Proteine handelt ist wahrscheinlich, da Proteine von gleichem Molekulargewicht auch mit CD3-Antikörpern phosphoryliert wurden. HARP war von besonderem Interesse, weil die Intensität der Bande im SDS-Polyacrylamidgel nach Aktivierung mit Hyaluronsäure besonders stark war. Daher wurde der Schwerpunkt der weiteren Experimente auf die Identifizierung dieses Proteins ausgerichtet. Wie zuvor bereits gezeigt, werden Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht nach Aktivierung mit CD3- und CD44-Antikörpern Tyrosin-phosphoryliert (Abschnitt 5.1.3; Galandrini et al., 1993). Die Aktivierung von CD3 war im allgemeinen stärker und besser reproduzierbar als die Aktivierung von CD44 mit CD44-Antikörpern (Taher E.I. Taher; persönliche Mitteilung). Dies könnte im Zusammenhang mit der Heterogenität der primären humanen T-Zellen unterschiedlicher Spender stehen. Auch bei der Hyaluronsäure-Aktivierung in primären murinen T-Zellen sind die Signale schwächer und es gab starke Schwankungen in der Intensität zwischen einzelnen Experimenten. Die Zelllinie LB17 wurde nicht verwendet, da sich die Morphologie der Zellen nach längerer Kultivierung stark veränderte und die Zellen dann nicht mehr Hyaluronsäure aktivierbar waren. Daher wurden während der Optimierung der Aufreinigungsbedingungen humane T-Zellen mit CD3-Antikörpern aktiviert. Es wurden humane, keine murinen T-Zellen verwendet, weil eine größere Anzahl an Zellen zur Verfügung stand. In folgenden Experimenten sollte zur Identifizierung von HARP die Signalübertragung mit CD44-Antikörpern in humanen T-Zellen induziert werden. Hyaluronsäure konnte nicht verwendet werden, da humane T-Zellen auch nach Voraktivierung mit TPA keine Hyaluronsäure binden (Abschnitt 5.3.1).

Zur Identifizierung von HARP wurden zuerst isoelektrische Fokussierungen (IEF) vollzogen, um den isoelektrischen Punkt (IEP) des Proteins zu ermitteln. Der IEP von HARP sollte mit denen von anderen Proteinen verglichen werden, die ein Molekulargewicht von etwa 84 kDa besitzen. Zugleich konnte festgestellt werden, ob es sich bei dem Signal von 84 kDa um ein oder mehrere Tyrosin-phosphorylierte Proteine handelt.

5.4.1 Zweidimensionale Auftrennung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist aufgrund ihrer hohen Auflösung eine geeignete Methode zur Auftrennung eines komplexen Proteingemischs. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen wurde mit dem CD3-Antikörper OKT3 in humanen T-Zellen stimuliert. Die Proteine wurden in der ersten Dimension anhand ihres IEP aufgetrennt. Der pH-Gradient wurde mit Hilfe von Ampholyten in einem zunächst breiten Bereich von pH 3,5 – 10 erzeugt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts mittels eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und Tyrosin-phosphorylierte Proteine wurden in einem Immunoblot nachgewiesen. Die meisten Tyrosin-phosphorylierten Proteine, darunter auch HARP, hatten zwar unterschiedliche Molekulargewichte, aber den gleichen IEP von pH 7,5 (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ein pH-Gradient von pH 5-8 erzeugt, um den Bereich um pH 7 besser auftrennen zu können (Abbildung 27). Hierdurch wurde festgestellt, ob es sich bei HARP um ein einziges Protein oder um ein Proteingemisch handelt.

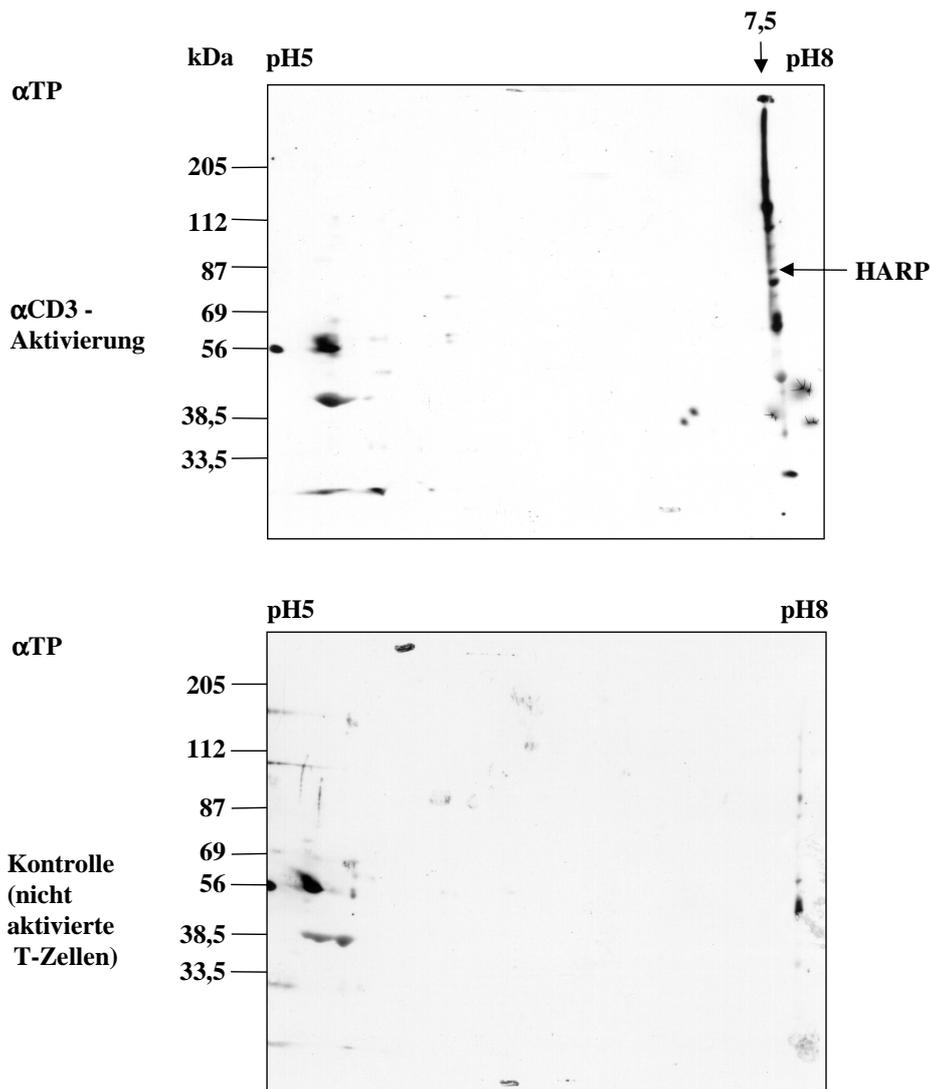


Abbildung 27: Auftrennung Tyrosin-phosphorylierter Proteine nach Aktivierung mit dem CD3-Antikörper OKT3 in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese.

2×10^7 primäre humane T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgGs ($\text{g}\alpha\text{m}$); jeweils 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aktiviert (siehe 4.3.2). Ein Kontrollansatz wurde nur mit dem Zweitantikörper aktiviert. Von den Zellen wurden Proteinlysate präpariert (siehe 4.3.3), die in der ersten Dimension einer isoelektrischen Fokussierung (siehe 4.3.7) mit einem pH-Gradienten von pH 5-8 aufgetrennt wurden. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.6) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 4.3.9) unterzogen. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt (Blot αTP ; 1:1000) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Kaninchen-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:1000) behandelt. HARP mit seinem IEP von pH 7,5 ist indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die meisten Tyrosin-phosphorylierten Proteine hatten, wahrscheinlich aufgrund ihrer überwiegend negativ geladenen Gruppen, auch nach verbesserter Auflösung denselben IEP von pH 7,5 (Abbildung 27). Nur ein Protein von 84 kDa war in der zweiten Dimension auftrennbar. Deshalb kann aus diesem Experiment die Schlußfolgerung gezogen werden, daß es sich bei dieser 84 kDa Bande nur um ein einziges Protein handelt und nicht um ein Proteingemisch und daß HARP einen IEP von 7,5 hat. Daher konnte auf die Verwendung von zweidimensio-

nen Gelen zur Isolierung von HARP verzichtet werden. Dies entspricht auch dem Befund in Thymozyten, in denen die meisten Tyrosin-phosphorylierten Proteine nach Aktivierung mit CD3-Antikörpern denselben isoelektrischen Punkt von pH 7,5 haben (Wakizaka et al., 1998). Um festzustellen, ob HARP identisch ist mit bekannten Molekülen, die nach TCR/CD3 Stimulierung Tyrosin-phosphoryliert werden, wurden potentielle Kandidaten mit einem Molekulargewicht von ca. 84 kDa getestet.

5.4.2 Immunpräzipitation der Tyrosin-phosphorylierten Proteine

Zur Identifizierung von HARP wurde nach Aktivierung von T-Zellen mit dem CD3-Antikörper OKT3, der die Phosphorylierung dieses Proteins induziert, eine Immunpräzipitation mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper durchgeführt. Es wurden Proteine von 120 (c-Cbl?), 84 (HARP), 56 (Lck) und 42 (Erk2) kDa in der anschließenden Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der ebenfalls Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt, detektiert (Abbildung 28). Um festzustellen, ob es sich bei HARP um Stat 1 β - bzw. Stat 3 β -Isoformen handelt, wurde der Blot nacheinander mit den entsprechenden Antikörpern hybridisiert. Beide Proteine haben ein Molekulargewicht von etwa 84 kDa und werden in T-Zellen Tyrosin-phosphoryliert (Lin et al., 1995a; Yu et al., 1996; Ng and Cantrell, 1997). Weitere Kandidaten, wie die PI3-Kinase (siehe 5.1.3) und Ezrin (siehe 5.3.1) konnten in humanen bzw. in murinen T-Zellen bereits ausgeschlossen werden.

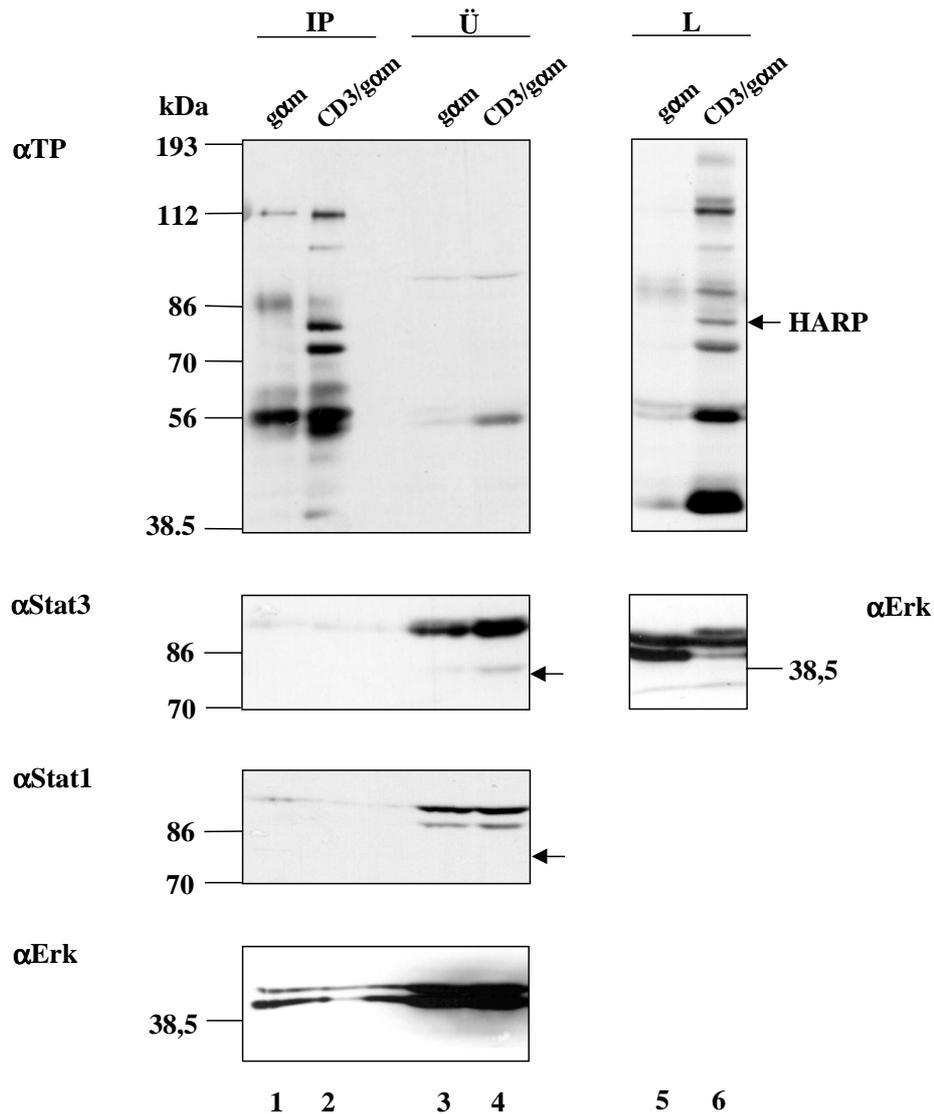


Abbildung 28: Immunpräzipitation der Tyrosin-phosphorylierten Proteine.

3×10^7 primäre humane T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 μ g/ml) in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgG ($g\alpha m$); jeweils 50 μ g/ml) aktiviert. Ein Kontrollansatz wurde nur mit dem Zweitantikörper aktiviert. Von den Zellen wurden Extrakte präpariert. Ein Aliquot der Proteinlysate wurde direkt in einem 6,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (L; siehe 4.3.6), auf eine PVDF-Membran übertragen und nacheinander mit Antikörpern, die gegen Tyrosin-Phosphate (Blot α TP; 1:1000) und gegen Erk-Kinase (Blot α Erk; 1:2000) gerichtet sind, detektiert. Aus dem Rest der Extrakte wurden Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Anti-Phospho-Tyrosin Agarose; 10 μ g) über Nacht bei 4 °C präzipitiert (IP; siehe 4.3.4). Diese wurden zusammen mit dem Überstand (Ü) der IP elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern, die Tyrosin-phosphorylierte Proteine (Blot α TP), Stat1 (Blot α Stat1) und Stat3 (Blot α Stat3) erkennen, behandelt. HARP (84 kDa) ist indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Abbildung 28 zeigt, daß die Größe von HARP nicht mit den getesteten Proteinen übereinstimmt. Die β -Isoformen von Stat1 bzw. Stat3 sind größer als HARP und werden unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist, präzipitiert. Vielmehr waren sie im Überstand der Im-

munpräzipitation nachweisbar. Es ist bekannt, daß IL-2 die Tyrosin-Phosphorylierung dieser Stat-Isoformen induziert. Ob CD3-Antikörper hierzu fähig sind, ist unklar. Bis zu diesem Zeitpunkt war es nicht möglich, einen Kandidaten für HARP, d.h. ein bekanntes Protein mit demselben Molekulargewicht wie HARP, zu bestimmen.

Es wurden quantitative Immunpräzipitationen mit dem Phospho-Tyrosin-Antikörper ausgeführt, um HARP im Proteingel sichtbar machen zu können. Ziel war es, das Protein möglichst rein zu isolieren und biochemisch zu identifizieren. Die präzipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt werden und mit Silber angefärbt. HARP sollte aus dem Proteingel ausgeschnitten und mit Hilfe einer massenspektrometrischer Analyse (MALDI: Matrix-assoziierte Laser Desorption/Ionisation Massen-Spektrometrie) identifiziert werden (Shevchenko et al., 1996; Lamond und Mann, 1997).

Um genügend Material für eine massenspektrometrische Analyse zu erhalten, wurde die Anzahl der humanen Zellen auf bis zu $1,8 \times 10^8$ erhöht. Die Präzipitate wurden auf 6,5 % Polyacrylamidgele aufgetragen, um HARP besser auftrennen zu können und einer Silberfärbung unterzogen. Parallel wurde mit einem Aliquot der Präzipitate eine Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist, vollzogen um die Aktivierung zu überprüfen.

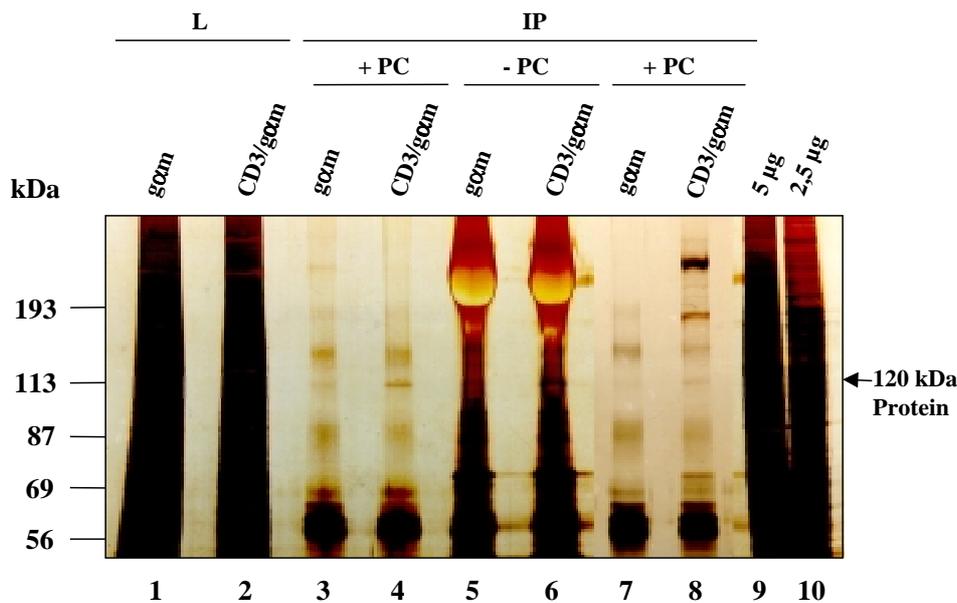


Abbildung 29: Silberfärbung der immunpräzipitierten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen.

