

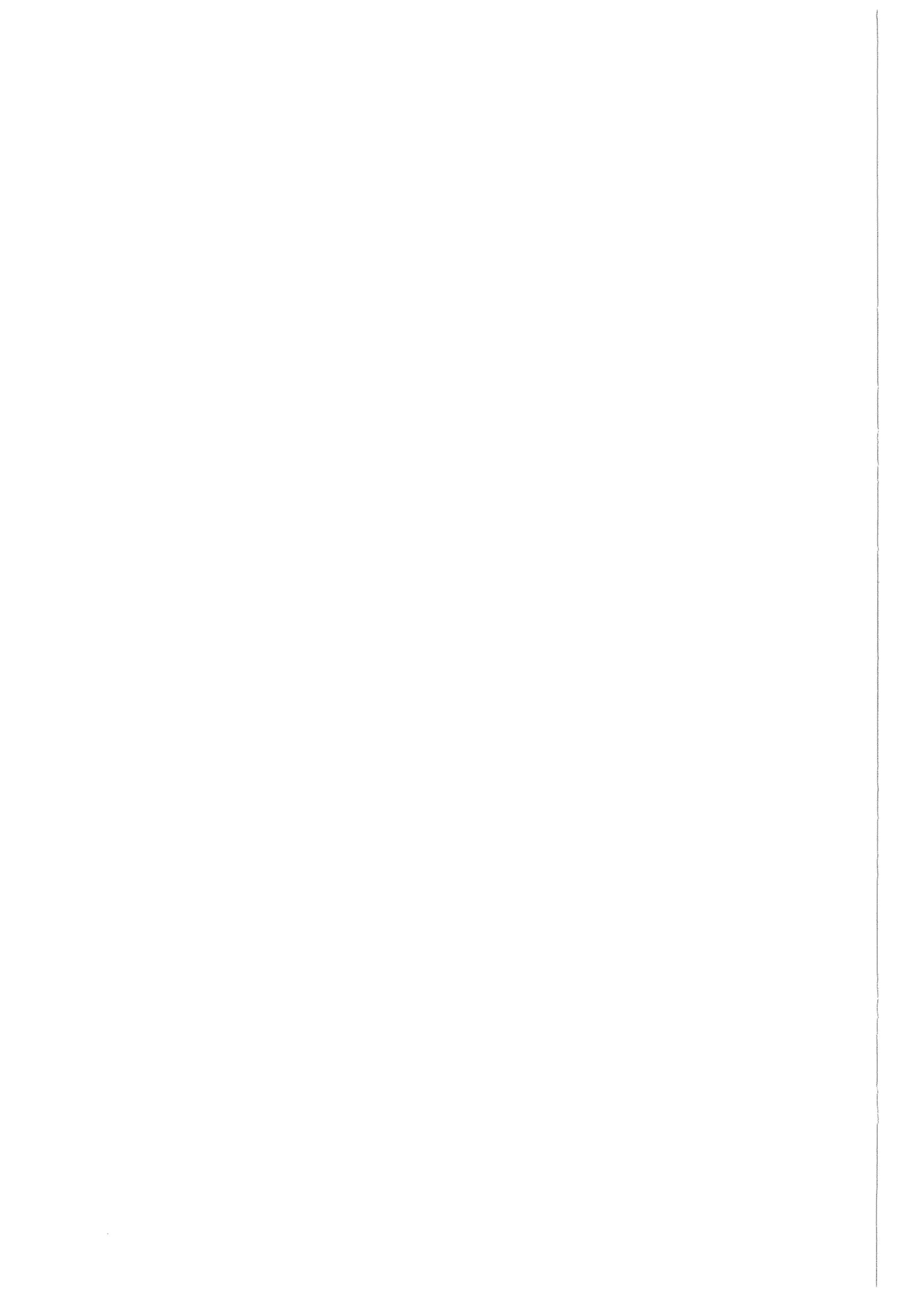
Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6335

Hyaluronsäurerezeptor- kontrollierte Proliferation von malignen Melanomen

Th. Ahrens
Institut für Genetik

September 1999



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6335

**Hyaluronsäurerezeptor-kontrollierte Proliferation von
malignen Melanomen**

Thomas Ahrens

Institut für Genetik

**Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1999**

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Wechselwirkung der extrazellulären Matrixkomponente Hyaluronsäure (HA) mit CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in Zellen unterschiedlicher Stadien der Entwicklung von Melanozyten zu malignen Melanomzellen (MM). Die Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP wurde sowohl in Tumorproben von MM-Patienten als auch in Zelllinien analysiert, die aus humanen MM-Metastasen etabliert worden waren. In immunhistochemischen Färbungen von Gewebeproben von MM-Patienten wie auch in Northern Blot-Analysen von RNA aus MM-Zelllinien wurde eine Überexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms beobachtet. Im Gegensatz zu CD44 und ICAM-1 konnte der Hyaluronsäurerezeptor RHAMM/IHABP in diesen Studien nur cytoplasmatisch detektiert werden. In Hyaluronsäure-Bindungsversuchen konnte gezeigt werden, daß vor allem CD44 für die Bindung von MM-Zellen an Hyaluronsäure verantwortlich ist. In Experimenten, die den Einfluß dieser CD44-HA-Interaktion auf die Proliferation von MM-Zellen untersuchten, wurde eine durch Hyaluronsäure vermittelte Steigerung der Proliferationskapazität von MM-Zellen festgestellt. Diese durch Hyaluronsäure vermittelte Proliferationssteigerung war vollständig durch einen monoklonalen Antikörper gegen CD44 blockierbar, der spezifisch eine Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von CD44 erkennt. Die Kultivierung von MM-Zellen auf Hyaluronsäure war mit einer erhöhten Sekretion der Wachstumsfaktoren basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und transformierender Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1) verbunden.