Legende siehe nächste Seite oben

Legende zu Abbildung 29

Primäre humane T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 μ g/ml) in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgG (g α m); jeweils 50 μ g/ml) aktiviert. Ein Kontrollansatz wurde nur mit dem Zweitantikörper aktiviert. Von den Zellen wurden Extrakte präpariert. Ein Aliquot der Proteinlysate (aus 5×10^6 T-Zellen) wurde als Totallysatkontrolle in einem 6,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (L) und mit Silber angefärbt (siehe 4.3.8). Der Rest der Extrakte wurde aufgeteilt. Ein Teil der Lysate (aus $1,8 \times 10^8$ T-Zellen) wurde direkt mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist (Anti-Phospho-Tyrosin Agarose; 20 μ g) über Nacht bei 4 °C präzipitiert (IP; Spur 5, 6). Ein anderer Teil der Lysate (aus 10^7 T-Zellen; Spur 3, 4) wurde vor der Präzipitation, zum „Preclearing“ (PC), eine Stunde mit Streptavidin-Agarose inkubiert. Ein weiterer Teil der Extrakte (aus $4,5 \times 10^7$ T-Zellen; Spur 7, 8) wurde vor der Präzipitation, zum „Preclearing“ (PC) zweimal eine Stunde mit jeweils frisch zugefügter Streptavidin-Agarose inkubiert. Diese Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Auf das Proteingel wurden zusätzlich Proteinextrakte von 5 und 2,5 μ g, mittels Bradford-Analyse bestimmt, aufgetragen. Das Protein von 120 kDa ist indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Anhand der sensitiveren Immunoblot-Analyse wurde deutlich, daß die Stimulierung der T-Zellen mit dem CD3-Antikörper OKT3 die Tyrosin-Phosphorylierung des 120 kDa Proteins etwas stärker als von HARP induzierte (Daten nicht gezeigt). Dies ist der Grund, warum das Protein von 120 kDa im Gegensatz zu HARP im Silbergel erkennbar war (Abbildung 29: Spur 4, 6, 8). Die Menge der präzipitierten Proteinen kann abgeschätzt werden, da definierte Proteinmengen auf das Proteingel aufgetragen wurden (Spur 7: 5 μ g; Spur 8: 2,5 μ g). Die Nachweisgrenze im Silbergel liegt bei 2-5 ng Protein pro Bande (Current Protocols in Molecular Biology (1992)). Das Auftreten von unspezifisch bindenden Proteinen an die Agarose z.B. von Proteinen von circa 200 kDa konnte durch einen „Preclearing“ Schritt beseitigt werden (Spur 3, 4, 7, 8).

Eine Möglichkeit der Sichtbarmachung von HARP im Silbergel war die Erhöhung der Zellzahl, die in der Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Eine Erhöhung auf $6,5 \times 10^8$ T-Zellen erbrachte allerdings keine Verbesserung, da das Proteingel nun überladen war (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten wurde versucht, eine Verbesserung der Aufreinigung von HARP dadurch zu erzielen, indem eine Größenfraktionierung vorgenommen wurde. Hierzu wurden zum einen Filter (Amicon 100) verwendet, die Proteine größer 100 kDa abtrennen sollten. Nach Filtration von Proteinlysaten von aktivierten T-Zellen wurden die Proteine immunpräzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. Im Silbergel wurde deutlich, daß Proteine von 70-200 kDa während der Fraktionierung verloren gegangen waren, darunter auch HARP (Daten nicht gezeigt).

Zum anderen wurde versucht, HARP über Ionenaustauschersäulen aufzureinigen. Proteine werden bei diesem Verfahren aufgrund ihrer Nettoladung aufgetrennt. Der IEP von HARP war mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (siehe 5.3.1) bereits bestimmt worden und betrug 7,5. Die Puffer und pH-Bedingungen für die Ionenaustauschersäulen wurden aufgrund dieses IEP ausgewählt. Zwei Anionenaustauscher- (DEAE- und Q-Sepharose) und zwei Kationenaustauschersäulen (CM- und SP-Sepharose) wurden verwendet, jeweils ein schwacher (DEAE- bzw. CM-Sepharose) und ein starker (Q- bzw. SP-Sepharose) Austauscher. In einem Vorversuch wurde getestet, ob HARP überhaupt an die Säulen bindet und unter welchen Bedingungen und mit welcher Säule das Protein am besten eluiert werden kann. Hierzu wurden $1,7 \times 10^8$ T-Zellen benutzt und die eluierten Proteine direkt in einer SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine gerichtet ist, nachgewiesen.

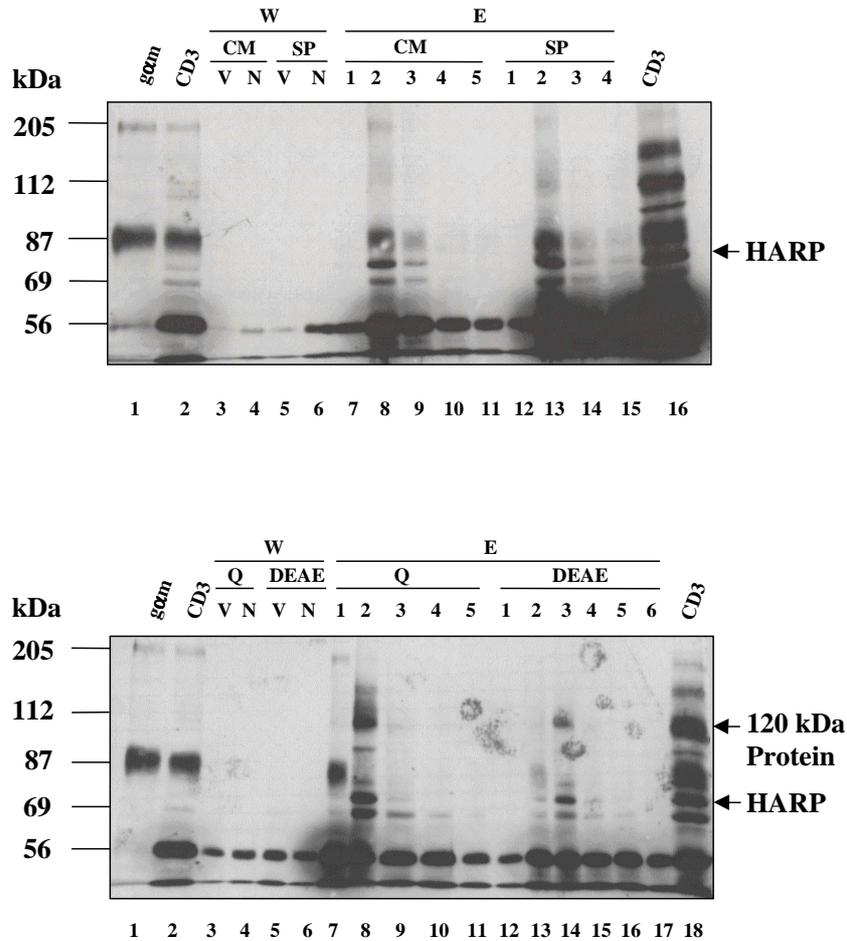


Abbildung 30: Aufreinigung der Proteine mittels Ionenaustauschersäulen.

$1,7 \times 10^8$ primäre humane T-Zellen wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper OKT3 (10 μ g/ml) in Kombination mit einem Zweitantikörper (Goat Anti-Maus IgG (g0m); jeweils 50 μ g/ml) aktiviert. Ein Kontrollansatz wurde nur mit dem Zweitantikörper aktiviert (Spur 1). Von den Zellen wurden Extrakte präpariert. Ein Aliquot der Proteinlysate (Spur 2) wurde zusammen mit Extrakten, in denen die Tyrosin-Phosphorylierung von HARP zuvor mittels Immunoblot überprüft worden war (Spur 16 (obere Abbildung) bzw. 18 (untere Abbildung)), direkt in einem 6,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Rest der Extrakte wurde auf je zwei Anionenaustauschersäulen (Q - bzw. DEAE - Sepharose) und je zwei Kationenaustauschersäulen (SP - bzw. CM - Sepharose) aufgetragen (siehe 4.3.5). Die Säulen wurden gewaschen (Waschfraktion_{vorher} (W/V)) und die gebundenen Proteine wurden in Fraktionen eluiert (E₁₋₆). Zur Regeneration wurden die Säulen erneut gewaschen (Waschfraktion_{nacher} (W/N)). Die Proteine in den Eluaten (E) und Waschfraktionen (W) wurden konzentriert (siehe 4.3.5), elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern, die gegen Tyrosin-Phosphate (Blot α TP; 1:1000) gerichtet sind, detektiert. HARP (84 kDa) und das 120 kDa Protein sind indiziert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Aktivierung der humanen T-Zellen mit OKT3 induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung von HARP und des 120 kDa Proteins. HARP hat an allen vier Ionenaustauschersäulen gebunden, aber mit unterschiedlicher Stärke und wurde bei allen Säulentypen bereits in der zweiten Fraktion eluiert (Abbildung 30). Die beste Abtrennung von anderen Proteinen um 84 kDa war mit Hilfe der DEAE-Anionenaustauschersäule möglich. Im Gegensatz dazu hat das 120 kDa

Protein nur an die Q-Anionenaustauschersäule gebunden. In den Waschfraktionen wurden keine Tyrosin-phosphorylierten Proteine gefunden. Im nächsten Experiment wurde versucht, HARP über die DEAE-Ionenaustauschersäule anzureichern und zusätzlich durch eine Immunpräzipitation mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper zu konzentrieren und weiter aufzureinigen. Das Präzipitat sollte dann elektrophoretisch aufgetrennt und im Silbergel bzw. in einem Immunoblot detektiert werden. Dies war jedoch nicht möglich, da eine Immunpräzipitation von Proteinen unter den Puffer- (Diethanolamin pH 9) und Salzbedingungen (1 M NaCl), die bei der Elution der Proteine von der Säule verwendet worden waren, nicht möglich war. Die Proteine müßten in weiteren Versuchen nach der Elution zusätzlich dialysiert werden, um eine Immunpräzipitation durchführen zu können. Die verschiedenen Strategien für die Aufreinigung von HARP sind in Abbildung 31 veranschaulicht dargestellt.

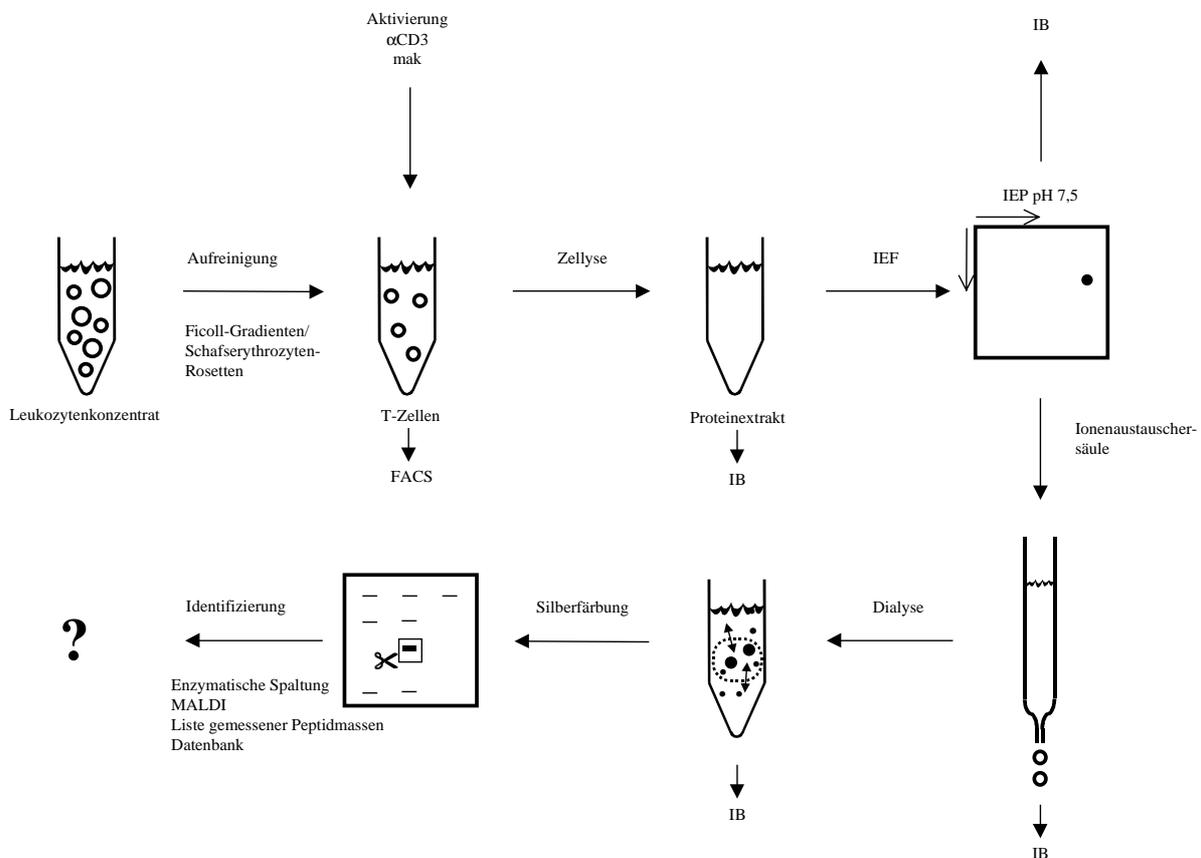


Abbildung 31: Strategien für die Aufreinigung des 84 kDa Proteins aus Leukozytenkonzentrat.

Schematische Darstellung der Methode der Aufreinigung von HARP aus Leukozytenkonzentrat humaner T-Zellen. In der Abbildung verwendete Abkürzungen: Immunoblot (IB) mit einem Antikörper, der Tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt; Isoelektrische Fokussierung (IEF); Isoelektrischer Punkt (IEP); Immunpräzipitation (IP) Tyrosin-phosphorylierter Proteine; monoklonaler CD3ε-Antikörper OKT3 (αCD3 mAk); Matrix-assoziierte Laser Desorption/Ionisation Massen-Spektrometrie (MALDI).

6 Diskussion

Das Oberflächenglykoprotein CD44 ist an unterschiedlichen Prozessen im Immunsystem und während der Hämpoiese beteiligt. Dazu gehören die T-Zellaktivierung, „Lymphozyten-Homing“, Lymphozytenreifung, Zellwanderungen und Zell-Zell-Wechselwirkungen (Jalkanen et al., 1986; Arch et al., 1992; Khaldoyanidi et al., 1996). CD44 hat bei der T-Zellaktivierung neben der Funktion der Zell-Zelladhäsion auch die Fähigkeit, Signale in die Zelle zu übertragen. So induziert CD44 in T-Zellen mit seinem natürlichen Liganden Hyaluronsäure oder mit aktivierenden CD44-Antikörpern eine „alternative“ Signalkette, die zur T-Zellproliferation führt. Diese Signalkette ist der nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR)/CD3-Komplexes induzierten Signalübertragung sehr ähnlich (Galandrini et al., 1993). Daraus ergab sich die Fragestellung, welche Kinasen auf molekularer Ebene an der Signalübertragung von CD44 beteiligt sind.

Die Realisierung dieses Vorhabens sollte auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits sollten die T-Zellen aus Mensch und Maus mit CD44-Antikörpern aktiviert werden. Andererseits sollte die Frage geklärt werden, ob es prinzipiell möglich ist, die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine in T-Zellen mit Hyaluronsäure zu induzieren.

Beide Strategien bergen Vor- und Nachteile. CD44-Antikörper binden CD44 unabhängig vom Aktivierungszustand der T-Zellen, stellen aber zugleich ein artifizielles System dar, da sie nicht den natürlichen Liganden darstellen. Die Verwendung von Hyaluronsäure als Stimulus ist physiologisch sinnvoller. Allerdings müssen ruhende T-Zellen erst durch Voraktivierung mit Phorbolestern oder TCR/CD3-Antikörper befähigt werden, Hyaluronsäure zu binden und die Signalübertragung zu induzieren.

6.1 CD44-Antikörper aktivieren die homotypische T-Zellaggregation und die T-Zellproliferation

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst humane T-Zellen mit CD44-Antikörpern behandelt. Dabei wurde der bisher noch nicht näher charakterisierte CD44-Antikörper D2.1 eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß D2.1 im Gegensatz zu dem CD44-Antikörper J-173 die homotypische T-Zellaggregation aktiviert. Dieser stimulierende Effekt von D2.1 auf die T-Zellaggregation führt auch, wie in der Einleitung beschrieben, zu verstärktem T-Zellwachstum. *In vivo* wird wahrscheinlich durch die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure die homotypische T-Zellaggregation und das T-Zellwachstum induziert.

Bei einer Koaktivierung humaner T-Zellen in Gegenwart des mitogenen CD3-Antikörpers OKT3 hatten J-173 und D2.1 sowohl bei der T-Zellaggregation als auch bei der T-Zellproliferation einen syngergistischen Effekt. Der koaktivierende Effekt von J-173 war bereits vorher gezeigt worden (Galandrini et al., 1993).

Mit Hilfe einer durchflußzytometrischen Analyse wurde gezeigt, daß ein Zweitantikörper, der den hemmenden Effekt der inhibierenden CD44-Antikörper verstärkt, die Oberflächenmoleküle CD3 und CD44 bindet. Dies läßt vermuten, daß eine Rezeptorwechselwirkung von CD3 und CD44 die Hemmung auslöst. Eine Rezeptorwechselwirkung von CD3 und CD44 wurden auch von Rothman et al. (1991) angenommen. Sie wurde aber nicht durch ein Quervernetzen der Oberflächenproteine CD3 und CD44 erzielt.

6.2 Aktivierende CD44-Antikörper induzieren die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine wie Erk2

In dieser Arbeit wurde geklärt, daß die Signalübertragung von CD44, die durch den CD44-Antikörper D2.1 induziert wird, Proteine aktiviert, welche im Signalübertragungsweg von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) liegen. Die Phosphorylierung derselben Proteine konnte auch mit dem aktivierenden CD44-Antikörper J-173 induziert werden (siehe Abbildung 6; Galandrini et al., 1993). Unter diesen Proteinen befand sich ein 42 kDa Protein, welches als Erk2 identifiziert werden konnte. Erk2 ist an der Signalübertragung vieler Oberflächenproteine beteiligt (Cerný et al., 1996). Weiterhin wurden Proteine von 35, 38, 56, 59, 84, 100, 112, 120, 150 und 200 kDa nach Aktivierung mit beiden CD44-Antikörpern Tyrosin-phosphoryliert. Unter diesen sind die Proteine von 56, 84 und 120 kDa besonders interessant, da Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht auch nach Voraktivierung mit Phorbolestern und Stimulierung mit Hyaluronsäure phosphoryliert werden. Bei dem 56 kDa Protein handelt es sich um Lck.

Kandidaten für das nach fünfminütiger Stimulierung mit CD44-Antikörpern Tyrosin-phosphorylierte 120 kDa Protein sind u.a. FAK, Pyk2, Cas, FYB und Cbl (Morimoto und Tachibana, 1996; da Silva et al., 1997; Ohashi et al., 1998; van Seventer et al., 1998; siehe auch Tabelle 6), da diese Proteine in T-Zellen nach Stimulierung mit CD3-Antikörpern Tyrosin-phosphoryliert werden. Das 120 kDa Protein, das mit dem CD3-Antikörpern OKT3 ebenfalls nach fünfminütiger Aktivierung phosphoryliert wird, ist wahrscheinlich mit diesem Protein identisch. Dieses Protein ist auch in die murine Signalübertragung vermittelt, da inhibierende CD44-Antikörper seine Phosphorylierung hemmen.