Lösliche Formen von CD44 führen in verschiedenen Tumormodellen zu anti-proliferativen Eigenschaften von Tumorzellen. Durch Proteolyse von membranständigem CD44 gebildetes lösliches CD44 wurde auch in Zellkulturüberständen von MM-Zelllinien gefunden. Aufgereinigtes, proteolytisch abgespaltenes CD44 einer dieser Zelllinien (MV3) zeigte in HA-Bindungsversuchen keine Bindung an Hyaluronsäure. Um die Auswirkungen der Expression von sezerniertem löslichem CD44 in einem definierten Zellsystem untersuchen zu können, wurde eine MM-Zelllinie (1F6) mit cDNA-Expressionskonstrukten stabil transfiziert, die für lösliche Formen von CD44 kodieren. Die Auswirkungen dieses künstlich exprimierten löslichen CD44 auf die Hyaluronsäurebindung, die Proliferation und das Tumorwachstum von MM-Zellen wurden danach *in vitro* sowie *in vivo* untersucht. Die CD44-abhängige Adhäsion von Melanomzellen an Hyaluronsäure konnte durch das künstlich exprimierte lösliche CD44 der Transfektanten im Gegensatz zum proteolytisch abgespaltenen löslichen CD44 der Zelllinie MV3 vollständig blockiert werden. Sezerniertes lösliches CD44 konnte zudem die durch Hyaluronsäure vermittelte Steigerung der Proliferation von MM-Zellen signifikant inhibieren. Zelllinien, die die lösliche Standardform von CD44 (solCD44s) exprimierten, bildeten nach subkutaner Injektion der Zellen in Nacktmäuse keine Tumoren. Im Vergleich dazu bildeten Kontrolltransfektanten, die Wildtyp-Zelllinie 1F6 und auch die MM-Zelllinie MV3 schnell wachsende Primärtumore. Kompetitionsmechanismen von membranständigem CD44 mit HA-bindendem löslichem CD44 um Hyaluronsäurebindungsstellen sind somit von erheblicher Bedeutung für die Proliferation und das Tumorwachstum von Melanomzellen.

Hyaluronate receptor mediated proliferation in malignant melanoma

Abstract

The main topic of this thesis was the analysis of interactions of the extracellular matrix component hyaluronic acid (HA) and CD44 as well as its proposed cellular receptors ICAM-1 and RHAMM/IHABP at different stages of melanoma progression. CD44, ICAM-1 and RHAMM/IHABP expression was investigated in tumor sections of malignant melanoma (MM) patients and a panel of human melanoma cell lines. In tumor sections and melanoma cell lines the expression of CD44, ICAM-1 and RHAMM/IHABP was upregulated in the lineage from non transformed melanocytes to primary melanoma cells and metastatic melanoma cells. In contrast to the cell surface molecules CD44 and ICAM-1, RHAMM/IHABP was found exclusively within the cytoplasm of melanoma cells. HA binding and adhesion assays revealed that CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate on MM cells. One physiological consequence of these CD44-HA interactions is a significant HA induced increase of melanoma cell proliferation. The HA mediated increase of proliferation was blocked completely by an anti-CD44 monoclonal antibody which interferes with the HA binding function of CD44. Cultivating MM cells on hyaluronate coated surfaces was in parallel joined by an enhanced release of the growth factors bFGF (basic fibroblast growth factor) and TGF- β 1 (transforming growth factor β 1).

Soluble forms of CD44 have been shown to exert anti-proliferative effects on tumor cells. Proteolytic cleavage of membrane bound CD44 was also observed in several melanoma cell lines *in vitro*. Soluble, shedded CD44 of one of these cell lines (MV3) was purified but no hyaluronate binding capacity of this protein was detected in HA binding assays. To test the function of soluble CD44 in a defined cell system, the melanoma cell line 1F6, where no proteolytic cleavage of CD44 has been found, was stably transfected with CD44 cDNA constructs coding for a soluble, released form of CD44. Functional consequences of this constitutively released soluble CD44 on HA binding, proliferation and tumor growth of MM cells were investigated *in vitro* and *in vivo*. In contrast to the shedded form of CD44 isolated from culture supernatants of the cell line MV3 the released soluble CD44 of the transfectants was able to inhibit CD44 mediated adhesion of MM cells to HA coated surfaces. In addition, secreted soluble CD44 significantly blocked the HA induced increase of MM cell proliferation. *In vivo*, no local tumor growth was observed after subcutaneous injection of soluble CD44 secreting cells into nude mice whereas empty vector control transfected cells, the non transfected parental cell line 1F6 and the CD44 shedding cell line MV3 developed fast growing primary tumors at the sites of injection.

Cell membrane bound CD44 and HA binding, soluble forms of CD44 are competitors for binding of exogenous hyaluronic acid. The inhibition of cell surface CD44-HA interactions by soluble forms of CD44 has important consequences on cell proliferation and tumor growth of MM cells *in vitro* and *in vivo*.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom	1
1.1.1 Bedeutung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen während der Progression des Melanoms.....	2
1.1.2 Immunogenität des malignen Melanoms	3
1.2 Zelladhäsion und die Funktion von Adhäsionsrezeptoren während der Progression des malignen Melanoms	3
1.2.1 Funktion und Struktur von Adhäsionsrezeptoren	3
1.2.2 Integrine.....	4
1.2.3 ICAM-1 (CD54).....	4
1.3 CD44	5
1.3.1 Aufbau des CD44-Gens und Proteinstruktur	5
1.3.2 Hyaluronsäure (HA)	7
1.3.3 CD44 und Hyaluronsäurebindung.....	8
1.3.4 Weitere Liganden von CD44	9
1.3.5 Funktion von CD44 in Zellen des Immunsystems	10
1.3.6 Einfluß von CD44 bei Tumorprogression und Metastasierung	10
1.3.7 Weitere postulierte Zelloberflächenrezeptoren für Hyaluronsäure.....	11
1.4 Proteolyse von CD44	13
1.4.1 Generelle Aspekte der Proteolyse von Membranproteinen.....	13
1.4.2 Proteolyse von CD44.....	13
1.4.3 Funktionelle Aspekte der Proteolyse von CD44.....	14
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Bezugsquellen.....	16
2.1.2 Lösungen	17
2.1.3 Zellkulturmedien	18
2.1.4 Bakterienkulturmedien	19
2.1.5 Radiochemikalien.....	19
2.1.6 Kits.....	19
2.1.7 Enzyme	20

2.1.8 Mausstämme.....	20
2.1.9 Eukaryontische Zellen.....	20
2.1.10 Prokaryontische Zellen.....	21
2.1.11 Plasmide.....	22
2.1.12 Oligonukleotide.....	22
2.1.13 Fusionsproteine.....	23
2.1.14 Monoklonale Antikörper und Färbereagenzien.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Arbeiten mit RNA und DNA.....	25
2.2.2 RNA-Präparation.....	25
2.2.3 DNA-Präparation.....	27
2.2.4 Proteinchemische Methoden.....	31
2.2.5 Arbeiten mit Bakterienkulturen.....	34
2.2.6 Zellkultur.....	35
2.2.7 Funktionelle Testsysteme.....	37
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in unterschiedlichen Stadien des malignen Melanoms.....	40
3.1.1 Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP <i>in vivo</i>	40
3.1.2 Transkriptionsrate von CD44s, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in humanen MM-Zelllinien und primären Melanozyten.....	42
3.1.3 Expression der varianten CD44-Isoform CD44v8-v10 in MM-Zelllinien.....	42
3.1.4 Nachweis der Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in MM-Zellen und Melanozyten.....	47
3.1.5 RHAMM/IHABP ist ein cytoplasmatisches Protein.....	48
3.2 Funktionelle Aspekte der Oberflächenexpression von HA-Rezeptoren beim malignen Melanom.....	50
3.2.1 Hyaluronsäuresynthese von MM-Zellen.....	50
3.2.2 CD44 vermittelt die Bindung von löslicher Hyaluronsäure an MM-Zellen.....	51
3.2.3 Die MM-Zelladhäsion an immobilisierte Hyaluronsäure ist abhängig von CD44.....	52
3.2.4 Hyaluronsäure erhöht die Proliferation von MM-Zellen.....	55
3.2.5 Kultivierung von Melanomzellen auf Hyaluronsäure erhöht die Sekretion der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β 1.....	56
3.3 Lösliches CD44s (solCD44s).....	58
3.3.1 Proteolyse von membranständigem CD44 in Melanomzellen.....	58
3.3.2 Aufreinigung von löslichem CD44s aus Zellkulturüberständen.....	60
3.3.3 HA-Bindungsexperimente mit aufgereinigtem löslichem CD44.....	61
3.3.4 Einfluß von löslichem CD44 auf MLR-Reaktionen.....	63

3.4 Analyse von konstitutiv lösliches CD44s sezernierenden Transfektanten der 1F6 MM-Zelllinie	64
3.4.1 Klonierung und Mutagenese von löslichen CD44s-cDNAs.....	65
3.4.2 Analyse der solCD44s-Proteinexpression in stabilen Transfektanten von 1F6	66
3.4.3 Bindung von solCD44s sezernierenden Transfektanten an immobilisierte Hyaluronsäure	70
3.4.4 Anreicherung von solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A aus konditionierten Kulturüberständen	71
3.4.5 Die HA-Bindung von MM-Zellen ist durch sezerniertes solCD44s, nicht aber durch solCD44sR41A, solCD44sR150A oder proteolytisch abgespaltenes solCD44 inhibierbar	72
3.4.6 Konkurrenz von sezerniertem CD44s mit membranständigem CD44 inhibiert die HA-induzierte Steigerung der Proliferation von MM-Zellen <i>in vitro</i>	73
3.4.7 Konkurrenz von sezerniertem solCD44s mit membranständigem CD44 inhibiert das Tumorwachstum von MM-Zellen <i>in vivo</i>	75
4 Diskussion	77
4.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in verschiedenen Stadien des malignen Melanoms	77
4.1.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	77
4.1.2 Cytoplasmatische Lokalisierung von RHAMM/IHABP	78
4.1.3 Die Bindung von Hyaluronsäure durch Melanomzellen ist CD44-abhängig.....	79
4.1.4 Hyaluronsäure induziert eine Proliferationssteigerung von MM-Zellen	80
4.1.5 Bedeutung autokriner Wachstumsfaktoren und Zytokine für die Proliferation von Melanomzellen.....	81
4.2 Analyse von löslichem CD44s (solCD44s)	83
4.2.1 Der prognostische Wert von löslichem CD44 in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms	83
4.2.2 Funktionelle Analyse von proteolytisch abgespaltenem löslichem CD44.....	83
4.2.3 CD44 als kostimulatorisches Molekül.....	85
4.2.4 Analyse von 1F6 Transfektanten, die konstitutiv lösliches CD44 sezernieren.....	85
4.2.5 Konkurrenz von löslichem CD44 mit membranständigem CD44 inhibiert das Tumorwachstum von MM-Zellen <i>in vivo</i>	87
5 Abkürzungen	89
6 Literatur	91

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine der häufigsten und am stärksten invasiven Krebsformen beim Menschen. Die Häufigkeit des malignen Melanoms ist in den letzten zehn Jahren stark angestiegen. Die meisten Todesfälle sind dabei durch den Umstand zu beklagen, daß nach der Bildung von Metastasen konventionelle Therapieformen oft unwirksam sind. Die Heilungschancen durch Operation des malignen Melanoms sind bei Primärmelanomen, die eine Dicke von weniger als 0,76 mm haben, sehr hoch. Bei größeren Primärtumoren sind die Prognosen erheblich schlechter und häufig metastasieren Melanomzellen bei solchen Patienten (Kerbel *et al.*, 1996).

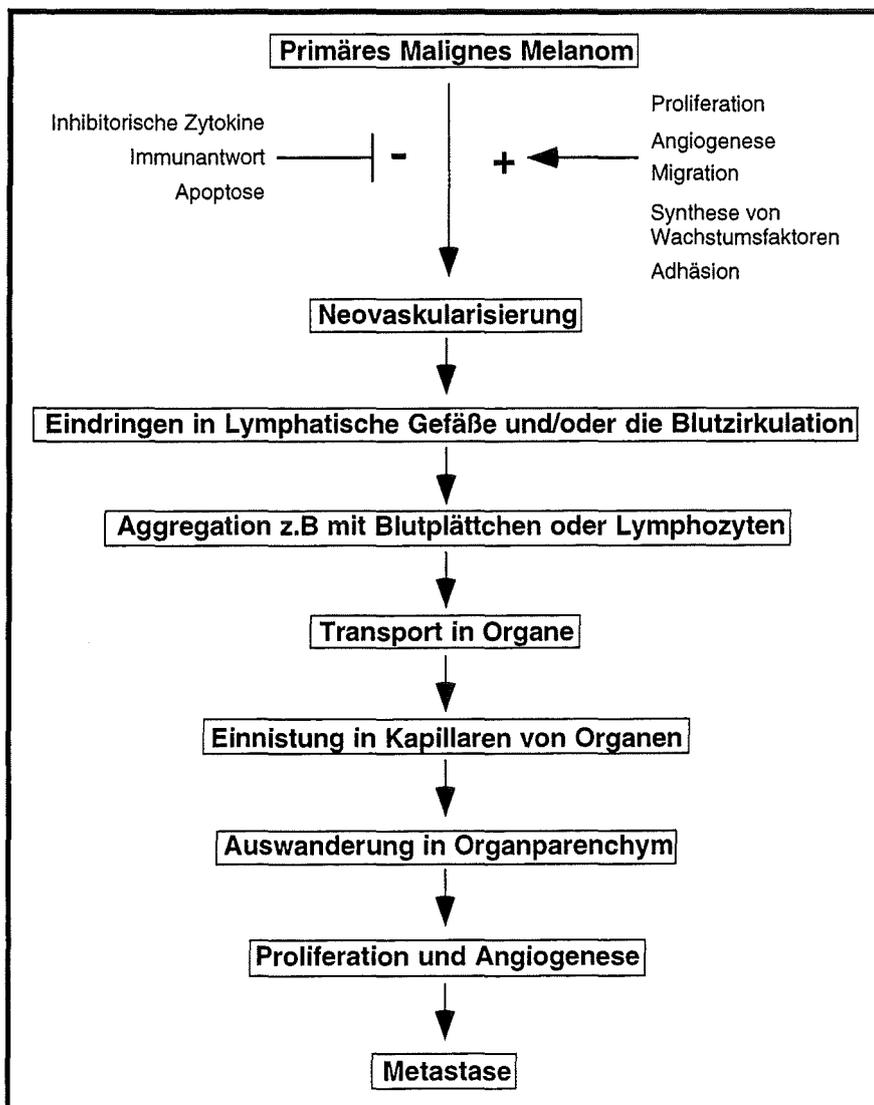


Abb. 1. Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses beim malignen Melanom (nach Fidler, 1996).