Der beste Kandidat für das 120 kDa Protein ist jedoch das Proto-Onkogen c-Cbl (Cbl). Cbl wurde ursprünglich als zelluläres Homolog des transformierenden Proteins im Cas NS-1 Retrovirus identifiziert, das pre-B Zell Lymphome in Mäusen induziert (Langdon et al., 1989). Cbl, das vorwiegend in Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird, besitzt keine offenkundige katalytische Domäne. Stattdessen besitzt Cbl viele Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und Prolin-reiche Motive, welche eine Assoziation mit Proteinen, die SH2- bzw. SH3-Domänen besitzen, vermitteln. Cbl hat zusätzlich einen carboxy-terminalen Leucin-Zipper, der die Homo- und Heterodimerisationen anderer Proteine unterstützt. Zusätzlich findet man eine RING Finger Struktur, die Protein-Protein oder Protein-DNS Wechselwirkungen ermöglicht und eine Phospho-Tyrosin-bindende Domäne. Cbl wird nach Aktivierung von primären T-Zellen mit OKT3 Tyrosin-phosphoryliert und assoziiert dann mit ZAP-70, Fyn, Lck, Vav, CrkI/II und Cas (Fournel et al., 1996; Marengère et al., 1997). Es ist ein frühes und besonders gutes Substrat von PTK. In Jurkat-Zellen wird Cbl nach Stimulierung mit OKT3 Tyrosin-phosphoryliert und wird im Immunoblot nicht von anderen Proteinen um 120 kDa überlagert, da Cbl-Antikörper das 120 kDa Protein vollständig depletieren (Donovan et al., 1994). Es scheint aber auch ein funktionell wichtiger Vermittler der Integrin-Signalübertragung zu sein. Alle diese Eigenschaften machen Cbl zu einem idealen potentiellen Adaptor in der Signalübertragung von CD44. In weiterführenden Versuchen könnte die Frage geklärt werden, ob CD44 die Tyrosin-Phosphorylierung von Cbl induziert.

Humane T-Zellen können über verschiedene Transmembranglykoproteine wie z.B. CD44 und CD2 aktiviert werden. Die aktivierten Signalübertragungswege scheinen z.T. funktionell in Zusammenhang zu stehen und einige haben dieselben Signalübermittlungsmechanismen wie der über CD3 verlaufende Weg. Die Stimulierung humaner T-Zellen mit CD2- bzw. CD3-

Antikörpern, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, induziert die Tyrosin-Phosphorylierung gleicher, aber auch unterschiedlicher Proteine. So induzieren CD2-Antikörper, im Gegensatz zu dem CD3-Antikörper OKT3, nicht die Phosphorylierung von Proteinen von 80-90 kDa (Samelson et al., 1990).

CD44 ermöglicht die T-Zelladhäsion. Andere Oberflächenproteine wie z.B. CD26 sind dazu nicht fähig (Mattern et al., 1998). Jedoch zeigt CD26 in Bezug auf die an der Signalübertragung beteiligten Proteine Gemeinsamkeiten mit CD44. Die Stimulierung von Jurkat-Zellen mit CD26-Antikörpern induziert eine Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen. Proteine wie Lck, Fyn, ZAP-70, Erk2, Cbl und PLC γ konnten identifiziert werden (Hege et al., 1997). CD26 ist wie CD44 ein Kostimulator für die IL-2 Produktion.

Auch die Signalübertragung des Transmembranproteins CD43 zeigt Ähnlichkeiten mit der von CD44. Die Aktivierung von CD43 induziert in Jurkat-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine von 150-34 kDa, darunter Shc, Vav und Erk2 (Brown et al., 1996). Zugleich induziert CD43 Apoptose. Die Wahrscheinlichkeit, daß CD44, welches durch die CD44-Antikörper D2.1 und J-173 aktiviert wurde, Apoptose induziert, ist jedoch gering. Die T-Zellaggregate enthielten auch nach 72 Stunden Kultur keine auffällige Anzahl kleiner, apoptotischer Zellen, nahmen weiterhin Trypanblau nicht in die Zellen auf und die meisten T-Zellen proliferierten. Um dies jedoch sicherzustellen, könnte man die humanen T-Zellen mit J-173 und D2.1 aktivieren und anschließend mit Hilfe einer Apoptose-spezifischen Annexin-Färbung (Martin et al., 1995) die apoptotischen Zellen markieren. Durch die simultane Färbung von Zellen mit Annexin und Propidiumiodid kann man apoptotische, nekrotische und vitale Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysieren. Daß die Aktivierung von CD44 durch bestimmte CD44-Antikörper Apoptose sogar verhindert, wurde durch zwei Arbeitsgruppen gezeigt. Ayroldi et al. (1995) konnte zeigen, daß die Kultivierung einer murinen T-Zelllinie mit dem CD3-Antikörper 145-2C11 Apoptose induziert, der CD44-Antikörper IM7 die CD3-induzierte Apoptose jedoch blockierte. Dies wurde allerdings nur beobachtet, wenn beide Antikörper an Petrischalen gekoppelt waren. Hyaluronsäure hatte einen ähnlichen Effekt wie der CD44-Antikörper. Diese Befunde lassen vermuten, daß die Aktivierung des CD44-Moleküls das Überleben von Lymphozyten ermöglicht, die einem apoptotischen Stimulus ausgesetzt sind. Auch die Unterdrückung der CD44-Funktionen z.B. durch die Expression von löslichem CD44 zusätzlich zu exogen exprimiertem CD44 induziert Apoptose in invasierenden Tumorzellen (Yu et al., 1997).

Der Signalübertragungsweg, der für die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung durch die Transmembranmoleküle CD44, CD26 und CD43 verantwortlich ist, ist noch unklar, da keines dieser Proteine z.B. eine intristische PTK-Funktion hat oder kein bekanntes Bindungsmotiv für Tyrosin-Kinasen besitzt. Die Signalübertragungskette wird wahrscheinlich über Proteine induziert, die mit diesen Transmembranmolekülen assoziieren. So konnte gezeigt werden, daß CD26 mit CD45 und der Adenosin-Desaminase, CD43 mit Fyn (Pedraza-Alva et al., 1996) und CD44 mit Lck und Fyn assoziiert ist.

6.3 Inhibierende CD44 Antikörper hemmen die IL-2 Produktion

Untersuchungen zur Interleukin-2 Sekretion (IL-2) und zum T-Zellwachstum wurden vorgenommen, um die Signalübertragung von CD44 in der Maus zu charakterisieren. Hierzu wurden T-Zellen aus Mäusen mit CD44-Antikörpern behandelt, die eine Anti-CD3 induzierte T-Zellproliferation hemmen (Guo et al., 1993; Guo et al., 1994). Die CD44-Antikörper IM7, KM81 und ein KM81 F(ab')₂-Fragment hemmten in der Tat eine CD3-induzierte IL-2 Produktion und T-Zellproliferation. Die CD44-Antikörper IRAWB14 und R7166.7 haben keinen Einfluß auf beide Vorgänge. IM7, KM81, KM201, IRAWB14 und R7166.7 erkennen unterschiedliche Epitope auf CD44 (Zheng et al., 1995). Jedoch erkennen KM81 und KM201 die gleiche Epitopgruppe (Zheng et al., 1995). Manche Antikörper, die unterschiedliche Epitope des gleichen Moleküls erkennen, üben verschiedene Effekte auf die Signalübertragung in T-Zellen aus. Dies ist möglicherweise auf einen durch diese Antikörper unterschiedlich induzierten Konformationswechsel des Oberflächenmoleküls wie z.B. bei den CD44-Antikörpern IRAWB14 (Lesley et al., 1993b) bzw. Hermes 3 (Cao et al., 1996-97) oder durch diese Antikörper induzierte Wechselwirkung mit anderen Molekülen wie z.B. mit der Phospholipase-C im Fall von CD5 oder des TCR-Komplex mit CD4 zurückzuführen (Imboden et al., 1990; Bagnasco et al., 1993). Ob die CD44-Antikörper IM7 und KM81 einen Konformationswechsel oder eine Wechselwirkung von CD44 mit anderen Proteinen induzieren, ist unklar. Auch monovalente Fab-Fragmente induzieren diese Wechselwirkungen, obwohl sie Oberflächenmoleküle nicht vernetzen (Yoon et al., 1994). Daher ist es prinzipiell möglich, daß das KM81 F(ab')₂-Fragment diese inhibierenden Effekte durch eine Induktion von Wechselwirkungen auslöst.

Eine erfolgreiche T-Zellaktivierung benötigt zwei Signale. Das erste Signal entsteht durch die Wechselwirkung des TCR mit dem im MHC-präsentierten antigenen Peptid. Ein zweites, kostimulierendes Signal wird durch die Antigen-präsentierende Zelle vermittelt. Es bestehen Unterschiede zwischen den verschiedenen kostimulierenden Molekülen. Yashiro et al. (1998) konnten zeigen, daß nur CD28 zur vollständigen T-Zellproliferation führt. Eine 48-stündige Kultivierung von primären murinen T-Zellen mit koaktivierenden CD44- (Klon: 2B1-H2), CD28-, CD11a-, CD5- oder CD2-Antikörpern in Kombination mit submitogenen Konzentrationen des CD3-Antikörpers 145-2C11 führte zwar zur T-Zellproliferation, aber nur Anti-CD28 aktivierte T-Zellen zeigten auch danach noch eine progressive Zunahme der T-Zellproliferation. Die Stimulierung mit den anderen Kostimuli führte, wie mit Hilfe von Zellzyklus-Analysen und DNS-Fragmentanalysen untersucht, letztlich zu Apoptose. Ursache hierfür war die Unfähigkeit von nicht-CD28 kostimulierenden Molekülen, ausreichend IL-2 zu produzieren. Die Kultivierung von T-Zellen mit dem CD44-Antikörper IM7 und dem CD3-Antikörper 145-2C11 inhibiert, im Gegensatz zu dem CD44-Antikörper 2B1-H2, Apoptose (Ayroldi et al., 1995) und die IL-2 Produktion.

Das Fehlen des kostimulierenden Signals führt zu Anergie oder Apoptose. Anergie bezeichnet einen Zustand, der T-Zellen gegenüber einer weiteren Stimulation unempfindlich macht. Er resultiert in der Unfähigkeit, IL-2 zu produzieren. Zugabe von exogenem IL-2 induziert die T-Zellproliferation und revertiert den anergen Zustand. Wahrscheinlich ist, daß die inhibierenden CD44-Antikörper IM7 und KM81 Anergie oder den transienten Zustand des „Nicht-Reagierens“ und nicht Apoptose induzieren (Schwartz et al., 1990). Es ist bekannt, daß in anergen Zellen die Menge an IL-2 mRNA reduziert ist (Kang et al., unveröffentlichte Beob-

achtungen). Mit Hilfe einer Analyse der IL-2 mRNA kann geklärt werden, ob KM81 und IM7 den Zustand der Anergie induzieren. Eventuell hemmen KM81 und IM7 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die für die IL-2 Transkription notwendig sind.

Die Elemente der IL-2 Enhancer-Promotor Region 5' des Transkriptionsstartpunkts sind weitgehend bekannt. Die koordinierte Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, die an die IL-2 Enhancer-Promotor Region binden, sind für die IL-2 Sekretion notwendig. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie EGR-1, NFAT, c-Rel, RelA, Fra-1, JunB, Oct-1 sowie Ets, die erst nach Stimulierung der T-Zellen an den IL-2 Promotor binden, ist eventuell verändert.

Daß IM7 die IL-2 Produktion hemmt, steht im Gegensatz zu Experimenten, in denen an Petrischalen gebundener IM7 nach 18 Stunden einen schwach koaktivierenden Effekt auf die IL-2-Produktion von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz ausübte (Sommer et al., 1995). Eventuell resultieren diese Unterschiede der IL-2-Produktion aus der unterschiedlichen Herkunft der T-Zellen. Es ist sowohl bekannt, daß Unterschiede in der Signalübertragung zwischen T-Zellen, die aus Lymphknoten und der Milz isoliert wurden, bestehen (Sanchez-Garcia et al., 1997) als auch, daß CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helfer-1 bzw. CD4⁺ T-Helfer -2 Zellen unterschiedlich stark IL-2 produzieren und unterschiedlich in der T-Zellproliferation auf exogenes IL-2 reagieren (Lohoff et al., 1990).

6.4 Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung mit inhibierenden CD44-Antikörpern

Die Signalübertragung von CD44 verläuft in der Maus wie im Menschen über Erk2 und andere Tyrosin-phosphorylierte Proteine von 35, 80, 84, 100 und 120 kDa. Im Gegensatz dazu ist ein 38 kDa Protein nur in die humane Signalübermittlung verwickelt. Die Behandlung von murinen T-Zellen mit den inhibierenden CD44-Antikörpern IM7, KM201, KM81 und einem KM81 F(ab')₂-Fragment hemmten eine durch den CD3-Antikörper 145-2C11 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung dieser sechs Proteine. Es ist bekannt, daß in die Signalübertragung von CD44 und CD3 ähnliche Proteine beteiligt sind, da die Aktivierung humaner T-Zellen mit CD3-Antikörpern oder aktivierenden CD44-Antikörpern die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit einem ähnlichen Molekulargewicht induziert (Galandrini et al., 1993).

Die Beteiligung von Lck (56 kDa) und Fyn (59 kDa) war unter den von mir gewählten, reduzierenden Auftrennungsbedingungen nicht nachweisbar. In murinen T-Zellen wurden, im Gegensatz zu humanen T-Zellen, Proteine von 112, 150 und 200 kDa nicht mit dem CD3-Antikörper phosphoryliert. Es ist zwar bekannt, daß der Signalübertragungsweg nach Aktivierung von CD3 konserviert ist, allerdings gibt es auch artspezifische Unterschiede zwischen beiden Organismen z.B. auf der Ebene der TCRζ-Kette (Gary-Gouy et al., 1997) und der IL-2-Rezeptor-α-Kette (Nemoto et al., 1995; Lecine et al., 1996). Diese Unterschiede spiegeln sich auch im unterschiedlichen Tyrosin-Phosphorylierungsmuster beider Organismen wieder. Eventuell sind diese auch die Ursache, daß das 38 kDa Protein nicht in die murine Signalübertragung von CD44 verwickelt ist. Jedoch ist dieses Protein in der Maus in die Signalübertragung von CD3 verwickelt.

Die Spezifität der durch diese Antikörper induzierten Hemmung wird durch folgende Fakten untermauert: Der CD44-Antikörper R7166.7 inhibierte die durch 145-2C11 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung dieser Proteine nicht. Die Tyrosin-Phosphorylierung dieser Protein wird

in CD44-„Knockout“ Mäusen nicht beeinflusst. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß andere Faktoren, wie z.B. Kreuzreaktionen der Antikörper bei der Hemmung eine Rolle spielen.

IM7 hemmt die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen und das T-Zellwachstum stärker als KM81. Daß das Wachstum von T-Zellen mit der Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen korreliert, konnte auch in humanen T-Zellen mit den aktivierenden CD44-Antikörpern D2.1 und J-173 gezeigt werden. D2.1 hat dabei einen stärkeren Effekt auf beide Vorgänge als J-173.

Der inhibierende Effekt der CD44-Antikörper auf den Aktivierungszustand von Erk2 wurde in der Signalübertragungskette oberhalb von Erk2 geprüft. Eines der ersten Substrate der PTK Lck nach Stimulierung von CD3 ist die TCR ζ -Kette. Die TCR ζ -Kette besitzt sechs potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Kersh et al., 1998) von denen mindestens zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen nach Aktivierung phosphoryliert werden (Iwashima et al., 1997; Lewis et al., 1997). Die TCR ζ -Kette ist die hauptsächliche signalübertragende Einheit des TCR/CD3-Komplexes. Daher wurde der Phosphorylierungszustand dieses Proteins nach Behandlung mit den CD44-Antikörpern geprüft. Galandrini et al. (1993) konnten zeigen, daß in primären humanen T-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 21 kDa mit dem CD3-Antikörper OKT3, aber nicht mit dem CD44-Antikörper J-173 induziert wird. Galandrini vermutete, daß es sich hierbei um die TCR ζ -Kette handelt.

Auch eine verminderte Tyrosin-Phosphorylierung der murinen, konstitutiv phosphorylierten TCR ζ -Kette war nach Behandlung mit 145-2C11 in Kombination mit IM7 bzw. KM81, unter Bedingungen in denen Erk2 weniger Tyrosin-phosphoryliert wurde, nicht nachweisbar. Dies zeigt, daß sowohl in humanen als auch in murinen T-Zellen die Signalübertragung von CD44 keinen Einfluß auf den Phosphorylierungszustand der TCR ζ -Kette hat. Daraus war auch zu folgern, daß das inhibierende Signal, welches durch die Bindung der CD44-Antikörper IM7, bzw. KM81 an CD44 ausgelöst wurde, die Signalübertragungskette „downstream“ von der TCR ζ -Kette blockiert.

Jedoch können intramolekulare Veränderungen im Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der TCR ζ -Kette nicht ausgeschlossen werden. In murinen T-Zellen aus Lymphknoten ist ZAP-70 ständig an die konstitutiv phosphorylierte TCR ζ -Kette gebunden und wird nicht phosphoryliert oder aktiviert bevor der TCR/CD3-Komplex nicht stimuliert wird (van Oers et al., 1994). Eventuell induziert die Stimulierung von CD3 und CD44 intramolekulare Veränderungen der Tyrosin-Phosphatgruppen der murinen TCR ζ -Kette, die ZAP-70 aktivieren.

Es fällt auf, daß im Gegensatz zu CD44 die TCR ζ -Kette (21 kDa) und Shc (46 und 52 kDa) (Daten nicht gezeigt) in die Signalübertragung des Transmembranmoleküls CD38 verwickelt sind. Jedoch phosphorylierte die Stimulierung von CD3 die TCR ζ -Kette stärker als die Stimulierung von CD38 (Zubiaur et al., 1997). Dies zeigt, daß die Signalübertragung von Kostimulatoren wie CD38 und CD44 die Phosphorylierung der TCR ζ -Kette nur schwach bzw. nicht induziert. Die Signalübermittlung muß daher über andere Proteine verlaufen, da weiter „downstream“ gelegene Proteine wie PLC γ (150 kDa), Cbl (120 kDa), ZAP-70 (70 kDa), Lck (56 kDa) und Erk2 (42 kDa) nach Aktivierung mit einem CD38-Antikörper in Kombination mit einem quervernetzenden Zweitantikörper Tyrosin-phosphoryliert werden (Zubiaur et al., 1997). Auch CD44-Antikörper aktivieren Lck und Erk2.

Es ist bekannt, daß Lck, das in der Signalübertragungskette stromaufwärts der TCR ζ -Kette gelegen ist, nach Stimulierung des TCR/CD3-Komplex hauptsächlich die TCR ζ -Kette, aber auch den CD3-Komplex phosphoryliert (Letourneur und Klausner, 1992)(Tabelle 1). Dies ermöglicht ZAP-70 die Bindung an den TCR/CD3-Komplex und die Weiterleitung der Signale (Straus und Weiss, 1993). Daher muß nach Stimulierung von CD38 und CD44 aktiviertes Lck vor allem den CD3-Komplex wie z.B. die CD3 ϵ -Kette phosphorylieren, damit stromabwärts gelegene Proteine wie Erk2 aktiviert werden können. Es werden auf jeden Fall nach Stimulierung von CD44 keine anderen Proteine phosphoryliert, da das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster keine zusätzlichen Protein-Banden im Vergleich zu einer CD3-Aktivierung zeigt.

Die hauptsächlich signalübertragende Einheit ist der TCR/CD3-Komplex. Die Stimulierung mit dem CD3-Antikörper OKT3 aktivierte, wie in den unter Abschnitt 5.1 vorgestellten Experimenten gezeigt (siehe Abbildung 6), eine größere Anzahl von Proteinen und zeigte eine länger anhaltende Erk2-Aktivierung als die Stimulierung mit CD38-Antikörpern und CD44-Antikörpern (Zubiaur et al., 1997).

Die TCR ζ -Kette wird für die Signalübertragung von CD26 benötigt. Sie ist aber im Gegensatz zu CD2 nicht ausreichend für die Stimulierung des TCR/CD3-Komplex (von Bonin et al., 1997; von Bonin et al., 1998). Dies zeigt, daß die Signalübertragung von einigen Kostimulatoren der TCR ξ -Kette bedarf, andere Kostimulatoren benötigen die TCR ξ -Kette jedoch nicht zur Signalübertragung.

6.5 Hemmung der Erk2-Phosphorylierung

Die durch die inhibierenden Antikörpern ausgelöste Hemmung der Erk2-Aktivierung könnte durch zwei unterschiedliche Mechanismen verursacht werden:

1. Die Aktivierung von Proteinen, die in der Signalübertragungskette stromaufwärts von Erk2 liegen, könnte gehemmt werden.
2. Die Aktivität von Protein-Tyrosin-Phosphatasen, die Erk2 oder stromaufwärts gelegene Proteine dephosphorylieren, könnte gesteigert werden (siehe 6.6).

Viele Signalübertragungswege in Lymphozyten werden durch Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert, die sowohl durch PTK als auch durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) kontrolliert werden. Die Hemmung der Kinasen führt daher direkt zu einer stärkeren Dephosphorylierung. Die einzelnen PTPasen können sowohl positive als auch negative Effekte auf die Signalübertragung ausüben.

Die inhibierenden Antikörper könnten, wie bereits zuvor beschrieben, einen Konformationswechsel des Oberflächenmoleküls CD44 induzieren und so eine Wechselwirkung von CD44 PTPasen ermöglichen, die die Aktivität dieser PTPase verändert.

Die Aktivität von Proteinen, die in der Signalübertragungskette oberhalb von Erk2 liegen, wie z.B. Lck, ZAP-70, Ras-GTP, Raf-1 und MEK2, könnte gehemmt werden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Hemmung von SHP-2. Diese klassische PTPase, die auch PTP1D, SH-PTP3, SH-PTP2 oder PTP2C heißt, wird ubiquitär exprimiert und ermöglicht die Aktivierung von Ras-GTP. SHP-2 besitzt zwei SH2-Domänen und fungiert als Bindestelle für Grb2-Sos-

Komplexe (Übersichtsartikel: Frearson und Alexander, 1996; Frearson und Alexander, 1998;).

6.6 Aktivierung von PTPasen

Durch die Blockierung der CD44 Funktion könnten PTPasen aktiviert werden. Die Signalübertragungsketten, die zur Aktivierung von PTPasen führen, sind zur Zeit noch nicht geklärt. Die Frage ist nun, welche PTPasen natürlicherweise die Aktivität von Erk2 regulieren. Erk2 wird durch die bispezifische Kinase MEK aktiviert. Daher wird angenommen, daß vor allen bispezifische MAP-Kinasen-Phosphatasen, die auch zur Überfamilie der PTPasen zählen, für dessen Dephosphorylierung verantwortlich sind. Zur Zeit sind etwa 75 PTPasen kloniert. Mindestens 10 bispezifische MAP-Kinasen-Phosphatasen treten in Wechselwirkung mit Erk.

Die bispezifische MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) dephosphoryliert Erk. Allerdings wird MKP-1 als „*immediate early*“-Gen erst eine Stunde nach der Aktivierung z.B. durch Ras exprimiert (Sun et al., 1993; Chu et al., 1996). Dasselbe gilt für die PTPasen MKP-2 (Guan und Butch, 1995; King et al., 1995), MKP-3 (Muda et al., 1996), MKP-4 (Camps et al., 1998), hVH-3 (Kwak und Dixon, 1995) und die atypische PTPase PAC-1 (Rohan et al., 1993; Ward et al., 1994). B59 (Shin et al., 1997) und hVH-5 (Martell et al., 1995) sind weitere bispezifische Phosphatasen, die Erk dephosphorylieren. Deren Expression in T-Zellen ist jedoch unklar.

Diese bispezifischen PTPasen werden frühestens eine Stunde nach TCR-Stimulierung transkriptionell aktiviert. Diese Tatsache schließt es aus, daß sie für die Dephosphorylierung von Erk2 innerhalb von drei Minuten, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, verantwortlich sind. Die Erk2-Dephosphorylierung kann mit Cycloheximid, einem Hemmer der Proteinsynthese bzw. mit Actinomycin D, einem Transkriptioninhibitor, in T-Zellen jedoch nur verzögert, aber nicht vollständig gehemmt werden (Lisbona et al., 1997). Ein Kandidat für eine ubiquitär, konstitutiv exprimierte bispezifische MAP-Kinase Phosphatase ist Pyst2 (identisch mit MKP-X). Pyst2 ist substratspezifisch für Erk2 (Dowd et al., 1998) und könnte daher die inhibierenden Effekte der CD44-Antikörper vermitteln.

In Jurkat-Zellen wird die über den TCR führende Phosphorylierung von Erk2 von der klassischen hämatopoetischen PTPase He-PTP gehemmt (Saxena et al., 1998). Wie He-PTP aktiviert wird, ist jedoch noch unklar. Die Aktivierung von Jurkat-Zellen mit CD3-Antikörpern wird auch durch die Rezeptor-Typ PTPase CD148 gehemmt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von ZAP-70 und Erk1/2 ist nach Stimulierung des TCR-Komplex in CD148 überexprimierenden Jurkat-Zellen stark reduziert (Tangye et al., 1998).

Die Hemmung der CD44-Funktion könnte auch PTPasen aktivieren, die Moleküle, die in der Signalübertragungskette stromaufwärts von Erk2 liegen, dephosphorylieren und diese dadurch inaktivieren. Ein Kandidat hierfür wäre die klassische, konstitutiv exprimierte PTPase SHP-1, die auch PTP1C oder SH-PTP1 heißt und im wesentlichen in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. SHP-1, die strukturell mit SHP-2 verwandt ist, besitzt zwei SH2-Domänen mit denen sie an Protein-Tyrosin-Phosphate binden kann. Die Rolle von SHP-1 wurde mit Hilfe von Studien in „*viable motheaten (me/me)*“ Mäusen analysiert, die eine natürliche Leserastermutation im SHP-1 Gen haben, die zu einer Inaktivierung von SHP-1 führt (Pani et al., 1996). Thymozyten dieser Mäuse zeigen eine längere Erk2-Aktivität im Vergleich zu normalen Mäusen. SHP-1 ist in T-Zellen vermutlich mit Lck, Fyn, ZAP-70 (Plas et al., 1996) und

Vav assoziiert und hat eine negativ-regulierende Funktion bei der Signalübertragung des TCR, die auch auf Erk2 wirkt und nicht substratspezifisch ist (Übersichtsartikel: Neel, 1997; DeFranco und Law, 1995).

Dennoch fehlt der Beweis, daß eine dieser PTPasen durch die Hemmung der CD44-Funktion aktiviert wird und somit die Ursache für die Hemmung der Dephosphorylierung von Erk2 darstellt.

Die Hemmung der Erk2-Aktivität korreliert mit der IL-2 Produktion. Ob aber auch ein kausaler Zusammenhang besteht, ist unklar. Der Ets Transkriptionsfaktor Elk-1 wird durch Erk2 Threonin-phosphoryliert und hierdurch aktiviert (Yang et al., 1998). Dieser bindet an die IL-2 Enhancer-Promotor-Region und unterstützt so die IL-2 Transkription. Eine Inhibierung der Erk2-Aktivität führt so zur Hemmung der IL-2 Produktion. Dennoch fehlt der Beweis, daß die Inhibierung der Elk-1-Aktivierung für die Hemmung der IL-2-Produktion ausreichend ist.

Die Reduzierung der IL-2-Produktion könnte zusätzlich durch die transkriptionelle Aktivierung von MKP-1,-2,-3,-4 oder PAC-1 induziert werden, da die IL-2 mRNA erst 40 Minuten nach Stimulierung transkribiert wird und die Transkription nach vier Stunden maximal ist.

6.7 Signalübertragung induziert durch den CD44v6-Antikörper 1.1ASML

Ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der Signalübertragung durch variante CD44v-Isoformen stellen transgene Mäuse dar, die eine Isoform konstitutiv auf ihren T-Zellen exprimiert. Diese variante Isoform enthält die in den varianten Exons v4-v7 kodierten Aminosäuresequenzen aus der Ratte und wird unter der Kontrolle des Thy-1-Promotors und eines IgG schwere Ketten-Enhancers exprimiert (Zöller et al., 1997). Die T-Zell-vermittelte Immunantwort dieser Mäuse ist beschleunigt, was durch den CD44v6-spezifischen Antikörper 1.1ASML kompensiert werden kann. Auch eine in Gegenwart von Concanavalin A verstärkte Zellproliferation von T-Zellen dieser transgenen Mäuse kann mit 1.1ASML normalisiert werden (Jürgen Moll, persönliche Mitteilung).

Variante CD44v-Isoformen, die in dem varianten Exons v6 kodierte Aminosäuresequenzen enthalten, haben Funktionen in verschiedenen Zelltypen wie z.B. bei der Aktivierung von T-Zellen und der Metastasierung von Tumorzellen (Reber et al., 1990; Arch et al., 1992; Seiter et al., 1993; Sherman et al., 1998). 1.1ASML hemmt diese Funktionen.

Es zeigte sich, daß sich die Hemmung der Proliferation und der T-Zellantwort nicht auf der Ebene der Tyrosin-Phosphorylierung widerspiegeln d.h. es kommt zu keiner Veränderung der Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine nach Behandlung mit 1.1ASML. Die hemmende Wirkung des CD44-Antikörpers 1.1ASML muß deshalb über andere Mechanismen ablaufen. Es ist auch nicht klar, ob eine Hemmung der IL-2-Produktion für die Inhibierung der T-Zellproliferation verantwortlich ist. Eventuell hemmt 1.1ASML die T-Zellproliferation auch auf einem anderen Weg.

6.8 Hyaluronsäure induziert die Tyrosin-Phosphorylierung

Es sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob es möglich ist, die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine in T-Zellen mit Hyaluronsäure zu induzieren. Rafi et al. (1997) zeigten, daß Hyaluronsäure nur die Proliferation von B-Zellen stimuliert, während eine Aktivierung von T-Zellen mit Hyaluronsäure nicht möglich war.

Die Voraktivierung von primären, murinen T-Zellen und der murinen T-Zelllinie LB17 mit Phorbolestern und anschließender Aktivierung mit Hyaluronsäure induzierte die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen von 120 kDa und 84 kDa. Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht werden auch nach Aktivierung humaner T-Zellen mit aktivierenden CD44-Antikörpern Tyrosin-phosphoryliert. Ob diese Proteine im humanen und murinen Organismen identisch sind, müßte in weiteren Versuchen geklärt werden. Jedoch ist es wahrscheinlich, da Proteine von gleichem Molekulargewicht auch mit CD3-Antikörpern in murinen und humanen T-Zellen phosphoryliert wurden. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Galandrini et al. (1994a), die zeigen konnten, daß eine T-Zellproliferation sehr wohl mit Hyaluronsäure induzierbar ist.

Lck (56 kDa) wurde nur in mit Hyaluronsäure behandelten primären T-Zellen phosphoryliert. Daß die Signalübertragung nur in primären T-Zellen über Lck verläuft, ist nicht verwunderlich, da die Signalübertragung von CD44 in Zelllinien anders ist. So verläuft z.B. die Signalübertragung in der LB17 Zelllinie auch nicht über Erk2 (Abschnitt 5.2.7).

Überraschenderweise wurde Erk2 in murinen T-Zellen nicht mit Hyaluronsäure aktiviert. Dies ist erstaunlich, da die zweiminütige Stimulierung humaner T-Zellen mit D2.1 bzw. J-173 Erk2 aktiviert. Die Aktivierung ist 30 Minuten lang nachweisbar. Folglich gibt es Unterschiede in der Signalübertragung nach Aktivierung mit CD44-Antikörpern in humanen T-Zellen bzw. mit Hyaluronsäure in murinen T-Zellen. Da Hyaluronsäure nur in aktivierten T-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine induziert, wird mit den CD44-Antikörpern J-173 und D2.1 vermutlich nur in voraktivierten T-Zellpopulationen, die zuvor aus dem Blut isoliert worden waren, die Signalübertragung induziert. Jedoch existieren auch Unterschiede in den Aktivierungszuständen der murinen und humanen T-Zell-Populationen, in denen eine Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit Hyaluronsäure bzw. CD44-Antikörpern induzierbar ist. Zum einen ist eine Induktion der Hyaluronsäure-Bindung in humanen T-Zellen nicht möglich. Zum anderen proliferieren murine, mit Phorbolestern aktivierte T-Zellen im Gegensatz zu unbehandelten humanen T-Zellen. Diese Unterschiede könnten die Ursache für die Unterschiede in der Signalübertragung darstellen. Außerdem ist die Signalübertragung z.B. über den TCR/CD3-Komplex in beiden Organismen verschieden.

Die in dieser Arbeit durch Phorbolester induzierte Hyaluronsäure-Bindung in primären T-Zellen und in der T-Zelllinie LB17 konnte durch den CD44-Antikörper KM81 gehemmt werden. Dies bedeutet, daß Hyaluronsäure an CD44 und nicht an einen anderen Hyaluronsäure-Rezeptor bindet. Daher wird auch die Signalübertragung durch CD44 und nicht durch einen anderen Hyaluronsäure-Rezeptor vermittelt.

Hyaluronsäure induziert auch in anderen Zellen eine Signalübertragung. In BMDM-Zellen (für „bone marrow-derived macrophages“) induziert Hyaluronsäure die Sekretion von IL-1 β und IL-6. Da KM81 die IL-1 β -, aber nicht die IL-6-Sekretion inhibiert, besitzen BMDM-Zellen wahrscheinlich zwei verschiedene Hyaluronsäure-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die einstündige Behandlung mit Hyaluronsäure induzierte einen Signalübertragungsweg von

CD44, der die p38-Kinase aktiviert und in der IL-1 β Sekretion endet (Sophia Khaldoyanidi; Manuskript in Vorbereitung).

Die Aktivierung von p38 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Die primären murinen T-Zellen wurden jedoch nur über einen Zeitraum von 15 Minuten mit Hyaluronsäure aktiviert. Deshalb kann nicht abschließend geklärt werden, ob eine Aktivierung der p38-Kinase nach einstündiger Behandlung mit Hyaluronsäure beobachtet werden kann. Allerdings wurde ein Protein von 38 kDa schon nach zweiminütiger Stimulierung primärer humaner T-Zellen mit den CD44-Antikörpern J-173 und D2.1 aktiviert. Ob es sich dabei um die p38-Kinase handelt, ist unklar.

Slevin et al. (1998) konnten in Endothelzellen zeigen, daß nur niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente die Tyrosin-Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen von 12,5-150 kDa innerhalb von einer Minute induzieren. Hochmolekulare Hyaluronsäure zeigte diese Effekte nicht. Die Phosphorylierung war 24 Stunden lang detektierbar und ist sowohl mit einem CD44-Antikörper als auch mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Genestein blockierbar. Unter den aktivierten Proteinen befinden sich Erk1, PKC, Raf-1, MEK1 und ein Protein von 85 kDa, aber nicht Erk2. Ein CD44-Antikörper induzierte auch die Tyrosin-Phosphorylierung des 85 kDa Proteins. Die Autoren vermuten, daß es sich um CD44 handelt, obwohl CD44 bekanntermaßen kein Tyrosin in der zytoplasmatischen Domäne besitzt. Die Daten lassen vermuten, daß das in T-Zellen durch Hyaluronsäure- oder CD44-Antikörper-Behandlung Tyrosin-phosphorylierte 84 kDa Protein mit dem 85 kDa Protein in Endothelzellen identisch ist. Eventuell ist dieses mit CD44 assoziiert und daher nach einer Immunpräzipitation mit einem CD44-Antikörper gefolgt von einem Immunoblot mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper nachweisbar. Dies könnte in weiterführenden Versuchen mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen geklärt werden.

Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 80 bis über 600 kDa induzierte die Tyrosin-Phosphorylierungen intrazellulärer Proteine. Jedoch führte die Aktivierung primärer muriner T-Zellen mit Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht (Healon; > 600 kDa) nicht zur Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Daß vor allem Hyaluronsäure von geringem Molekulargewicht für die Induktion der Signalübertragung verantwortlich ist, wurde anhand anderer Zelltypen deutlich. So induzieren in voraktivierten Makrophagen mittlere Hyaluronsäurefragmente (< 500 kDa) die Produktion von Zytokinen wie z.B. Interleukin-12, MIP-1 α (für „macrophage inflammatory protein 1 α “), MIP-1 β , Crg-2 (für „cytokine-responsive gene-2“) und RANTES (für „murine regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted“) (Hodge-Dufour et al., 1997). Kleine Hyaluronsäurefragmente induzieren die Transkription von iNOS mRNA (induzierbare NO-Synthase; McKee et al., 1996; McKee et al., 1997). Die Signalübertragung verläuft in diesen Zellen über CD44.

Niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente (80 kDa) induzieren die NF κ B DNA-Bindungsaktivität, die Expression von I- κ B α mRNA und die Produktion von I- κ B α (Noble et al., 1996). Ob die Signalübermittlung über CD44 vermittelt wird, ist unklar.

6.9 Identifizierung von HARP

Unter den durch CD44 entweder über die Aktivierung mit CD44-Antikörpern oder nach Bindung von Hyaluronsäure induzierten Proteinen wurde ein 84 kDa Protein besonders stark phosphoryliert. Da dessen Identität unklar blieb, wurde es HARP (für „hyaluronic acid responding phosphoprotein“) genannt. Die Existenz unbekannter Tyrosin-phosphorylierter Proteine von ungefähr 84 kDa in T-Zellen wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Schraven et al., 1997; Campbell et al., 1998).

Um HARP zu identifizieren, wurden daher Immunpräzipitationen mit dem Phospho-Tyrosin-Antikörper ausgeführt, in denen die Zellzahlen auf bis zu $6,5 \times 10^8$ erhöht wurden. Da durch diese hohen Zellzahlen und damit verbundenen hohen Proteinmengen die Proteingele überladen waren, wurde HARP mit Hilfe einer DEAE-Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Im Gegensatz dazu wurde das 120 kDa Protein nur an eine Q-Anionenaustauschersäule gebunden. Eine Immunpräzipitation war jedoch unter den Puffer- und Salzbedingungen, die zur Elution der Proteine in der Säule verwendet worden waren, nicht möglich. In weiterführenden Experimenten müßten die eluierten Proteine dialysiert werden, um eine Immunpräzipitation durchführen zu können. Die Sichtbarmachung von HARP war bisher, im Gegensatz zu dem 120 kDa Protein, im Silbergel nicht möglich (Abbildung 29).