Eine der entscheidenden Fragen in der Entwicklung des Melanoms zu einem bösartigen Tumor ist daher, welche Ereignisse im Primärmelanom auftreten, daß ab einer klar definierten Größe des Melanoms die Heilungschancen so dramatisch sinken. Die Untersuchung der Progression des malignen Melanoms konzentriert sich dabei im wesentlichen auf Fragen der Proliferation, der Angiogenese, der Immunogenität und der Migration von Tumorzellen sowie auf Studien von Zell-Zell- und Zell-ECM (extrazelluläre Matrix)-Interaktionen (Übersicht in: Rüniger *et al.*, 1994; Edward, 1995; Abb. 1). Für die Proliferationskontrolle von Melanomzellen spielen besonders autokrin wirkende Wachstumsfaktoren, reduzierte Apoptose von Tumorzellen, eine erhöhte Resistenz gegenüber parakrin wirkenden, inhibitorischen Faktoren und die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren, eine große Rolle (Kerbel *et al.*, 1996; Abb. 1). Der Prozeß der Metastasierung von Melanomzellen ist mit einer Folge von Ereignissen verbunden, die schließlich zu einem Übergreifen der Erkrankung auf andere Gewebe und Organe des Körpers führt (Herlyn, 1990; Fidler, 1996; Abb. 1). Durch Gefäßneubildung sind Melanomzellen mit metastatischem Potential dabei zunächst in der Lage, in lymphatische Gefäße oder in die Blutzirkulation einzutreten. Durch Aggregation mit Blutplättchen oder Lymphozyten werden die Melanomzellen in andere Organe transportiert, wo sie nach der Einnistung in die Kapillaren später in das Organparenchym auswandern. Durch die nachfolgende Proliferation der Melanomzellen und Angiogenese wird der Prozeß der Metastasierung abgeschlossen (Fidler, 1996 und Abb. 1).

1.1.1 Bedeutung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen während der Progression des Melanoms

Aus Melanommetastasen isolierte, in Kultur gehaltene Melanomzelllinien exprimieren und sezernieren im Vergleich zu primären Melanozyten der Haut und primären Melanomzellen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, die sowohl autokrine wie auch parakrine Effekte auf die Proliferation ausüben können (Shih und Herlyn, 1993; Kerbel *et al.*, 1996). Die Eigensynthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen spiegelt die Wandlung von nicht transformierten Melanozyten und Nävuszellen über Primärmelanome bis hin zu metastasierenden Melanomzellen charakteristisch wieder (Herlyn und Malkowicz, 1991). Metastatische Melanomzellen exprimieren so z.B. kontinuierlich bFGF ("Basic Fibroblast Growth Factor"), TGF- α ("Transforming Growth Factor"), TGF- β , PDGF ("Platelet Derived Growth Factor"), IL-1 α (Interleukin-1 α), IL-6, IL-8, EGF ("Epidermal Growth Factor"), NGF ("Nerve Growth Factor") und Gro α (Shih und Herlyn, 1993; Mattei *et al.*, 1994). Die Fähigkeit zur Eigensynthese von Wachstumsfaktoren kann als ein Hauptcharakteristikum von metastasierenden Zellen gelten. Einige dieser Faktoren haben eine Funktion für die autokrine Stimulation der Proliferation (bFGF, PDGF, Gro α , EGF, TGF- α). Andere, von metastasierenden Melanomzellen synthetisierte Wachstumsfaktoren wie TGF- β , IL-1 α , IL-6 oder IL-8, haben parakrine Funktionen auf die Induktion von Angiogenese, die Aktivierung proteolytischer Enzyme oder die Immunantwort. Für metastasierende Melanomzellen wurde eine Resistenz gegenüber inhibitorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 α und TNF- α ("Tumor Necrosis Factor α "; Lu *et al.*, 1992), TGF- β (MacDougall und Kerbel, 1993) oder Oncostatin M (Lu *et al.*, 1993) beobachtet. Durch Kultivierung einer primären Melanomzelllinie auf einer ECM-Präparation (Matrigel) konnte sowohl die Proliferationskapazität dieser Zelllinie als auch die Resistenz gegenüber IL-6, IL-1 α , TNF- α

und TGF- β gesteigert werden. Die Zelllinie zeigte nach Kultivierung auf Matrigel auch ein aggressiveres Tumorwachstum in Nacktmäusen (Kobayashi *et al.*, 1994).

1.1.2 Immunogenität des malignen Melanoms

Melanome sind häufig durch eine hohe Konzentration immunreaktiver T-Lymphozyten gekennzeichnet. Es ist gelungen, von Melanompatienten autologe, für das Melanom spezifische zytotoxische T-Lymphozytenklone (CTLs) zu isolieren (Topalian *et al.*, 1989). Einige dieser Klone erkannten auch allogene Melanomzellen, wenn diese Melanomzellen denselben MHC-Klasse I Haplotyp besaßen (Darrow *et al.*, 1989). Einige für das Melanom spezifische Antigene konnten auch identifiziert werden (Übersicht in: Boon, 1992 und Boon *et al.*, 1995). Diese Antigene können Proteine repräsentieren, die auch von normalen Melanozyten der Haut exprimiert werden, wie z.B. Tyrosinase (Brichard *et al.*, 1993), MART-1/Melan-A (Couli *et al.*, 1994), gp100 (Kawakami *et al.*, 1994) und gp75 (Wang *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1995a). Es wurden zudem Antigene entdeckt, die spezifisch von den neoplastischen Zellen exprimiert werden. Dazu gehören die Melanomantigene MAGE (van der Bruggen *et al.*, 1991), BAGE (Boel *et al.*, 1995) und GAGE (van der Eynde *et al.*, 1995). Weitere tumorspezifische Antigene beim malignen Melanom sind schließlich genetisch mutierte Proteine wie z.B. die mutierte CDK4 (Wölfel *et al.*, 1995) oder β -Catenin (Robbins *et al.*, 1996).

1.2 Zelladhäsion und die Funktion von Adhäsionsrezeptoren während der Progression des malignen Melanoms

Viele Studien haben Veränderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche mit der Progression des Melanoms von einem Primärmelanom über das invasive Vordringen in die Dermis bis hin zum metastasierenden Tumor in Verbindung gebracht. Die modulierte Expression verschiedener Integrine und die verstärkte Expression von ICAM-1, MUC18 und CD44 sind dabei besonders untersucht worden (Übersicht in: Edward, 1995).