Die begrenzte Anzahl primärer T-Zellen und deren aufwendige Aufreinigung verhinderte die Identifizierung von HARP. Eine Zelllinie, die sich in ähnlicher Weise mit dem CD44-Antikörper D2.1 oder J-173 aktivieren ließ, konnte noch nicht identifiziert werden. Weiterhin müßten die Aufreinigungsbedingungen optimiert werden. Konventionelle Aufreinigungen, die z.B. zur Aufreinigung von Erk2 oder Ezrin verwendet wurden, benötigen 5×10^9 bzw. 7×10^9 T-Zellen (Nel et al., 1990; Egerton et al., 1992a). In diesen Fällen wurden diese Zellzahlen durch die Verwendung einer Zelllinie anstelle von primären Zellen erreicht. Zur Isolierung von Erk2 war eine Aufreinigung der Zell-Lysate durch eine DEAE und hydrophobe BTP (Butyltoypearl 650)-Säule notwendig.

Eine andere Methode zur Isolierung von Komponenten der Signalübertragungsproteine in T-Zellen wurde von Fazioli et al. (1993) entwickelt. Sie beinhaltet eine Expressionsklonierungsstrategie für die Isolierung von cDNS, deren kodierte Proteine die Substrate von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen darstellen. In einzelnen wird durch einen Stimulus die Tyrosin-Phosphorylierung in T-Zellen induziert, Zellysate werden präpariert und mit Hilfe einer Immunoaffinitätssäule, an die Phospho-Tyrosin-Antikörper gekoppelt sind, aufgereinigt. Gegen die gesamte Menge der aufgereinigten Proteine erzeugte Antiseren werden sowohl verwendet, um die Substrate immunologisch zu charakterisieren, als auch zum Durchsuchen („Screening“) einer cDNS Expressionsbibliothek. Mit Hilfe dieser Methode wurden z.B. ERM-Proteine wie Ezrin isoliert. Eventuell wäre dies eine Strategie zur systematischen Identifizierung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine, welche in die Signalübertragung von CD44 verwickelt sind.

7 Literatur

- Abraham, N., A. Velette** (1990). Activation of p56^{lck} through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5197.
- Alessi, D.R., A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, A.R. Saltiel** (1995). PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494.
- Algarté, M., P. Lécine, R. Costello, A. Plet, D. Olive, J. Imbert** (1995). *In vivo* regulation of interleukin-2 receptor α gene transcription by the coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary T cells. *EMBO J.* 14: 5060-5072.
- Algrain, M., O. Turunen, A. Vaheri, D. Louvard, M. Arpin** (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell. Biol.* 120: 129-139.
- Altman, D.G.** (1991). Practical statistics for medical research. Chapman und Hall, London.
- Amano, M., K. Chihara, K. Kimura, Y. Fukata, N. Nakamura, Y. Matsuura, K. Kaibuchi** (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275: 1308-1311.
- Arch, R., K. Wirth, M. Hofmann, H. Ponta, S. Matzku, P. Herrlich, M. Zöller** (1992). Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257: 683-685.
- Aruffo A., I. Stamenkovic, M. Melnick, C.B. Underhill, B. Seed** (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61: 1303-1313.
- Avraham, A., S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, Y. Ben-Neriah** (1998). Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 28: 2320-2330.
- Ayroldi, E., L. Cannarile, G. Migliorati, A. Bartoli, I. Nicoletti, C. Riccardi** (1995). CD44 (Pgp-1) inhibits CD3 and dexamethasone-induced apoptosis. *Blood* 86: 2672-2678.
- Bagnasco, M., M.D. Franco, M. Lopez, J. Nunes, C. Lipcey, C. Mawas, J. Salamero, D. Olive** (1993). Anti-T11.1 and -T11.2 Monoclonal Antibodies Play a Different Role in CD2-Mediated Signal Transduction. *Hum. Immunol.* 38: 172-178.
- Bagrodia, S., B. Dérijard, R.J. Davis, R.A. Cerione** (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270: 27995-27998.
- Bartolazzi, A., R. Peach, A. aruffo, I. Stamenkovic** (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.* 180: 53-66.
- Bartolazzi, A., A. Nocks, A. Aruffo, F. Spring, I. Stamenkovic** (1996). Glycosylation of CD44 Is Implicated in CD44-mediated Cell Adhesion to Hyaluronan. *J. Cell. Biol.* 132: 1199-1208.
- Belitos P.C., J.E.K. Hildreth, J.T. August** (1990). Homotypic cell aggregation induced by Anti-CD44 (Pgp-1) monoclonal antibodies and related to CD44 (Pgp-1) expression. *J. Immunol.* 144: 1661-1670.
- Bennett, K.L., D.G. Jackson, J.C. Simon, E. Tanczos, R. Peach, B. Modrell, I. Stamenkovic, G. Plowman, A. Aruffo** (1995a). CD44 Isoforms Containing Exon V3 Are Responsible for the Presentation of Heparin-binding Growth Factor. *J. Cell. Biol.* 128: 687-698.
- Bennett, K.L., B. Modrell, B. Greenfield, A. Bartolazzi, I. Stamenkovic, R. Peach, D.G. Jackson, F. Spring, A. Aruffo** (1995b). Regulation of CD44 Binding to Hyaluronan by Glycosylation of Variably Spliced Exons. *J. Cell. Biol.* 131: 1623-1633.
- Berg, N.N., H.L. Ostergaard** (1997). T cell receptor engagement induces tyrosine phosphorylation of FAK and Pyk2 and their association with Lck. *J. Immunol.* 159: 1753-1757.
- Birch, M., S. Mitchell, I.R. Hart** (1991). Isolation and characterisation of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res.* 51: 6660-6667.
- Boise, L.H., B. Petryniak, X. Mao, C.H. June, C.Y. Wang, T. Lindsten, R. Bravo, K. Kovary, J.M. Leiden, C.B. Thompson** (1993). The NFAT-1 DNA Binding Complex in Activated T Cells Contains Fra-1 and JunB. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1911-1919.
- Bourguignon, L.Y.W., V.B. Lokeshwar, X. Chen, W.G.L. Kerrick** (1993). Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J. Immunol.* 151: 6634-6644.
- Boussiotis, V.A., D.L. Barber, B.J. Lee, J.G. Gribben, G.J. Freeman, L.M. Nadler** (1996). Differential Association of Protein Tyrosine Kinase with the T Cell Receptor is Linked to the Induction of Anergy and Its Prevention by B7 Family-mediated Costimulation. *J. Exp. Med.* 184: 365-376.
- Boussiotis, V.A., G.J. Freeman, A. Berezovska-ya, D.L. Barber, L.M. Nadler** (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278: 124-128.
- Brandt, S.** (1970). Statistical and computational methods in data analysis. North-Holland publishing company.
- Brown, T.J., W.W. Shuford, W.C. Wang, S.G. Nadler, T.S. Bailey, H. Marquardt, R.S. Mittler** (1996). Characterisation of a CD43/Leukosialin-mediated Pathway for Inducing Apoptosis in Human T-Lymphoblastoid Cells. *J. Biol. Chem.* 271: 27686-27695.
- Bustelo, X.R., J.A. Ledbetter, M. Barbacid** (1991). Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 356: 68-71.

- Camps, M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Antonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, S. Arkinstall** (1998). Catalytic Activation of the Phosphatase MKP-3 by ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* 280: 1262-1265.
- Cantrell, D.A.** (1996). T Cell Antigen Receptor Signal Transduction Pathways. *Canc. Surv.* 27: 165-175.
- Cao, L., T. Yoshino, N. Kawasaki, H. Yanai, K. Kawahara, E. Kondo, K. Omonishi, K. Takahashi, T. Akagi** (1996-97). Binding of human leukocytes to fibronectin is augmented by an anti-CD44 mAb (TL-1) and blocked by another anti-CD44 mAb (Hermes-3), but not by anti-VLA-4/VLA-5 mAbs. *Immunobiol.* 196: 504-512.
- Cerný, J., H. Stockinger, V. Horejsí** (1996). Noncovalent association of T lymphocyte surface proteins. *Eur. J. Immunol.* 26: 2335-2343.
- Chan, A.C., B.A. Irving, J.D. Fraser, A. Weiss** (1991). The ζ chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9166-9170.
- Chan, A.C., M. Iwashima, C.W. Turck, A. Weiss** (1992). ZAP-70: A 70 kd Protein-Tyrosin-Kinase That Associates with the TCR ζ Chain. *Cell* 71: 649-662.
- Chan, A.C., A.S. Shaw** (1995). Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 394-401.
- Chen, R.H., C. Sarnecki, J. Blenis** (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 13: 801-808.
- Chen, Q., T.H. Lin, C.J. Der, R.L. Juliano** (1996). Integrin-mediated activation of mitogen-activated protein (MAP) or extracellular signal-related kinase kinase (MEKK) and kinase is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* 271: 18122-18127.
- Chong, A.S.F., I.A. Boussy, L.H. Graf, P. Scuderi** (1992). Stimulation of IFN- γ , TNF- α , and TNF- β secretion in IL-2 activated T cells: costimulatory roles for LFA-1, LFA-2, CD44, and CD45 molecules. *Cell. Immunol.* 144: 69-79.
- Chu, Y., P.A. Soliski, R. Khosravi-Far, C.J. Der, K. Kelly** (1996). The Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 Have Unique Substrate Specificities and Reduced Activity in Vivo toward the ERK2 sevenmaker Mutation. *J. Biol. Chem.* 271: 6497-6501.
- Clayton, L.K., L. D'Adamio, F.D. Howard, M. Sieh, R.E. Hussey, S. Koyasu, E.L. Reinherz** (1991). CD3 ϵ and CD3 ζ are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5202-5206.
- Clipstone, N.A., G.R. Crabtree** (1992). Identification of calcineurin synergize to regulate the nuclear factor of activated T cells. *J. Exp. Med.* 178: 1517-1522.
- Collins, T.L., P.D. Kassner, B.E. Bierer, S.J. Burakoff** (1994). Adhesion receptors in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 385-393.
- Conrad P., B.L. Rothman, K.A. Kelley, M.L. Blue** (1992). Mechanism of peripheral T cell activation by coengagement of CD44 and CD2. *J. Immunol.* 149: 1833-1839.
- Crabtree, G.R.** (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science*: 243: 355-361.
- Cuenda, A., J. Rouse, Y.N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T.F. Gallagher, P.R. Young, J.C. Lee** (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stress and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364: 229-233.
- Culty, M., H.A. Nguyen, C.B. Underhill** (1992). The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell. Biol.* 116: 1055.
- Da Silva, A.J., O. Janssen, C.E. Rudd** (1993). T Cell Receptor ζ /CD3-p59^{lyn(T)}-Associated p120/130 Binds to the SH2 Domain of p59^{lyn(T)}. *J. Exp. Med.* 178: 2107-2113.
- Da Silva, A.J., Z. Li, C. De Vera, E. Canto, P. Findell, C.E. Rudd** (1997a). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7493-7498.
- Da Silva, A.J., J.M. Rosenfield, I. Mueller, A. Bouton, H. Hirai, C.E. Rudd** (1997b). Biochemical Analysis of p120/130. A Protein-Tyrosine Kinase Substrate Restricted to T and Myeloid Cells. *J. Immunol.* 158: 2007-2016.
- Dalchau, R., J. Kirkley, J.W. Fabre** (1980). Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* 10: 745-749.
- Dall, P., K.H. Heider, H.P. Sinn, P. Skroch-Angel, G. Adolf, M. Kaufmann, P. Herrlich, H. Ponta** (1995). Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 60: 471-477.
- Dall, P., A. Hekele, H. Ikenberg, A. Goppinger, T. Bauknecht, A. Pfeiderer, J. Moll, M. Hofmann, H. Ponta, P. Herrlich** (1996). Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinogenesis. *Int. J. cancer* 69: 79-85.
- Danielian, S., A. Alcover, L. Polissard, M. Stefanescu, O. Acuto, S. Fischer, R. Fagard** (1992). Both T cell receptor (TCR)-CD3 complex and CD2 increase the tyrosine kinase activity of p56^{lck}. CD2 can mediate TcR-CD3-independent and CD45-dependent activation of p56^{lck}. *Eur. J. Immunol.* 22: 2915-2921.

- De Aós, I., M.H. Metzger, M. Exley, C.E. Dahl, S. Misra, D. Xeng, L. Varticovski, C. Terhorst, J. Sancho** (1997). Tyrosine Phosphorylation of the CD3- ϵ Subunit of the T Cell Antigen Receptor Mediates Enhanced Association with Phosphatidylinositol 3-Kinase in Jurkat T Cells. *J. Biol. Chem.* 272: 25310-25318.
- De Belder, A. N., K. O. Wik** (1975). Preparation and properties of Fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research.* 44: 251-257.
- DeFranco, A.L., D.A. Law** (1995). Tyrosine Phosphatases and the Antibody Response. *Science* 268: 263-264.
- DeFranco, A.L.** (1995). Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 163-175.
- DeGrendele, H.C., P. Estess, L.J. Picker, M.H. Siegelman** (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* 183: 1119-1130.
- DeGrendele, H.C., M. Kosfisz, P. Estess, M.H. Siegelman** (1997a). CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* 159: 2549-2553.
- DeGrendele, H.C., P. Estess, M.H. Siegelman** (1997b). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278: 672-675.
- Denning, S.M., P.T. Le, K.H. Singer, B.F. Haynes** (1990). Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J. Immunol.* 144: 7-15.
- Dérillard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I.H. Wu, J. Han, R.J. Ulevitch, R.J. Davis** (1995). Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267: 682-685.
- Doerge, K., M. Sasaki, E. Horigan, J.R. Hassel, Y. Yamada** (1987). Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 262: 17757-17767.
- Donovan, J.A., R.L. Wange, W.Y. Langdon, L.E. Samelson** (1994). The protein product of the *c-cbl* protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 22921-22924.
- Dowd, S., A.A. Sneddon, S.M. Keyse** (1998). Isolation of the human genes encoding the Pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J. Cell. Sci.* 111: 3389-3399.
- Dumont, F.J., M.J. Staruch, P. Fischer, C. Da Silva, R. Camacho** (1998). Inhibition of T Cell Activation by Pharmacologic Disruption of the MEK1/ERK MAP Kinase or Calcineurin Signalling Pathways Results in Differential Modulation of Cytokine Production. *J. Immunol.* 160: 2579-2589.
- Durand, D.B., J.P. Shaw, M.R. Bush, R.E. Replogle, R. Belagaje, G.R. Crabtree** (1988). Characterization of Antigen Receptor Response Elements within the Interleukin-2 Enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1715-1722.
- Dustin, M. L., M.E. Sanders, S. Shaw, T.A. Springer** (1987). Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J. Exp. Med.* 165: 677-692.
- Egerton, M., W.H. Burgess, D. Chen, B.J. Druker, A. Bretscher, L.E. Samelson** (1992a). Identification of ezrin as an 81-kda tyrosine-phosphorylated protein in T cells. *J. Immunol.* 149: 1847-1852.
- Egerton, M., O.R. Ashe, D. Chen, B.J. Druker, W.H. Burgess, L.E. Samelson** (1992b). VCP, the mammalian homolog of *cdc48*, is tyrosine phosphorylated in response to T cell antigen receptor activation. *EMBO J.* 11: 3533-3540.
- Egerton, M., D.R. Fitzpatrick, A.D. Catling, A. Kelso** (1996). Differential activation of T cell cytokine production by extracellular signal-regulated kinase (Erk) signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* 26: 2279-2285.
- Emmel, E.A., C.L. Verweij, D.B. Durand, K.M. Higgins, E. Lacy, G.R. Crabtree** (1989). Cyclosporin A Specifically Inhibits Function of Nuclear Proteins Involved in T Cell Activation. *Science* 246: 1617-1619.
- English, N.M., J.F. Lesley, R. Hyman** (1998). Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding. *Cancer Res.* 58: 3736-3742.
- Esford, L.E., A. Maiti, S.A. Bader, F. Tufaro, P. Johnson** (1998). Analysis of CD44 interactions with hyaluronan in murine L cell fibroblasts deficient in glycosaminoglycan synthesis: a role for chondroitin sulfate. *J. Cell. Sci.* 111: 1021-1029.
- Estess, P., H.C. DeGrendele, V. Pascual, M.H. Siegelman** (1998). Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. *J. Clin. Invest.* 102: 1173-1182.
- Fazioli, F., W.T. Wong, S.J. Ullrich, K. Sakaguchi, E. Appella, P.P. Di Fiore** (1993). The ezrin-like family of tyrosine kinase substrates: receptor-specific pattern of tyrosine phosphorylation and relationship to malignant transformation. *Oncogene* 8: 1335-1345.
- Feshchenko, E.A., W.Y. Langdon, A.Y. Tsygan-kov** (1998). Fyn, Yes, and Syk phosphorylation sites in c-Cbl map to the same tyrosine residues that become phosphorylated in activated T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 8323-8331.
- Feuerstein, N., R. Firestein, N. Aiyar, X. He, D. Murrasko, V. Cristofalo** (1996). Late Induction of CREB/ATF Binding and a Concomitant Increase in cAMP Levels in T and B Lymphocytes Stimulated Via the Antigen Receptor. *J. Immunol.* 156: 4582-4593.
- Fields, P.E., T.F. Gajewski, F.W. Fitch** (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 271: 1276-1278.

- Flaswinkel, H., A.M Reth** (1994). Duale role of the tyrosine activation motif of the Ig- α protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J.* 13: 83-89.
- Flinn, H.M., A.J. Ridley** (1996). Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J. Cell. Sci.* 109: 1133-1141.
- Fournel, M., D. Davidson, R. Weil, A. Veillette** (1996). Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 301-306.
- Franklin, R.A., A. Tordai, H. Patel, A.M. Gardner, G.L. Johnson, E.W. Gelfand** (1994). Ligation of the T Cell Receptor Complex Results in Activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK Cascade in Human T Lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 2134-2140.
- Fraser, J.D., A. Weiss** (1992). Regulation of T-Cell Lymphokine Gene Transcription by the Accessory Molecule CD28. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4357-4363.
- Frearson, J.A., D.R. Alexander** (1996). Protein tyrosine phosphatases in T cell development, apoptosis and signalling. *Immunol. Today* 17: 385-391.
- Frearson, J.A., D.R. Alexander** (1998). The Phosphotyrosine Phosphatase SHP-2 Participates in a Multimeric Signaling Complex and Regulates T Cell Receptor (TCR) coupling to the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Jurkat T Cells. *J. Exp. Med.* 187: 1417-1426.
- Funaro, A., G.C. Spagnoli, M. Momo, W. Knapp, F. Malavasi** (1994). Stimulation of T-cells via CD44 requires leukocyte-function-associated antigen interactions and interleukin-2 production. *Hum Immunol.* 40: 267-278.
- Galandrini, R., N. Albi, G. Tripoldi, D. Zarcone, A. Terenzi, A. Moretta, C. E. Grossi, A. Verladi** (1993). Antibodies to CD44 trigger effector functions of human T-cell clones. *J. Immunol.* 150: 4225-4235.
- Galandrini, R., E. Galluzo, N. Albi, C.E. Grossi, A. Velardi** (1994a). Hyaluronate is costimulatory for human T cell effector functions and binds to CD44 on activated T cells. *J. Immunol.* 153: 21-31.
- Galandrini, R., R. De Maria, M. Piccoli, L. Frati, A. Santoni** (1994b). CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J. Immunol.* 153: 4399.
- Galandrini, R., M. Piccoli, L. Frati, A. Santoni** (1996). Tyrosine kinase-dependent activation of human NK cell functions upon triggering through CD44 receptor. *Eur. J. Immunol.* 26: 2807-2811.
- Galluzo, E., N. Albi, S. Fiorucci, C. Merigiola, L. Ruggeri, A. Tosti, C.E. Grossi, A. Velardi** (1995). Involvement of CD44 variants in hyaluronate adhesion by human activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 2932-2939.
- Gary-Gouy, H., V. Lang, S. Sarun, L. Boumsell, G. Bismuth** (1997). In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho- ζ molecules in human CD3⁺ thymocytes. *J. Immunol.* 159: 3739-3747.
- Gilmour, K.C., R. Pine, N.C. Reich** (1995). Interleukin 2 activates STAT5 transcription factor (mammary gland factor) and specific gene expression in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10772-10776.
- Gomez, J., A. Garcia, L. R-Borlado, P. Bonay, C. Matinez-A., A. Silva, M. Fresno, A.C. Carrera, C. Eicher-Streiber, A. Rebollo** (1997). IL-2 signaling controls actin organisation through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J. Immunol.* 158: 1516-1522.
- Griffioen, A.W., M.J.H. Coenen, C.A. Damen, S.M.M. Hellwig, D.H.J. van Weering, W. Vooy, G.H. Blijham, G. Groenewegen** (1997). CD44 Is Involved in Tumor Angiogenesis; an Activation Antigen on Human Endothelial Cells. *Blood* 90: 1150-1159.
- Gruber, M.F., D.S.A. Webb, T.L. Gerrard** (1992). Stimulation of human monocytes via CD45, CD44 and LF-3 triggers macrophage-colony stimulating factor production. *J. Immunol.* 148: 1113-1297.
- Guan, K.L., E. Butch** (1995). Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 7197-7203.
- Gulbins, E., K.M. Coggeshall, G. Baier, S. Katzav, P. Burn, A. Altman** (1993). Tyrosine Kinase-Stimulated Nucleotide Exchange of Vav in T Cell Activation. *Science* 260: 822-825.
- Günthert, U., M. Hoffmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haußmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich** (1991). A New Variant of Glycoprotein CD44 Confers Metastatic Potential to Rat Carcinoma Cells. *Cell* 65: 13-24.
- Guo, Y.J., J. Ma, J.H. Wong, S.C. Lin, H.C. Chang, M. Bigby, M.S. Sy** (1993). Monoclonal anti-CD44 antibody acts in synergy with anti-CD2 but inhibits anti-CD3 or T cell receptor-mediated signaling in murine T cell Hybridomas. *Cell. Immunol.* 152: 186-199.
- Guo, Y.J., S.C. Lin, J.H. Wang, M. Bigby, M.S. Sy** (1994). Palmitoylation of CD44 interferes with CD3-mediated signaling in human T lymphocytes. *Intern. Immunol.* 6: 213-221.
- Haegel-Kronenberger, H., H. de la Salle, A. Bohbot, F. Oberling, J.P. Cazenave, D. Hanau** (1998). Adhesive and/or Signaling Functions of CD44 Isoforms in Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* 161: 3902-3911.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
- Hamann, K.J., T.L. Dowling, S.P. Neeley, J.A. Grant, A.R. Leff** (1995). Hyaluronic acid enhances cell proliferation during eosinopoiesis through the CD44 surface antigen. *J. Immunol.* 154: 4073-4080.

- Han, J., B. Das, W. Wei, L. Van Aelst, R.D. Mosteller, R. Khosravi-Far, J.K. Westwick, C.J. Der, D. Broek** (1997). Lck regulates Vav activation of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1346-1353.
- Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, J.P. Allison** (1992). CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356: 607-609.
- He, Q., J. Lesley, R. Hyman, K. Ishihara, P.W. Kingcade** (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.
- Hegen, M., J. Kameoka, R.P. Dong, S.F. Schlossman, C. Morimoto** (1997). Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology* 90: 257-264.
- Heider, K.H., M. Hofmann, E. Horst, F. van den Berg, H. Ponta, P. Herrlich, S.T. Pals** (1993). A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell. Biol.* 120: 227-233.
- Henning, S.W., D.A. Cantrell** (1998). GTPases in antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 322-329.
- Hesketh, J., D. Dobbelaere, J.F. Griffin, G. Buchan** (1993). Detection of proliferating cell nuclear antigens and interleukin-2 beta receptor molecules on mitogen- and antigen-stimulated lymphocytes. *Immunology* 79: 465-470.
- Hildebrand, M.D., M.C. Schaller, J.T. Parson** (1993). Identification of sequences required for the efficient localisation of the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}, to cellular focal adhesion. *J. Cell. Biol.* 123: 993-1005.
- Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, S. Tsukita** (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J. Cell. Biol.* 135: 37-51.
- Hodge-Dufour, J., P.W. Noble, M.R. Horton, C. Bao, M. Wysoka, M.D. Burdick, R.M. Strieter, G. Trinchieri, E. Puré** (1997). Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol.* 159: 2492-2500.
- Hoffmann, R.A., P.C. Kung, P.W. Hansen, G. Goldstein** (1980). Simple and rapid measurement of human T-lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4914.
- Hofmann, M., W. Rudy, U. Günthert, S.G. Zimmer, V. Zadswitz, M. Zöller, R.B. Lichtner, P. Herrlich, H. Ponta** (1993). A Link between ras and Metastatic Behavior of Tumor Cells: ras Induces CD44 Promoter Activity and Leads to Low-Level Expression of Metastatic-specific Variants of CD44 in CREB Cells. *Cancer Res.* 53: 1516-1221.
- Hua, Q., C.B. Knudson, W. Knudson** (1993). Internalisation of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell. Sci.* 106: 365-375.
- Huang, X., Y. Li, K. Tanaka, K.G. Moore, J.I. Hayashi** (1995). Cloning and characterisation of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C_{γ1}, Greb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11618-11622.
- Hubert, P., V. Lang, P. Debré, G. Bismuth** (1996). Tyrosine Phosphorylation and Recruitment of ZAP-70 to the CD3-TCR Complex Are Defective After CD2 Stimulation. *J. Immunol.* 157: 4322-4332.
- Huet, S., H. Groux, B. Caillou, H. Valentin, A.M. Prieur, A. Bernard** (1989). CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.* 143: 798-801.
- Hyman, R.** (1973). Studies on surface antigen variants: Isolation of two complementary variants for Thy 1.2. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 415-420.
- Idzerda, R.L., W.G. Carter, C. Nottenburg, E.A. Wayner, W.M. Gallatin, T. St. John** (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.
- Iida, N., L.Y. Bourguignon** (1995). New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J. Cell. Physiol.* 162: 127-133.
- Ilangumaran, S., A. Briol, D.C. Hoesseli** (1998). CD44 selectively associates with active src family protein tyrosine kinase Lck and fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 91: 3901-3908.
- Imboden, J.B., C.H. June, M.C. McCutcheon, J.A. Ledbetter** (1990). Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *J. Clin. Invest.* 85: 130.
- Isakov, N., R.L. Wange, W.H. Burgess, J.D. Watts, R. Aebersold, L.E. Samelson** (1995). ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind tyrosine based activation motifs with varying affinity. *J. Exp. Med.* 181: 375-380.
- Iwashima, M., B.A. Irving, N.S.C. van Oers, A.C. Chan, A. Weiss** (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263: 1136-1139.
- Jackman, J.K., D.G. Motto, Q. Sun, M. Tanemoto, C.W. Turck, G.A. Peltz, G.A. Koretzky, P.R. Findell** (1994). Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyrosine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 7029-7032.
- Jacobson, K., D. O'Dell, B. Holifield, T.L. Murphy, J.T. August** (1984). Redistribution of a major cell surface glycoprotein during cell movement. *J. Cell. Biol.* 99: 1613-1623.

- Jalkanen, S., A. Steere, R. Fox, E.C. Butcher** (1986). A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 233: 556-558.
- Jalkanen, S., R.F. Bargatze, J. de los Toyos, E.C. Butcher** (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., M. Jalkanen, R. Bargatze, M. Tammi, E.C. Butcher** (1988). Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* 141: 1615-1623.
- Jalkanen, S., M. Jalkanen** (1992). Lymphocyte CD44 binds the CooH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell. Biol.* 116: 817-825.
- Johnson, G.L., R.R. Vaillancourt** (1994). Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 230-238.
- Jucker, M., K. McKenna, A.J. da Silva, C.E. Rudd, R.A. Feldman** (1997). The Fes protein-tyrosine kinase phosphorylates a subset of macropages proteins that are involved in cell adhesion and cell-cell signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 2104-2109.
- Kalomiris, E.L., V.A. Bourguignon** (1988). Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin. *J. Cell Biol.* 106: 319-327.
- Kalomiris, E.L., V.A. Bourguignon** (1989). Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, G85, and function in GP85-ankyrin binding. *J. Biol. Chem.* 264: 8113-8119.
- Kang, S., B. Beverly, R.H. Schwartz, M.J. Lenardo** (1990). unveröffentliche Beobachtungen.
- Karnitz, L.M., S.L. Sutor, R.T. Abraham** (1994). The src-family kinase, fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin 2-responsive T cell line. *J. Exp. Med.* 179: 1799-1808.
- Katoh, S., J.B. McCarthy, P.W. Kincade** (1994). Characterisation of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J. Immunol.* 153: 3440-3449.
- Katoh, S., Z. Zheng, K. Oritani, T. Shimozato, P.W. Kincade** (1995). Glycosylation of CD44 negatively regulates ist recognition of hyaluronan. *J. Exp. Med.* 182: 419-429.
- Kaya, G., I. Rodriguez, J.I. Jorcano, P. Vassali, I. Stamenkovic** (1997). Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev.* 11: 996-1007.
- Kelleher, D., A. Murphy, C. Feighery, E.B. Casey** (1995). Leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and CD44 are signaling molecules for cytoskeleton-dependent morphological changes in activated T cells. *J. Leukocyte Biol.* 58: 539-546.
- Kersh, E.N., A.S. Shaw, P.M. Allen** (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science* 281: 572-575.
- Khaldoyanini, S., A. Denzel, M. Zöller** (1996). Requirement for CD44 in proliferation and homing of haematopoietic precursor cells. *J. Leuk. Biol.* 60: 579-592.
- Khaldoyanidi, S., D. Schnabel, N. Föhr, M. Zöller** (1997). Functional activity of CD44 isoforms in haemopoiesis of the rat. *Brit. J. Haematol.* 96: 31-45.
- Khaldoyanidi, S., J. Moll, S. Karakanova, P. Herrlich, H. Ponta** (1998). Hyaluronate-enhanced hemopoiesis: Two different receptors trigger the release of interleukin-1 β and interleukin-6 from bone marrow macrophages. *Manuskript in Vorbereitung.*
- Khokhaletchev, A.V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, M.H. Cobb** (1998). Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerisation and Nuclear Translocation. *Cell* 93: 605-615.
- Khosravi-Far, R., S. Campbell, K.L. Rossman, C.J. Der** (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* 72: 71-107.
- King, A.G., B.W. Ozanne, C. Smythe, A. Ashworth** (1995). Isolation and characterization of a uniquely regulated threonine, tyrosine phosphatase (TYP 1) which inactivates ERK2 and p54^{lnk}. *Oncogene* 11: 2553-2563.
- Klausner R.D., Samelson, L.E.** (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64: 875.
- Kohda, D., C.J. Morton, A.A. Parkar, H. Hatanaka, F.M. Inagaki, I.D. Campbell, A.J. Day** (1996). Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell* 86: 767-775.
- Koopman, G., Y. van Kooyk, M. de Graaff, C. J.L.M. Meyer, G. Figdor, S. Pals** (1990). Triggering of the CD44 antigen on T-lymphocytes promotes T-cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J. Immunol.* 145: 3589-3593.
- Koopman, G., K.H. Heider, E. Horst, G.R. Adolf, F. van den Berg, H. Ponta, P. Herrlich, S.T. Pals** (1993). Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904.
- Krypta, R.M., A. Hemming, S.A. Courtneidge** (1988). Identification and characterisation of p59^{lyn} (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7: 3837-3844.
- Kwak, S.P., J.E. Dixon** (1995). Multiple Dual Specificity Protein Tyrosine Phosphatases Are Expressed and Regulated Differentially in Liver Cell Lines. *J. Biol. Chem.* 270: 1156-1160.

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamond, A.I., M. Mann** (1997). Cell biology and the genome projects-a concerted strategy for characterizing multiprotein complexes by using mass spectrometry. *Trends in Cell Biology* 7: 139-142.
- Langdon, W.Y., J.W. Hartley, S.P. Klinken, S.K. Ruscetti, H.C. Morse 3d** (1989). V-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1168-1172.
- Laurent, T.C.** (1989). In: „The Biology of Hyaluronan, CIBA Foundation Symposium 143. pp. 1-5, Wiley, Chichester, England.
- Laurent, T.C., J.R.E. Fraser** (1992) Hyaluronan. *FA-SEB J.* 6: 2397-2404.
- Laurent, T.C.** (1998). The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. *Wenner-Gren international series Vol. 72.*
- Lecine, P., M. Algarte, P. Rameil, C. Beading, P. Bucher, M. Nabholz, J. Imbert** (1996). Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2-receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6829-6840.
- Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter, J.E. Strickler, M.M. McLaughlin, I.R. Siemens, S.M. Fisher, G.P. Livi, J.R. White, J.L. Adams, P.R. Young** (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746.
- Legg, J.W., C.M. Isacke** (1998). Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr. Biol.* 8: 705-708.
- Leo, O., M. Foo, D.H. Sachs, L.E. Samelson** (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Immuol.* 84: 1374-1378.
- Lesley, J., R. Schulte, R. Hyman** (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., Q. He, K. Miyake, A. Hamann, R. Hyman P.W. Kincade** (1992a). Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J. Exp. Med.* Vol 175: 257-266.
- Lesley, J., R. Hyman** (1992b). CD44 can be induced to function as an hyaluronic acid receptor in normal murine T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 2719-2723.
- Lesley, J., P.W. Kincade, R. Hyman** (1993a). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* 54: 271-335.
- Lesley, J., P.W. Kincade, R. Hyman** (1993b). Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur. J. Immunol.* 23: 1902-1909.
- Letourneur, F., R.D. Klausner** (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3e. *Science* 255: 79-82.
- Levesque, M.C., B.F. Haynes** (1996). In vitro culture of human blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant isoform expression. *J. Immunol.* 15: 1557-1565.
- Lewis L.A., C.D. Chung, J. Chen, J.R. Parnes, M. Moran, V.P. Patel, M.C. Miceli** (1997). The Lck SH2 phosphotyrosine binding site is critical for efficient TCR-induced progressive tyrosine phosphorylation of the zeta chain and IL-2 production. *J. Immunol.* 159: 2292-2300.
- Li, R., J.R. Walker, P. Johnson** (1998). Chimeric CD4/CD44 molecules associate with CD44 via the transmembrane region and reduce hyaluronan binding in T cell lines. *Eur. J. Immunol.* 28: 1745-1754.
- Liao, H.X., M.C. Levesque, K. Patton, B. Bergamo, D. Jones, M.A. Moody, M.J. Telen, B.F. Haynes** (1993). Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 151: 6490-6499.
- Lim, L., E. Manser, T. Leung, C. Hall** (1996). Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. *Eur. J. Biochem.* 242: 171-185.
- Lin, J.X., T.S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J.A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E.T. Bloom, J. Mietz, S. John, W.J. Leonard** (1995a). The role of shared receptor motifs and common STAT proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2: 331-339.
- Lin, J., T.W. Gettys, L. Qin, K.D. Chavin, Q. Yang, Y. Ding, J.D. Punch, J.S. Bromberg** (1995b). Increased cAMP and cAMP-dependent protein kinase activity mediate anti-CD2 induced suppression of anti-CD3-driven Interleukin-2 production and CD25 expression. *Pathobiology* 63: 175-187.
- Lisbona, C., S. Alemany, M. Fernandez-Renart** (1997). Regulation of Erk2 dephosphorylation in G1-stimulated rat T lymphoblasts. *J. Clin. Immunol.* 17: 494-501.
- Liu, D., D. Zhang, H. Mori, M.S. Sy** (1996). Binding of CD44 to hyaluronic acid can be induced by multiple signals and requires the CD44 cytoplasmic domain. *Cell. Immunol.* 174: 73-83.
- Liu, D., M.S. Sy** (1996). A Cysteine Residue Located in the Transmembrane Domain of CD44 Is Important in Binding of CD44 to Hyaluronic Acid. *J. Exp. Med.* 183: 1987-1994.

- Liu, D., M.S. Sy** (1997). Phorbol Myristate Acetate Stimulates the Dimerization of CD44 Involving a Cysteine in the Transmembrane Domain. *J. Immunol.* 159: 2702-2711.
- Liu, K.D., S.L. Gaffen, M.A. Goldsmith** (1998). JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 271-278.
- Lohoff, M., E. Schmitt, A.B. Reske-Kunz, M. Rölinghoff** (1990). Different response of T_H1 cells for stimulation with anti-CD-3 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 20: 653-658.
- Lokeshwar, V.B., N. Fregien, L.Y.W. Bourguignon** (1994). Ankyrin-binding Domain of CD44 (GP85) Is Required for the Expression of Hyaluronic Acid-mediated Adhesion Function. *J. Cell. Biol.* 126: 1099-1109.
- Lucas, M.G., A.M. Green, M.J. Telen** (1989). Characterisation of the serum In(lu)-related antigen: identification of a serum protein related to erythrocyte p80. *Blood*: 73: 596-600.
- Lugasi, H., S. Hajos, J.R. Murphy, T.B. Strom, J. Nichols, C. Penarroja and D. Naor** (1990). Murine spontaneous T-Cell leukemia constitutively expressing IL-2 receptor-a model for human T-cell malignancies expressing IL-2 receptor. *Int. J. Cancer.* 45: 163-167.
- Lynch, F., R. Ceredig** (1989). Mouse strain variation in Ly-24 (Pgp-1) expression by peripheral T cells and thymocytes: implications for T cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 19: 223-229.
- Machesky, L.M., A. Hall** (1996). Rho: a connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. *Trends Cell. Biol.* 6: 304-310.
- Mackay, C.R., H.J. Terpe, R. Stauder, W.L. Marston, H. Stark** (1994). Expression and Modulation of CD44 Variant Isoforms in Humans. *J. Cell. Biol.* 124: 71-82.
- Maguire, J.E., K.M. Danahey, L.C. Burkly, G.A. van Seventer** (1995). T Cell Receptor- and β_1 Integrin-mediated Signals Synergize to Induce Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (pp125^{FAK}) in Human T Cells. *J. Exp. Med.* 182: 2079-2090.
- Maiti, A., G. Maki, P. Johnson** (1998). TNF- α induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science* 282: 941-943.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor, New York.
- Marengère, L.E.M., C. Mirtsos, I. Koziardadzki, A. Veillette, T.W. Mak, J.M. Penninger** (1997). Proto-Oncoprotein Vav Interacts with c-Cbl in Activated Thymocytes and Peripheral T Cells. *J. Immunol.* 159: 70-76.
- Margolis, B., P. Hu, S. Katzav, W. Li, J.M. Oliver, A. Ullrich, A. Weiss, J. Schlessinger** (1992). Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* 356: 71-74.
- Martell, K.J., A.F. Seasholtz, S.P. Kwak, K.K. Clemens, J.E. Dixon** (1995). hVH-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* 65: 1823-1833.
- Martin, S.J., C.P.M. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C.A.A. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green** (1995). Early Redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182: 1545-1556.
- Mattern, T. C. Reich, U. Schoneck, S. Ansoerge, H.U. Demuth, H. Loppnow, A.J. Ulmer, H.D. Flad** (1998). CD26 (dipeptidyl peptidase i.v.) on human T lymphocytes does not mediate adhesion of these cells to endothelial cells or fibroblasts. *Immunobiology* 198: 465-475.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi** (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO* 15: 2208-2216.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, S. Tsukita** (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell. Biol.* 140: 647-657.
- Matsumura, Y., D. Tarin** (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340: 1053-1058.
- McCormick, F.** (1993). Signal transduction-how receptors turn ras on. *Nature*: 363: 15-16.
- McKee, C.M., M.B. Penno, M. Cowman, M.D. Burdick, R.M. Strieter, C. Bao, P.W. Noble** (1996). Hyaluronan (HA) Fragments Induce Chemokine Gene Expression in Alveolar Macrophages. *J. Clin. Invest.* 98: 2403-2413.
- McKee, C.M., C.J. Lowenstein, M.R. Horton et al.** (1997). Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272: 8013.
- McKennedy, D.W., H. Onodera, L. Gorman, T. Mimura, D.M. Rothstein** (1995). Distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase differentially regulate interleukin 2 secretion and activation signal pathways involving Vav in T cells. *J. Biol. Chem.* 270: 24949-24954.
- Meisner, H., B.R. Conway, D. Hartley, M.P. Czech** (1995). Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3571-3578.
- Meuer, S.C., R.E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K.A. Fitzgerald, J.C. Hodgdon, J.P. Protentis, S.F. Schlossman, E.L. Reinherz** (1984). An alternative pathway for T-cell activation: a functional role for the 50 kDa T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36: 897-906.