1.2.1 Funktion und Struktur von Adhäsionsrezeptoren

Die Adhäsion von Zellen an andere Zellen oder an die extrazelluläre Matrix (ECM) ist bei vielen biologischen Prozessen wie Differenzierung, Signalübertragung bei der Immunantwort, Erhalt des Gewebeverbandes und Tumormetastasierung von großer Bedeutung (Übersicht in: Wagner und Wyss, 1994). Zelladhäsion wird durch Interaktionen von Membranproteinen mit Liganden, Kohlenhydraten oder Proteinen der extrazellulären Matrix vermittelt. In den vergangenen Jahren konnte eine Vielzahl von Membranproteinen charakterisiert werden, die Funktionen als Adhäsionsmoleküle besitzen (Übersicht in: Wagner und Wyss, 1994). Durch die modulartige Zusammensetzung aus konservierten Struktureinheiten (Proteindomänen) können Adhäsionsrezeptoren in Superfamilien eingeteilt werden. Dazu gehören z.B. die EGF-Superfamilie und die Fibronectin Typ I- bis Typ III-Superfamilien. Die Immunglobulin-Superfamilie von Adhäsionsmolekülen ist die am besten untersuchte Familie von Adhäsionsrezeptoren. Mitglieder dieser Familie wie CD2, CD4, CD8, CD58, aber auch der T-Zellrezeptor und kostimulatorische Moleküle wie CD28, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2)

besitzen Immunglobulin-Domänen als charakteristische Struktureinheiten. Die Cadherine, die eine Funktion bei der Calcium-abhängigen Zelladhäsion von gleichartigen Zellen in Gewebeverbänden haben, bilden eine weitere Superfamilie. Die MHC-Superfamilie, die von den MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Proteinen gebildet wird, hat ihre Hauptfunktion in der Antigenpräsentation. Die Selektine umfassen eine Klasse von Zelloberflächen-Glykoproteinen, die vor allem eine Bedeutung bei Entzündungsprozessen haben. Andere Adhäsionsrezeptoren wie die Integrine, CD44 oder auch CD45 besitzen keine klare Domänenstruktur und werden daher meistens gesondert betrachtet (Übersicht in: Wagner und Wyss, 1994).

1.2.2 Integrine

Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Bislang konnten 20 verschiedene α - und acht verschiedene β -Untereinheiten identifiziert werden (Übersicht in: Edward, 1995). Integrine binden eine Vielzahl von Liganden, darunter auch andere Adhäsionsrezeptoren wie VCAM-1 oder Proteine der ECM wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Osteopontin. Die Bindung von Liganden durch Integrine ist nicht nur von der Expression sondern auch vom Aktivierungszustand der Integrine abhängig (Diamond und Springer, 1994). Integrine wie z.B. $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ erkennen Proteine der ECM mit dem aus drei Aminosäuren (Arginin-Glyzin-Asparaginsäure) bestehenden RGD-Bindungsmotiv. Nach Vorinkubation von MM-Zellen mit einem Peptid, das dieses Motiv enthielt, konnte die Metastasierung von MM-Zellen inhibiert werden (Humphries *et al.*, 1986). Die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen ist mit der Progression von Melanomzellen von einem nicht metastatischen in einen metastatischen Phänotyp beschrieben worden (Gehlsen *et al.*, 1992). Melanomzellen, die keine funktionellen $\alpha_v\beta_5$ -Integrine mehr exprimierten, waren nicht mehr zur Proliferation in Nacktmäusen in der Lage und gingen in Apoptose (Montgomery *et al.*, 1994). Die Rekonstitution von $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen und Interaktion mit dem Liganden Kollagen konnte diese Apoptose verhindern.

1.2.3 ICAM-1 (CD54)

Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie von Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule 1"; Johnson *et al.*, 1989), MUC18 (Lehmann *et al.*, 1989) und VCAM-1 (Jonjic *et al.*, 1992) werden im malignen Melanom exprimiert. ICAM-1 wurde ursprünglich als ein Ligand des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls LFA-1 ("Lymphocyte Function Associated Antigen 1") beschrieben (Makgoba *et al.*, 1988). ICAM-1 ist ein sialisiertes Glykoprotein, das durch Ligandenbindung die Zell-Zell-Adhäsion und Effektorzellfunktion in der Immunantwort unterstützt. Mehrere Publikationen haben eine Überexpression von ICAM-1 während der Progression des Melanoms beschrieben (Johnson *et al.*, 1989; Kageshita *et al.*, 1993). Ebenso wurden erhöhte Serumwerte von löslichem ICAM-1 bei Melanompatienten gefunden (Becker *et al.*, 1991; Altomonte *et al.*, 1992). Die Interaktion von ICAM-1 auf Tumorzellen mit LFA-1 auf NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten wurde in Zusammenhang mit der Immunogenität des malignen Melanoms untersucht. Dabei wurde gefunden, daß lösliches ICAM-1 in der Lage ist, die Melanomzelllyse durch Effektorzellen zu blockieren (Altomonte *et al.*, 1993). In einer anderen Studie inhibierte

lösliches ICAM-1 die Zytokinproduktion eines melanomspezifischen, tumorinfiltrierenden T-Lymphozytenklones (Becker *et al.*, 1993). Lösliche Formen von Adhäsionsmolekülen sind demnach in der Lage, die körpereigene Immunantwort auf transformierte, maligne Zellen so zu beeinflussen, daß die Tumorzellen einer Immunreaktion entgehen können.

1.3 CD44

Mit CD44 wird eine Familie von Proteinen bezeichnet, die aus einer ungewöhnlich großen Zahl von Isoformen besteht. Die konstante Standardform von CD44 (CD44s), die aus den für alle Isoformen gleichen konstanten Anteilen besteht, ist ein 85 kDa grosses Membranprotein (Stamenkovic *et al.*, 1989; Goldstein *et al.*, 1989). Die Insertion von bis zu neun varianten Exons (Abb. 2A: v2-v10) in den konstanten Anteil des Moleküls wird durch alternatives RNA-Spleißen katalysiert und führt zur Expression einer Vielzahl verschiedener Isoformen von CD44. Durch Insertion varianter Epitope und durch posttranslationale Veränderungen kann das Molekulargewicht von CD44-Isoformen 200 kDa erreichen (Screaton *et al.*, 1992; Abb. 2A).

1.3.1 Aufbau des CD44-Gens und Proteinstruktur

Die Standardform von CD44 (CD44s), in der keine alternativ gespleißten Exons exprimiert sind, beinhaltet beim Menschen die Expression der neun konstanten Exons des CD44-Gens (Abb. 2B: Exon 1-5 + Exons 15-17 + Exon19). Das Exon 1 kodiert für das Signalpeptid von CD44. Durch die Exons 2-5 wird die HA-Bindungsdomäne des Proteins exprimiert. Exon 17 kodiert für die Transmembrandomäne des Rezeptors, Exon 18 oder Exon 19 bilden alternativ die hochkonservierte, cytoplasmatische Domäne (Screaton *et al.*, 1992). Die HA-Bindungsdomänen von CD44 weisen eine hohe Homologie zu vergleichbaren Domänen von HA-bindenden Proteinen wie dem Link-Protein (Goetinck *et al.*, 1987), Versikan (Zimmermann und Ruoslahti, 1989), Aggrekan (Doege *et al.*, 1991) und TSG-6 (Lee *et al.*, 1992) auf (Goldstein *et al.*, 1989; Stamenkovic *et al.*, 1989). Ein HA-Bindungsmotiv, das in den HA-bindenden Proteinen RHAMM (Turley *et al.*, 1987), CD44 und Link-Protein gefunden worden ist, ist das so bezeichnete -B(X₇)B-Motiv (Yang *et al.*, 1994). Dabei stellen eine basische Aminosäure B wie Lysin oder Arginin die erste und die neunte Position einer Domäne, die von sieben nicht sauren Aminosäuren X unterbrochen wird. Durch Punktmutationen in der cDNA von CD44 konnten einige der für die HA-Bindung entscheidenden Aminosäuren von CD44 identifiziert werden. Ein Austausch der Aminosäure Arginin an Position 41 des menschlichen Proteins durch Alanin (R41A-Mutante) führte zu einem fast vollständigen Verlust der HA-Bindungsfähigkeit (Peach *et al.*, 1993). In einem weiteren Fall konnte der Verlust der HA-Bindungsfähigkeit einer Zelllinie mit einer Punktmutation im CD44-Gen erklärt werden, wodurch an Position 154 des Proteins die Aminosäure Histidin statt Arginin translatiert wurde (Liao *et al.*, 1995).

Das nicht modifizierte Kernprotein von CD44s hat ein absolutes Molekulargewicht von 37-38 kDa. Durch posttranslationale Modifikationen wie N- und O-Glykosylierungen wird es auf ein apparentes Molekulargewicht von 85-95 kDa vergrößert (Goldstein *et al.*, 1989; Camp *et al.*, 1991a; Lokeshwar und Bourguignon, 1991). Vier Serin-Glyzin-Motive des humanen CD44s-Proteins können als potentielle Bindungsstellen für das Glykosaminoglykan

Chondroitinsulfat benutzt werden (Jalkanen *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1991). Weitere Formen der Modifikation von CD44s sind Palmitoylierung (Guo *et al.*, 1994a) und Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne des Proteins (Camp *et al.*, 1991a; Puré *et al.*, 1995; Peck und Isacke, 1996).

Die Variabilität der CD44-Proteinfamilie kommt beim Menschen vor allem durch Expression neun alternativ gespleißter, varianter Exons zustande (Abb. 2A: Exons v2-v10 oder Exons 6-14). Die epitheliale Isoform von CD44, CD44v8-v10, besteht aus den Proteinanteilen der konstanten Exons des Moleküls zuzüglich der drei alternativ eingefügten Exons 12, 13 und 14 (Abb. 2C). Diese Isoform von CD44 mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa wird vor allem in Epithelzellen exprimiert (Stamenkovic *et al.*, 1991). Eine der längsten bisher beschriebenen Isoformen von CD44, CD44v3-v10, kommt in Keratinozyten der Haut vor und exprimiert neben den konstanten Exons auch die varianten Exons v3-v10 (Hofmann *et al.*, 1991). Eine besondere Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen besitzen ferner Isoformen von CD44, die das alternative gespleißte Exon v6 enthalten (Günthert *et al.*, 1991).

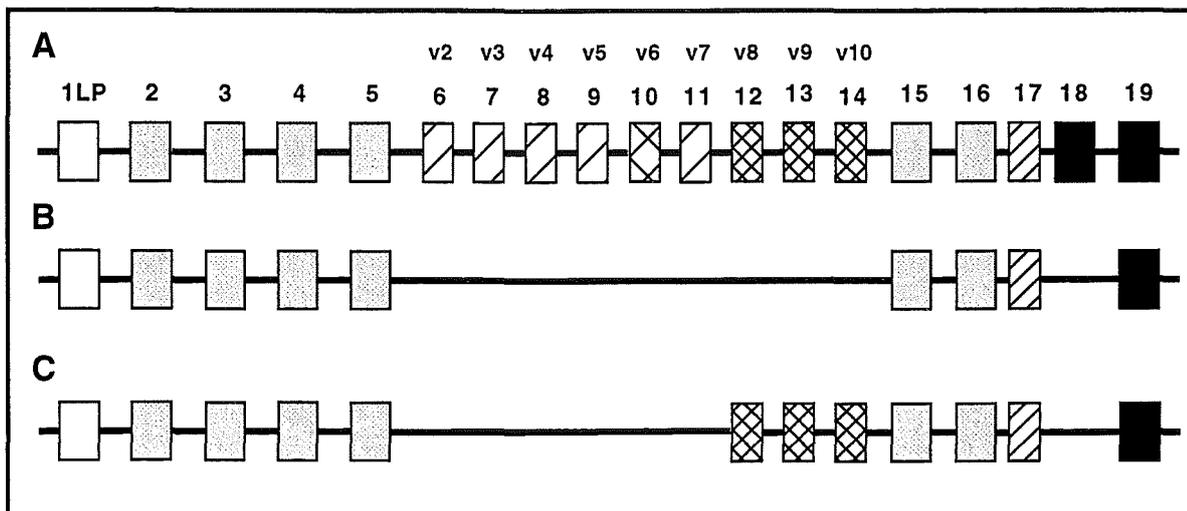


Abb. 2. Aufbau des humanen CD44-Gens nach Sreaton *et al.*, 1992. In A ist der genomische Aufbau des CD44-Gens mit allen exprimierbaren Exons gezeigt. Mit LP ist das Signalpeptid in Exon 1 bezeichnet. Die alternativ gespleißten, varianten Exons 6-14 werden auch als v2-v10 bezeichnet. Exon 17 kodiert für die Transmembrandomäne von CD44, Exon 18 und 19 kodieren für die cytoplasmatische Domäne des Proteins. In B ist die konstante Standardform (CD44s) von CD44 dargestellt, in der keine varianten Epitope exprimiert sind. In C ist die variante CD44-Isoform CD44v8-v10 abgebildet, die vorwiegend von Epithelzellen exprimiert wird und aus den konstanten sowie von den Exons 12, 13 und 14 kodierten Proteinanteilen besteht.

Zu den erwähnten posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten von CD44s kommen in den varianten Abschnitten enthaltene Strukturmodule hinzu, die die Größenheterogenität der Proteinfamilie erweitern können. Diese umfassen vier weitere potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine große Zahl möglicher O-Glykosylierungsstellen (Brown *et al.*, 1991; Jackson *et al.*, 1995). Zusätzlich wurden in varianten CD44-Isoformen, die das Exon v3 enthalten, Bindungsstellen für die Glykosaminoglykane Heparansulfat und Chondroitinsulfat entdeckt (Jackson *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1995a). Für CD44-Isoformen, die das Exon v5 exprimieren, wurde zudem eine Tyrosinsulfatierung beschrieben (Sleeman *et al.*, 1998).

Für CD44-Isoformen wurden eine Vielzahl von Funktionen beschrieben. Neben der Funktion als Hyaluronsäurerezeptor (Aruffo *et al.*, 1990) wurden der Einfluß auf Zellmigration (Thomas *et al.*, 1992), Funktionen bei Immunantworten (Camp *et al.*, 1991b; Arch *et al.*, 1992; Camp *et al.*, 1993; Lesley *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1997), Funktionen bei der Signaltransduktion (Taher *et al.*, 1996) und die Bindung und Präsentation von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Chemokinen (Tanaka *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1995a; Sherman *et al.*, 1998) beschrieben. Bei einer Reihe von Prozessen wie dem Lymphozyten-“Homing“ in lymphatische Gewebe (Jalkanen *et al.*, 1987), Hämatopoese (Miyake *et al.*, 1990a) oder Entzündungsreaktionen (Levesque und Haynes, 1996; de Grendele *et al.*, 1997a; de Grendele *et al.*, 1997b; Maiti *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1998) wurde ebenfalls eine Beteiligung von CD44 gezeigt. Die zentrale Bedeutung der CD44-Proteinfamilie erklärt sich jedoch vor allem aus der Beteiligung bei Prozessen der Tumprogression und der Metastasierung von Tumorzellen (Sy *et al.*, 1991; Sy *et al.*, 1992; Heider *et al.*, 1993; Joensuu *et al.*, 1993; Koopman *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993; Wielenga *et al.*, 1993; Bartolazzi *et al.*, 1994; Dall *et al.*, 1994; Penno *et al.*, 1994; Bartolazzi *et al.*, 1995). Bei vielen dieser Funktionen und Prozessen spielen die Wechselwirkungen von unterschiedlichen Formen und Aktivierungszuständen von CD44 mit dem Liganden Hyaluronsäure eine entscheidende Rolle.

1.3.2 Hyaluronsäure (HA)

Hyaluronsäure (HA), ein Glykosaminoglykan, ist ein ubiquitärer Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). Ihr Einfluß auf zelluläre Mechanismen wie Zell-Zell-Adhäsion, die räumliche Orientierung und Bewegung von Zellen sowie Wachstum und Differenzierung ist häufig untersucht worden. Ihre Bedeutung im Verlauf einer Reihe von biologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Wundheilung, Gewebeneubildung oder Morphogenese ist in den letzten Jahren mehr in den Blickpunkt der Forschung getreten (Übersicht in: Laurent und Fraser, 1992). Hyaluronsäure ist ein Polymer, das aus vielen Wiederholungen der Disaccharid-Untereinheit N-Acetyl-D-Glucosamin [1- β -4] D-Glucuronsäure [1- β -3] besteht. Das Molekulargewicht des Polymers liegt bei 10^6 - 10^7 Da. Hyaluronsäure wird von vielen Zelltypen wie Fibroblasten (Teder *et al.*, 1995), Chondrozyten und Mesothelzellen synthetisiert (Laurent und Fraser, 1992). In der ECM interagiert Hyaluronsäure über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Proteoglykanen, wobei die Interaktion über ein Link-Protein stabilisiert wird (Laurent und Fraser, 1992). Die höchsten Konzentrationen von Hyaluronsäure im Organismus findet man vor allem in den Bindegewebe der Hautdermis (200 $\mu\text{g/ml}$), in der Nabelschnur (4100 $\mu\text{g/ml}$), in der Lunge und in der glatten Muskulatur. Hohe Konzentrationen von Hyaluronsäure sind auch in der Lymphe (8,5-18 $\mu\text{g/ml}$) und in den Lymphknoten enthalten.

Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen haben verschiedene Studien eine Korrelation erhöhter Hyaluronsäuresynthese mit dem Verhalten von Tumorzellen festgestellt. So sind zum Beispiel invasive Tumorzellen von einer hyaluronsäurereichen ECM umgeben und exprimieren zellmembranständige HA-Rezeptoren (Knudson *et al.*, 1989). Die murine Melanomzelllinie B16-F1 ist von Hyaluronsäure umgeben, was ihr metastatisches Potential verstärkt (Zhang *et al.*, 1995). In stark metastasierenden humanen Melanomzelllinien ist zudem die endogene HA-Syntheserate gegenüber nicht metastasierenden Zelllinien erhöht (Van Muijen *et al.*, 1995; Goebeler *et al.*, 1996).

Hyaluronsäure kann die Proliferationsrate von Zellen erhöhen, was für unterschiedliche experimentelle Systeme gezeigt werden konnte (West und Kumar, 1989; Galandrini *et al.*, 1994; Hamann *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 1997; Rafi *et al.*, 1997; Greco *et al.*, 1998). Als Ursache für diese durch Hyaluronsäure induzierte Steigerung der Proliferation konnten Wechselwirkungen von CD44 mit Hyaluronsäure verantwortlich gemacht werden (Hamann *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 1997; Rafi *et al.*, 1997). In Entzündungsprozessen konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung von CD44 durch Interaktion mit Hyaluronsäure zu einer Ausschüttung von Zytokinen führte (Noble *et al.*, 1993). Durch Abbau von hochmolekularer Hyaluronsäure entstehen bei Entzündungsprozessen kleine HA-Hexamerfragmente, die in Makrophagen über CD44 die Chemokin- und Zytokinexpression anregen (McKee *et al.*, 1996).

1.3.3 CD44 und Hyaluronsäurebindung

Hyaluronsäure ist der bedeutendste bislang beschriebene Ligand von CD44 (Aruffo *et al.*, 1990). Experimentell kann dies durch verschiedene Methoden gezeigt werden, bei denen die Bindung von Zellen an lösliche, mit Fluoreszein markierte Hyaluronsäure, oder aber an immobilisierte Hyaluronsäure durch spezielle monoklonale Antikörper gegen CD44 inhibiert wird (Lesley *et al.*, 1990; Miyake *et al.*, 1990b; Thomas *et al.*, 1992). Eine weitere Möglichkeit, mit der die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure nachgewiesen werden kann, ist die Verwendung von rekombinant hergestellten, gereinigten CD44-Fusionsproteinen, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Hyaluronsäure besitzen (Aruffo *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1992; Peach *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1995b).

Die starke Bindungsfähigkeit der Standardform CD44s an Hyaluronsäure konnte so in vielen Untersuchungen gezeigt werden (Aruffo *et al.*, 1990; Lesley *et al.*, 1990; Miyake *et al.*, 1990b; Stamenkovic *et al.*, 1991; Sy *et al.*, 1991; Sy *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1992; Peach *et al.*, 1993). Dennoch binden CD44⁺-Zellen nicht immer an Hyaluronsäure (Übersicht in: Lesley *et al.*, 1993). Die Aktivierung von Zellen kann hier zunächst zu einer Aufregulation von CD44 (Lesley *et al.*, 1994) oder auch zu Phosphorylierungen der cytoplasmatischen Domäne von CD44 (Puré *et al.*, 1995) führen, die dann die Bindungsfähigkeit an Hyaluronsäure stark erhöhen.

Die Fähigkeit von varianten CD44-Isoformen, Hyaluronsäure zu binden, ist zunächst für die epitheliale Isoform von CD44, CD44v8-v10, untersucht worden. Dabei konnte CD44v8-v10 im Vergleich zu CD44s Hyaluronsäure nicht oder nur schwach binden (Stamenkovic *et al.*, 1991), was in der Folgezeit in anderen Publikationen bestätigt wurde (Sy *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1992; Peach *et al.*, 1993; Bartolazzi *et al.*, 1994; Bartolazzi *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1995b). Für die CD44-Isoformen CD44v3-v10 und CD44v3,v8-v10 konnte in einer weiteren Studie eine gegenüber CD44s nur sehr geringe HA-Bindung beobachtet werden (Jackson *et al.*, 1995). CD44v6-v10 sowie CD44v7-v10 exprimierende Transfektanten einer B-Lymphomzelllinie adhärirten nur gering an von Hyaluronsäure umgebene Lymphknotenzellen (Bartolazzi *et al.*, 1995). Eine HA-Bindung der CD44-Isoformen CD44v4-v7, CD44v6, CD44v7 und CD44v6-v7 konnte dagegen gezeigt werden (Sleeman *et al.*, 1997). Variante Epitope von CD44 sind somit durchaus in der Lage, einen negativen wie auch positiven Beitrag zur Hyaluronsäurebindung von CD44 zu leisten.

Der Einfluß posttranslationaler Modifikationen von CD44 auf die Bindung von Hyaluronsäure ist ebenfalls untersucht worden (Jackson *et al.*, 1995; Puré *et al.*, 1995; Bartolazzi *et al.*, 1996; Maiti *et al.*, 1998; Skelton *et al.*, 1998). Eine Blockierung von O-Glykosylierungen in der CD44-Isoform CD44v8-v10 kann die schwache HA-Bindung von CD44v8-v10 in eine der von CD44s vergleichbare Adhäsion umwandeln (Bennett *et al.*, 1995b). Fehlende N-Glykosylierungen und Abbau von Chondroitinsulfat-Seitenketten konnten eine B-Zelllinie von einem nicht HA-bindenden in einen HA-bindenden Zustand überführen (Lesley *et al.*, 1995). Die Hemmung der N-Glykosylierung von CD44 in CHO-Zellen erhöht ebenfalls die HA-Bindung (Kato *et al.*, 1995). Aminosäureaustausche in den potentiellen N-Glykosylierungsstellen und den Strukturmotiven von CD44s, die die Bindung von Glykosaminoglykanen fördern, konnten dagegen die Hyaluronsäurebindung blockieren (Bartolazzi *et al.*, 1996). Glykosylierungen von CD44 können daher je nach Bedingung sowohl stimulierende wie auch inhibierende Auswirkungen auf die Hyaluronsäurebindung von CD44 haben.

Auch die cytoplasmatische Domäne von CD44 und die damit verbundenen Modifikationen von CD44 durch Phosphorylierungen haben Auswirkungen auf die Adhäsion an Hyaluronsäure (Lesley *et al.*, 1992; Lokeshwar *et al.*, 1994; Perschl *et al.*, 1995; Puré *et al.*, 1995). Neuere Publikationen, bei denen Punktmutanten der Phosphorylierungsstellen der cytoplasmatischen Domäne von CD44 verwendet wurden, weisen allerdings mehr auf eine Beteiligung von Phosphorylierung im Zusammenhang mit HA-abhängiger Migration als auf eine Beeinflussung der Zelladhäsion an Hyaluronsäure hin (Uff *et al.*, 1995; Peck und Isacke, 1996; Peck und Isacke, 1998).

Schließlich sind auch Auswirkungen von Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der extrazellulären Domäne von CD44s oder varianter CD44-Isoformen für die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure beschrieben worden (Perschl *et al.*, 1995; Sleeman *et al.*, 1996a; Liu und Sy, 1997).

Neben den oben erwähnten Auswirkungen der Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure auf eine Reihe zellulärer Prozesse sind noch einige direkte Folgen für den HA-Metabolismus beschrieben worden. Die Interaktion von Hyaluronsäure mit CD44 kann zu einer Aufnahme und einem Abbau von Hyaluronsäure in der Zelle führen (Culty *et al.*, 1992; Kaya *et al.*, 1997). Transgene Mäuse mit einer zielgerichteten Expression von "Antisense"-Konstrukten von CD44 in Hautkeratinozyten zeigten eine Störung des HA-Metabolismus und eine verminderte Proliferationsrate der Zellen (Kaya *et al.*, 1997).

1.3.4 Weitere Liganden von CD44

Neben Hyaluronsäure sind Kollagen I (Wayner und Carter, 1987; Faassen *et al.*, 1992), Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), Laminin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), die mit Chondroitinsulfat modifizierte Form der konstanten Kette (Ii) des MHC-Klasse II (Naujokas *et al.*, 1993), Serglycin/gp600 (Toyama-Sorimachi *et al.*, 1995) und Osteopontin (Weber *et al.*, 1996) weitere beschriebene Liganden von CD44. Modifikationen von CD44 mit Proteoglykan-Seitenketten (GAG) sind bei der Bindung und Präsentation von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen (Tanaka *et al.*, 1993) von Bedeutung. So sind Modifikationen des Proteins mit Heparansulfat für die Bindung von Wachstumsfaktoren wie bFGF, FGF-8 oder

HB-EGF über das alternativ gespleißte Exon v3 von Bedeutung (Bennett *et al.*, 1995a; Jackson *et al.*, 1995; Sherman *et al.*, 1998). Eine Modifikation von CD44 mit Chondroitinsulfat ist auch für die Bindung von Kollagen I und Fibronectin notwendig (Faassen *et al.*, 1