- Migita, K., K. Eguchi, Y. Kawabe, T. Tsukada, Y. Ichinose, S. Nagataki, A. Ochi** (1995). Defective TCR-Mediated Signaling in Anergic T Cells. *J. Immunol.* 155: 5083-5087.
- Minden, A., A. Lin, F.X. Claret, A. Abo, M. Karin** (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81: 1147-1157.
- Miyake K., C.B. Underhill, J. Lesley, P.W. Kincade** (1990a). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172: 69-75.
- Miyake, K., K.L. Medina, S.I. Hayashi, S. Ono, T. Hamaoka, P.W. Kincade** (1990b). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 171: 477-488.
- Moll, J. A., Schmidt, H. van der Putten, R. Pflug, H. Ponta, P. Herrlich, M. Zöller** (1996). Accelerated immune response in transgenic mice expressing rat CD44v4-v7 on T cells. *J Immunol.* 156: 2085-2094.
- Moll, J., S. Khaldoyanidi, J.P. Sleeman, M. Achtnich, I. Preuss, H. Ponta, P. Herrlich** (1998). Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis. *J. Clin. Invest.* 102: 1024-1034.
- Morimoto, C., K. Tachibana** (1996). Beta 1 integrin-mediated signaling in human T cells. *Hum. Cell.* 9: 163-168.
- Muda, M., U. Boschert, R. Dickinson, J.C. Martinou, I. Martinou, M. Camps, W. Schlegel, S. Arkinstant** (1996). MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.* 271: 4319-4326.
- Murakami, S., Y. Shimabukuro, Y. Miki, T. Saho, E. Hino, D. Kasai, T. Nozaki, Y. Kusumoto, H. Okada** (1994). Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton association but does require new protein synthesis. *J. Immunol.* 152: 467-477.
- Mustelin, T., A. Altman** (1990). Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase p56^{lck} by the leukocyte common antigen (CD45). *Oncogene* 5: 809-813.
- Mustelin, T., P. Burn** (1993). Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes. *TIBS* 18: 215-220.
- Naor, D., R. Vogt Sionov, D. Ish Shalom** (1997). CD44: Structure, function and association with the metastatic process. *Adv. Cancer Res.* 71: 241-319.
- Naor, D.** Activation of cell surface CD44 molecule is dependent on synergistic effect on protein kinase C stimulation and the receptor deglycosylation. *Manuskript in Vorbereitung.*
- Naujokas, M.F., M. Morin, M.S. Anderson, M. Peterson, J. Miller** (1993). The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell response by interaction with CD44. *Cell* 74: 257-268.
- Neame, P.J., J.E. Christner, J.R. Baker** (1986). The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J. Biol. Chem.* 261: 3519-3535.
- Neel, G.** (1997). Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 405-420.
- Nel, A.E., S. Pollack, G. Landreth, J.A. Ledbetter, L. Hultin, K. Williams, R. Katz, B. Akerley** (1990). CD-3-mediated activation of MAP-2 kinase can be modified by ligation of the CD4 receptor. *J. Immunol.* 145: 971-979.
- Nemoto, T., T. Takeshita, N. Ishii, M. Kondo, M. Higuchi, S. Satomi, M. Nakamura, S. Mori, K. Sugamura** (1995). Differences in the interleukin-2 (IL-2) receptor system in human and mouse: alpha chain is required for formation of the functional mouse IL-2 receptor. *Eur. J. Immunol.* 25: 3001-3005.
- Neumann, C.M., J.A. Oughton, N.I. Kervliet** (1992). Anti-CD3-induced T-cell activation in vivo-I. Flow cytometric analysis of dose-response, time-dependent, and cyclosporin a-sensitive parameters of CD4⁺ and CD8⁺ cells from the draining lymph nodes of C57Bl/6 mice. *Int. J. Immunopharmac.* 14: 1295-1304.
- Neumeister, E., A. S. Shaw, P.M. Allen** (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 281: 572-575.
- Ng, J., D. Cantrell** (1997). STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 24542-24549.
- Njima, Y., N. Morino, T. Mimura, K. Hamasaki, H. Furuya, R. Sakai, T. Sato, K. Tachibana, C. Morimoto, Y. Yazaki, H. Hirai** (1995). Intergin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130^{Cas}, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J. Biol. Chem.* 270: 15398-15402.
- Noble, P.W., F.R. Lake, P.M. Henson, D.W.H. Riches** (1993). Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by tumor necrosis factor- α -dependent mechanism in murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 91: 2368-2377.
- Noble, P.W., C.M. McKee, M. Cowman, H.S. Shin** (1996). Hyaluronan Fragments Activate an NF- κ B/I- κ B α Autoregulatory Loop in Murine Macrophages. *J. Exp. Med.* 183: 2373-2378.
- Nottenburg, C., G. Rees, T. St. John** (1989). Isolation of CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8521-8525.
- Novak, T.J., D. Farber, D. Leitenberg, S.C. Hong, P. Johnson, K. Bottomly** (1994). Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1: 109-119.
- Oettgen, H.C., C. Terhorst, L.C. Cantley, P.M. Rossoff** (1985). Stimulation of the T3-T Cell Receptor Complex Induces a Membrane-Potential-Sensitive Calcium Influx. *Cell* 40: 583-590.

- O'Farrell, P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 4007-4021.
- Ohashi, Y., K. Tachibana, K. Kamiguchi, H. Fujita, C. Morimoto** (1998). T Cell Receptor-mediated Tyrosine Phosphorylation of Cas-L, a 105-kDa Crk-associated Substrate-related Protein, and Its Association of Crk and C3G. *J. Biol. Chem.* 273: 6446-6451.
- Oksala, O., T. Salo, R. Tammi, L. Hakkinen, M. Jalakanen, P. Inki, H. Larjava** (1995). Expression of proteoglycans and hyaluronane during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 125-135.
- Orloff, D.G., S.J. Frank, F.A. Robey, A.M. Weisman, R.D. Klausner** (1989). Biochemical characterisation of the eta chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to zeta. *J. Biol. Chem.* 264: 14812-14817.
- Osman, N., S. Lucas, D. Cantrell** (1995). The role of tyrosine phosphorylation in the interaction of cellular tyrosine kinases with the T cell receptor ζ chain tyrosine-based activation motif. *Eur. J. Immunol.* 25: 2863-2869.
- Ostergaard, H.L., O. Lou, C.W. Arendt, N.N. Berg** (1998). Paxillin phosphorylation and association with Lck and Pyk2 in anti-CD3- or anti-CD45-stimulated T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 5692-5696.
- Pals, S.T., E. Horst, G.J. Ossekoppele, C.G. Figdor, R.J. Scheper, C.J. Meijer** (1989). Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodkin's lymphoma. *Blood* 73: 885-888.
- Pani, G., K.D. Fischer, I. Mlinaric-Rascan, K.A. Simionovitch** (1996). Signaling Capacity of the T Cell Antigen Receptor Is Negatively Regulated by the PTP1C Tyrosine Phosphatase. *J. Exp. Med.* 184: 839-852.
- Pardi R., L. Inverardi, J.R. Bender** (1992a). Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol. Today* 13: 224-230.
- Pardi, R., L. Inverardi, C. Rugarki, C. Bener** (1992b). Antigen-receptor complex stimulation triggers protein kinase C-dependent CD11a/CD18-cytoskeleton interaction in T-lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 116: 1211-1220.
- Pastor, M.I., M. Woodrow, D. Cantrell** (1995a). Regulation and Function of p21ras in T Lymphocytes. *Cancer Surv.* 22: 75-83.
- Pastor, M.I., K. Reif, D. Cantrell** (1995b). The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* 16: 159-164.
- Peach, R.J., D. Hollenbaugh, I. Stamenkovic, A. Aruffo** (1993). Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell. Biol.* 122: 257-264.
- Peck, D., C.M. Isacke** (1998). Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic peptide containing a phosphoserine at position 325. *J. Cell. Sci.* 111: 1595-1601.
- Pedraza-Alva, G., L.B. Merida, S.J. Burakoff, Y. Rosenstein** (1996). CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 27564-27568.
- Perschl, A., J. Lesley, N. English, I. Trowbridge, R. Hyman** (1995). Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding. *Eur. J. Immunol.* 25: 495-501.
- Petch, L.A., S.M. Bockholt, A. Bouton, J.T. Parsons, K. Burridge** (1995). Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 Src substrate. *J. cell. Sci.* 108: 1371-1379.
- Peter, K., T.E. O'Toole** (1995). Modulation of cell adhesion by changes in $\alpha_4\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J. Exp. Med.* 181: 315-326.
- Peters, D.J., B.R. McGrew, D.C. Perron, L.M. Liptak, A.P. Laudano** (1990). In vivo phosphorylation and membrane association of the fyn protooncogene product in IM-9 human lymphoblasts. *Oncogene* 5:1313.
- Picker, L.J., M. Nakache, E.C. Butcher** (1989). Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J. Cell Biol.* 109: 927-937.
- Pierres, A., C. Lipcey, C. Mawas, D. Olive** (1992). A unique CD44 monoclonal antibody identifies a new T cell activation pathway. *Eur. J. Immunol.* 22: 413-417.
- Plas, D.R., R. Johnson, J.T. Pingel, R.J. Matthews, M. Dalton, G. Roy, A.C. Chan, M.L. Thomas** (1996). Direct Regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T Cell Antigen Receptor Signaling. *Science* 272: 1173-1176.
- Portoles, P., J. Rojo, A. Golby, M. Bonneville, S. Gromkowski, L. Greenbaum, C.A. Janeway, Jr., D.B. Murphy, K. Bottomly** (1989). Monoclonal antibodies to murine CD3 ϵ define distinct epitopes, one of which may interact with CD4 during T cell activation. *J. Immunol.* 142: 4169-4175.
- Pronk, G.J., J.L. Bos** (1994). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochem. Biophys. Acta.* 1198: 131-147.
- Puré, E., R.L. Camp, D. Peritt, R.A. Panettieri, A.L. Lazaar, S. Nayak** (1995). Defective Phosphorylation and Hyaluronate Binding of CD44 with Point Mutations in the Cytoplasmic Domain. *J. Exp. Med.* 181: 55-62.
- Qian, D., A. Weiss** (1997). T cell receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 205-212.
- Qian, D., S. Lev, N.S.C. van Oers, I. Dikic, J. Schlessinger, A. Weiss** (1997). Tyrosine Phosphorylation of Pyk2 Is Selectively Regulated by Fyn During TCR Signaling. *J. Exp. Med.* 185: 1253-1259.
- Quill, H., M.P. Riley, E.A. Cho, J.E. Casnellie, J.C. Reed, T. Torigoe** (1992). Anergic Th1 cells express altered levels of the protein tyrosine kinases p56^{lck} and p59^{fyn1}. *J. Immunol.* 149: 2887-2893.

- Qureshi, S.A., K. Alexandropoulos, M. Rim, C.K. Joseph, J.T. Bruder, U.R. Rapp, D.A. Foster** (1992). Evidence that Ha-Ras mediates two distinguishable intracellular signals activated by v-src. *J. Biol. Chem.* 267: 17635-17639.
- Raab, M., A.J. da Silva, P.R. Findell, C.E. Rudd** (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6: 155-164.
- Rafi, A., M. Nagarkatti, P.S. Nagarkatti** (1997). Hyaluronate-CD44 interactions can induce murine B cell activation. *Blood* 89: 2901-2908.
- Ravichandran, K.S., K.K. Lee, Z. Songyang, L.C. Cantleey, P. Burn, S.J. Burakoff** (1993). Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 262: 902-905.
- Reber, S., S. Matzku, U. Günthert, H. Ponta, P. Herrlich, M. Zöller** (1990). Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 46: 919-927.
- Reinherz, E.L., P.C. Kung, J.M. Pesando, J. Ritz, G. Goldstein, S.F. Schlossman** (1979). Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 150: 1472-1478.
- Reth, M.** (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338: 383-384.
- Robey, E., J.P. Allison** (1995). T cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immuol. Today* 16: 306-309.
- Rohan, P.J., P. Davis, C.A. Moskaluk, M. Kearns, H. Krutzsch, U. Siebenlist, K. Kelly** (1993). PAC-1: A Mitogen-Induced Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase. *Science* 259: 1763-1766.
- Rothlein, R., T.A. Springer** (1986). The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leucocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* 163: 1132-1142.
- Rothman, B., M.L. Blue, K.A. Kelley, D. Wunderlich, D.V. Mierz, T.M. Aune** (1991). Human T cell activation by OKT3 is inhibited by a monoclonal antibody to CD44. *J. Immunol.* 147: 2493-2499.
- Rothman, B., N. Kennure, K.A. Kelley, M. Katz, T.M. Aune** (1993). Elevation of intracellular cAMP in human T lymphocytes by an anti-CD44 mab. *J. Immuol.* 151: 6036-6042.
- Rozsnyay, Z., G. Sarmay, M. Zöller, J. Gergely** (1996). Membrane-bound ezrin is involved in B-cell receptor-mediated signaling: potential role of an ITAM-like ezrin motif. *Immunol. Lett.* 54: 163-169.
- Rudd, C.E., O. Janssen, Y.C. Cai, A.J. da Silva, M. Raab, K.V.S. Prasard** (1994). Two-step TCR ζ /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today* 15: 225-234.
- Rudy, W., M. Hofmann, R. Schwartz-Albiez, M. Zöller, K.H. Heider, H. Ponta, P. Herrlich** (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.
- Saito, H., S. Tsujitani, K. Katano, M. Ikeguchi, M. Maeta, N. Kaibara** (1998). Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 83: 1094-1101.
- Samelson, L.E., M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, C.H. June** (1990). Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J. Immunol.* 145: 2448-2454.
- Sanchez-Garcia, F.J., W.W. Aller, W.T. McCormack** (1997). Impaired calcium mobilization and differential tyrosine phosphorylation in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 91: 81-87.
- Saxena, M., S. Williams, J. Gilman, T. Mustelin** (1998). Negative Regulation of T Cell Antigen Receptor Signal Transduction by Haematopoietic Tyrosine Phosphatase (HePTP). *J. Biol. Chem.* 273: 15340-15344.
- Schmits, R., J. Filmus, N. Gerwin, G. Senaldi, F. Kiefer, T. Kundig, A. Wakeham, A. Shahinian, C. Catzavelos, J. Rak, C. Furlonger, A. Zakarian, J.J.L. Simard, P.S. Ohashi, C.J. Paige, J.C. Gutierrez-Ramos, T.W. Mak** (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90: 2217-2233.
- Schraven, B., D. Schoenhaut, E. Bruyns, G. Koretzky, C. Eckerskorn, R. Wallich, H. Kirchgessner, P. Sarkorafas, B. Labkovski, S. Ratnofsky, S. Meuer** (1994). LPAP, a novel 32-kDa phosphoprotein that interacts with CD45 in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 29102-29111.
- Schraven, B., E. Bruyns, A. Verhagen, H. Kirchgessner, A.M. Cardine** (1997). The SKAPs and TRAMs: novel components of the membrane proximal signaling apparatus of T-lymphocytes. *Immunology-Meeting Langen.* Abstract A2.
- Schuh, K., T. Twardzik, B. Kneitz, J. Heyer, A. Schimpl, E. Servling** (1998). The Interleukin 2 Receptor α Chain/CD25 Promoter Is a Target for Nuclear Factor of Activated T Cells. *J. Exp. Med.* 188: 1369-1373.
- Schwartz, R.H.** (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349-1356.
- Sconocchia, G., J.A. Titus, D.M. Segal** (1994). CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *J. Immunol.* 153: 5473-5481.
- Sconocchia, G., J.A. Titus, D.M. Segal** (1997). Signaling pathways regulating CD44-dependent cytolysis in natural killer cells. *Blood* 90: 716-725.

- Screaton, G.R., M.V. Bell, D.G. Jackson, F.B. Cornelis, U. Gerth, J.I. Bell** (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., R. Arch, S. Reber, D. Komitowski, M. Hofmann, H. Ponta, P. Herrlich, S. Matzku, M. Zöller** (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* 177: 443-455.
- Seth, A., L. Gote, M. Nagarkatti, P.S. Nagarkatti** (1991). T-cell-receptor-independent activation of cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes mediated through CD44 and gp90^{MEL-14}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7877-7881.
- Sherman, L., D. Wainwright, H. Ponta, P. Herrlich** (1998). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes & Development* 12: 1058-1071.
- Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchneko, H. Boucherie, M. Mann** (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14440-14445.
- Shimizu, Y., G.A. van Seventer, R. Siraganian, L. Wahl, S. Lhaw** (1989). Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* 143: 2457-2463.
- Shin, D.Y., T. Ishibashi, T.S. Choi, E. Chung, I.Y. Chung, S.A. Aaronson, D.P. Bottaro** (1997). A novel human ERK phosphatase regulates H-ras and v-raf signal transduction. *Oncogene* 14: 2633-2639.
- Sionov, R., D. Naor** (1997). Hyaluronan-independent lodgment of CD44⁺ lymphoma cells in lymphoid organs. *Int. J. Cancer.* 71: 462-469.
- Skelton, T.P., C. Zeng, A. Nocks, I. Stamenkovic** (1998). Glycosylation Provides Both Stimulatory and Inhibitory an Cell Surface and Soluble CD44 Binding to Hyaluronan. *J. Cell. Biol.* 140: 431-446.
- Skerka, C., E.L. Decker, P.F. Zipfel** (1995). A regulatory element in the human interleukin 2 gene promotor is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. *J. Biol. Chem.* 270: 22500-22506.
- Sleeman, J., W. Rudy, M. Hofmann, J. Moll, P. Herrlich, H. Ponta** (1996a). Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J. Cell. Biol.* 135: 1139-1150.
- Sleeman, J., S. Arming, J. F. Moll, A. Hekele, W. Rudy, L.S. Sherman, G. Kreil, H. Ponta, P. Herrlich** (1996b). Hyaluronate-independent Meta-static Behavior of CD44 Variant-expressing Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 56: 3134-3141.
- Sleeman, J., K. Kondo, J. Moll, H. Ponta, P. Herrlich** (1997). Variant Exons v6 and v7 Together Expand the Repertoire of Glycosaminoglycans Bound by CD44. *J. Biol. Chem.* 272: 31837-31844.
- Sleeman, J., U. Rahmsdorf, A. Steffen, H. Ponta, P. Herrlich** (1998). CD44 variant exon v5 encodes a tyrosine which is sulphated. *Eur. J. Biochem.* 255: 74-80.
- Slevin, M., J. Krupinski, S. Kumar, J. Gaffney** (1998). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmatic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab. Invest.* 78: 987-1003.
- Sommer, F., M. Huber, M. Röllinghoff, M. Lohoff** (1995). CD44 plays a co-stimulatory role in murine T cell activation: ligation of CD44 selectively co-stimulates IL-2 production, but not proliferation in TCR-stimulated murine Th1 cells. *Intern. Immunol.* 7: 1779-1786.
- Soula, M., B. Rothhut, L. Camoin, J.L. Guillaume, D. Strosberg, T. Vorherr, P. Burn, F. Meggio, S. Fischer, R. Fagard** (1993). Anti-CD3 and Phorbol Ester Induce Distinct Phosphorylated Sites in the SH2 Domain of p56^{lck}. *J. Biol. Chem.* 268: 27420-27427.
- Spinozzi, F., E. Agea, O. Bistoni, S. Belia, A. Travetti, R. Gerli, C. Muscat, A. Bertotto** (1995). Intracellular calcium levels are differentially regulated in T lymphocytes triggered by anti-CD2 and anti-CD3 monoclonal antibodies. *Cell. Signal.* 7: 287-293.
- Stamenkovic, I., M. Amiot, J.M. Pesando, B. Seed** (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56: 1057-1062.
- Stauder, R., W. Eisterer, J. Thaler, U. Günthert** (1995). CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85: 2885-2899.
- St. John, T., J. Meyer, R. Idzerda, W.M. Gallatin** (1990). Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* 60: 45-52.
- Stover, D.R., K.A. Walsh** (1994). Protein-tyrosine phosphatase activity of CD45 by sequential phosphorylation by two kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5523-5532.
- Straus, D., A. Weiss** (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70: 585-593.
- Straus, D., A. Weiss** (1993). The CD3 chains of the T cell antigen receptor associates with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated following receptor stimulation. *J. Exped. Med.* 178: 1523-1530.
- Su, B., E. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin, Y. Ben-Neriah** (1994). JNK is involved in signal transduction during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77: 727-736.
- Sun, H., C.H. Charles, L.F. Lau, N.K. Tonks** (1993). MKP-1 (3CH134), an Immediate Early Gene Product, Is a Dual Specificity Phosphatase That Dephosphorylates MAP Kinase In Vivo. *Cell* 75: 487-493.
- Sy, M.S., Y.J. Guo, I. Stamenkovic** (1991). Distinct effects of two CD44 Isoforms on tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.* 174: 859-866.

- Szamel, M., K. Resch** (1995). T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways. Activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 228: 1-15.
- Taher, T.E.I., L. Smit, A.W. Griffioen, E. J. Schilder-Tol, J. Borst, S.T. Pals** (1996). Signalling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 2863-2867.
- Takaki, S., J.D. Watts, K.A. Forbush, N.T. Nguyen, J. Hayashi, J. Alberola-Ila, R. Aebersold, R.M. Perlmutter** (1997). Charakterisation of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 14562-14570.
- Tanabe, K.K., L.M. Ellis, H. Saya** (1993). Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 341: 725-726.
- Tanaka, Y., D.H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist, S. Shaw** (1993). T-Cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-beta. *Nature* 361: 79-82.
- Tangye, S.G., J. Wu, G. Aversa, J.E. de Vries, L.L. Lanier, J.H. Phillips** (1998). Negative Regulation of Human T Cell Activation by the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase CD148. *J. Immunol.* 161: 3803-3807.
- Thuillier, L., C. Hivroz, R. Fagard, C. Andreoli, P. Mangeat** (1994). Ligation of CD4 surface antigen induces rapid tyrosine phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Cell. Immunol.* 156: 322-331.
- Tominaga, T., K. Sugie, M. Hirata, N. Morii, J. Fukata, A. Uchida, H. Imura, S. Narumja** (1993). Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocytes aggregation by ADP ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J. Cell. Biol.* 120: 1529-1537.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Toyama-Sorimachi, N., H. Sorimachi, Y. Tobita, F. Kitamura, H. Yagita, K. Suzuki, M. Miyasaka** (1995). A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adhesion and activation. *J. Biol. Chem.* 270: 7437-7444.
- Trochon, V., C. Mabilat, P. Bertrand, Y. Legrand, F. Smadja-Joffe, C. Soria, B. Delpech, H. Lu** (1996). Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int. J. Cancer* 66: 664-668.
- Trowbridge, I.S., M.L. Thomas** (1994). CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 85-116.
- Tsukita, Sa., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kwai, Sh. Tsukita** (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126: 391-401.
- Tsygankov, A.Y., S. Mahajan, J.E. Fincke, J.B. Bolen** (1996). Specific association of tyrosine-phosphorylated c-Cbl with Fyn tyrosine kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* 271: 27130-27137.
- Turner, J.M., M.H. Brodsky, B.A. Irving, S.D. Levin, R.M. Perlmutter, D.R. Littman** (1990). Interaction of the unique N-terminal region of the tyrosine kinase p56^{lck} with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60: 755-765.
- Uff, C.R., S.J. Neame, C.M. Isacke** (1995). Hyaluronan binding by CD44 is regulated by a phosphorylation-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 25: 1883-1887.
- Underhill, C.B., G. Chi-Rosso, B.P. Toole** (1983). Effects of detergent solubilization on the hyaluronate-binding protein from membranes of simian virus 40 transformed 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 258: 8086-8091.
- Underhill, C.** (1992). CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell Science* 103: 293-299.
- Van Oers, N.S., W. Tao, J.D. Watts, P. Johnson, R. Aebersold, H.S. Teh** (1993). Constitutive tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor (TCR) ζ subunit: regulation of TCR-associated protein tyrosine kinase activity by TCR ζ . *Mol. Cell. Biol.* 13: 5771-5778.
- Van Oers, N.S., N. Killeen, A. Weiss** (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine phosphorylated TCR ζ in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* 1: 675.
- Van Oers, N.S., N. Killeen, A. Weiss** (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1053-1062.
- Van Seventer, G.A., M.M. Mullen, J.M. van Seventer** (1998). Pyk2 is differentially regulated by β_1 integrin- and CD28-mediated co-stimulation in human CD4⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 28: 3867-3877.
- Van Wauwe, J.P., J.R. de Mey, J.G. Goossens** (1980). OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol.* 124: 2708-2713.
- Vermot-Desroches, C., J. Wijdens, L. Valmu, C. Roy, R. Pigott, P. Nortamo, C.G. Gahmberg** (1995). A CD44 monoclonal antibody differentially regulates CD11a/CD18 binding to intercellular adhesion molecules CD54, CD102 and CD50. *Eur. J. Immunol.* 25: 2460-2464.
- Von Bonin, A., C. Steeg, H.W. Mittrucker, B. Fleischer** (1997). The T-cell receptor associated zeta-chain is required but not sufficient for CD26 (dipeptidylpeptidase IV) mediated signaling. *Immunol. Lett.* 55: 179-182.
- Von Bonin, A., J. Huhn, B. Fleischer** (1998). Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-Cell activation pathway. *Immunol. Rev.* 161: 43-53.

- Von Willebrand, M., G. Baier, C. Couture, P. Burn, T. Mustelin** (1994). Activation of phosphatidylinositol-3-kinase in Jurkat T cells depends on the presence of the p56^{lck} tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* 24: 234-238.
- Von Willebrand, M., T. Jascur, N. Bonnefoy-Bérard, H. Yano, A. Altman, Y. Matsuda, T. Mustelin** (1996). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2. *Eur. J. Biochem.* 235: 828-835.
- Wakizaka, K., Y. Masuda, T. Saito** (1998). A novel 90-kDa tyrosine-phosphorylated protein associated with TCR complex in thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 28: 636-645.
- Walk, S.F., M.E. March, K.S. Ravichandran** (1998). Roles of Lck, Syk and ZAP-70 tyrosine kinases in TCR-mediated phosphorylation of the adapter protein Shc. *Eur. J. Immunol.* 28: 2265-2275.
- Wange, R.L., S.N. Malek, S. Desiderio, L.E. Samelson** (1993). Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 268: 19797.
- Wange, R.L., L.E. Samelson** (1996). Complex Complexes: Signaling at the TCR. *Immunity* 5: 197-205.
- Ward, S.G., C.H. June, D. Olive** (1996). PI 3-Kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol. Today* 17: 187-197.
- Ward, Y., S. Gupta, P. Jensen, M. Wartmann, R.J. Davis, K. Kelly** (1994). Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature* 367: 651-654.
- Wardenburg, J.B., C. Fu, J.K. Jackman, H. Flotow, S.E. Wilkinson, D.H. Wilkins, R. Johnson, G. Kong, A.C. Chan, P.R. Findell** (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* 271: 19641-19644.
- Watts, J.D., J.S. Sanghera, S.L. Pelech, R. Aebersold** (1993). Phosphorylation of Serine 59 of p56^{lck} in Activated T Cells. *J. Biol. Chem.* 268: 23275-23282.
- Wayner, E.A., W.G. Carter** (1987). Identification of multiple cell adhesion receptor for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique a and b subunits. *J. Cell. Biol.* 105: 1873-1884.
- Webb, D.S.A., Y. Shimizu, G.A. van severter, S. Shaw, T.L. Gerrard** (1990). LFA-3, CD44, and CD45: Physiologic Triggers of Human Monocyte TNF and IL-1 Release. *Science* 249: 1295-1297.
- Weber, G.F., S. Ashkar, M.J. Glimcher, H. Cantor** (1996). Receptor-Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science* 271: 509-512.
- Weiss, A., J. Imboden, K. Hardy, B. Manger, C. Terhorst, J. Stobo** (1986). The role of the T3/antigen receptor complex in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 593-598.
- Weiss, A., G. Koretzky, R.C. Schatzman, T. Kadlecsek** (1991). Functional activation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5484-5488.
- Weiss, J.M., J. Sleeman, A.C. Renkl, H. Dittmar, C.C. Termeer, S. Taxis, N. Howells, M. Hofman, G. Kohler, E. Schopf, H. Ponta, P. Herrlich, J.C. Simon** (1997). An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J. Cell Biol.* 137: 1137-1147.
- Weiss, J.M., A.C. Renkl, T. Ahrens, J. Moll, B.H. Mai, R.W. Denfeld, E. schopf, H. Ponta, P. Herrlich, J.C. Simon** (1998). Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronate-activity by human monocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111: 227-232.
- West, D., I. Hampson, F. Arnold, S. Kumar** (1985). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228: 1324-1326.
- West, D., S. Kumar** (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp. Cell Res.* 183: 179-196.
- Wielenga, V.J., K.H. Heider, G.J. Offerhaus, G.R. Adolf, F.M. van den Berg, H. Ponta, P. Herrlich, S.T. Pals** (1993). Expression of CD44 variant in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 53: 4754-4756.
- Wild, M.K., A.M. Verhagen, S.C. Meuer, B. Schraven** (1997). The receptor function of CD2 in human CD2 transgenic mice is based on highly conserved associations with signal transduction molecules. *Cell. Immunol.* 180 (2): 168-175.
- Wolffe, E.J., W.C. Gause, C.M. Pelfrey, S.M. Holland, A.D. Steinberg, J.T. August** (1990). The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and homology to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core/link proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 341-347.
- Wu, J., S. Katzav, A. Weiss** (1995). A functional T cell receptor signaling pathway is required for p95^{vav} activity. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4337-4346.
- Wu, J., D.G. Motto, G.A. Koretzky, A. Weiss** (1996). Vav and SLP-76 Interact and Functionally Cooperate in IL-2 Gene Activation. *Immunity* 4: 593-602.
- Yamada, K.M., S. Miyamoto** (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 681-689.
- Yang, B., B.L. Yang, R.C. Savani, E.A. Turley** (1994). Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.*: 286-296.
- Yang, S.H., P.R. Yates, A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, A.D. Sharrocks** (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol. Cell. Biol.* 18: 710-720.

- Yashiro, Y., X.G. Tai, K. Toyo-Oka, C.S. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Kobayashi, S. Neben, H. Fujiwara** (1998). A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 28: 926-935.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, S. Tsukita, S. Tsukita** (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43 and ICAM-2. *J. Cell. Biol.* 140: 885-895.
- Yoon, S.T., U. Dinzani, K. Bottomly, C.A. Janeway Jr.** (1994). Both high and low avidity antibodies to the T cell receptor can have agonist or antagonist activity. *Immunity* 1: 563-569.
- Yu, C.R., J.X. Lin, D.W. Fink, S. Akira, E.T. Bloom, A. Yamauchi** (1996). Differential utilization of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN- α . *J. Immunol.* 157: 126-137.
- Yu, Q., B.P. Toole, I. Stamenkovic** (1997). Induction of Apoptosis of Metastatic Mammary Carcinoma Cells In Vivo by Disruption of Tumor Cell Surface CD44 Function. *J. Exp. Med.* 186: 1985-1996.
- Zahalka, M.A., E. Okon, U. Gossler, B. Holzmann, D. Naor** (1995). Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44- and hyaluronate-dependent. *J. Immunol.* 154: 5345-5355.
- Zhang, L., C.B. Underhill, L. Chen** (1995). Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res.* 55: 428-433.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R.P. Tribble, L.E. Samelson** (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92: 83-92.
- Zheng, Z., S. Katoh, Q. He, K. Oritani, K. Miyake, J. Lesley, R. Hyman, A. Hamik, R.M. Parkhouse, A.G. Farr, P.W. Kincade** (1995). Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on Hyaluronan recognition. *J. Cell Biol.* 130: 485-495.
- Zhou, D.F., J.F. Ding, L.J. Picker, R.F. Bargatze, E.C. Butcher, D.V. Goeddel** (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.
- Zöller, M., A. Schmidt, A. Denzel, J. Moll** (1997). Constitutive expression of a CD44 variant isoform on T cells facilitates regaining of immunocompetence in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 90: 873-885.
- Zubiaur, M., M. Izquierdo, C. Terhorst, F. Malavasi, J. Sancho** (1997). CD38 Ligation Results in Activation of the Raf-1/Mitogen-Activated Protein Kinase and the CD3- ζ / ζ -Associated Protein-70 Signaling Pathways in Jurkat T Lymphocytes. *J. Immunol.* 159: 193-205.

8 Abkürzungen

A	Ampere	FKS	foetales Kälberserum
Abb.	Abbildung	FSC	engl. <i>forward scatter</i>
A_λ	Absorption von Licht der Wellenlänge λ	FYB	Fyn bindende Protein
Ag	Antigen	g	Einheit der Gravitation
Ak	Antikörper	g	Gramm
Anti-	Antikörper/-serum gegen	Greb2	engl. <i>growth factor receptor binding protein-2</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1	h	Stunde
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i>)	HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	HEV	engl. <i>high endothelial venule</i>
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>	HRP	Meerrettich Peroxidase
ATP	Adenosin-5'-Trisphosphat	ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
bp	Basenpaar	Ig	Immunglobulin
Bq	Bequerel	IL	Interleukin (z.B. IL-2)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)	IP ₃	Inositol(1, 4, 5)-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise	ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
c	Zenti- (10^{-2})	JNK	engl. <i>Jun-N-terminale Kinase</i>
°C	Grad Celsius	k	Kilo (10^3)
CD	Differenzierungscluster engl. <i>cluster of differentiation</i>	kb	Kilobasen (paare)
CD44s	CD44-Standardform	kDa	Kilodalton
CD44v	variante CD44-Isoform	KS	Kälberserum
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. <i>counts per minute</i>)	L	Liter
CREB	engl. <i>cyclic AMP response element binding protein</i>	lat.	lateinisch
2D	zweidimensional	Lat	engl. <i>linker for activation of T-cells</i>
d	Dezi (10^{-1})	LFA	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen</i>
d	Tag (engl. <i>day</i>)	log	Logarithmus (Basis 10)
Da	Dalton	M	Mega- (10^6)
DAG	Diacglyzerin	M	Molar
D-MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	m	Meter
DMSO	Dimethylsulfoxid	m	Milli- (10^{-3})
DNA	Desoxyribonukleinsäure	μ	Mikro- (10^{-6})
DTT	Dithiothreitol	MAPK	engl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
E	Einheit	MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i>)	MEK	MAPK/Erk-Kinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	MEKK	MEK-Kinase
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
engl.	englisch	min	Minute
Erk	engl. <i>extracellular signal regulated kinase</i>	mRNS	Boten-RNS (engl. <i>messenger RNA</i>)
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)	MW	Molekulargewicht
FACS	Fluoreszenz-aktivierter-Zellsortierer engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>	N	normal
FAK	Fokale Adhäsionskinase	n	Nano- (10^{-9})
f.c.	Endkonzentration (engl. <i>final concentration</i>)	NFAT	engl. <i>nuclear factor of activation in T cells</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	NF- κ B	Nuklearer Faktor-kappa B
		NP-40	Nonidet P40
		N-Terminus	Amino-terminus
		p	Piko (10^{-12})
		PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PBL	Periphere Blutlymphozyten
		PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
		PE	Phytoerythrin
		PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
Pyk2	engl. <i>proline rich kinase 2</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Src-homologe
Shc	engl. <i>Src-Collagen-Homolog</i>
SLP-76	engl. <i>SH2 domain-containing leukocyte protein</i>
Sos	engl. <i>son of sevenless</i>
SSC	engl. <i>sideward scatter</i>
T	Tera (10^{12})
TBS/T	engl. <i>Tris buffered saline/Tween</i>
TCR	T-Zell Rezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v	variant
VCP	engl. <i>vasolin containing protein</i>
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
(w/v)	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
ZAP-70	ζ -assoziiertes Protein von 70 kDa
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode angegeben:

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Lysin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin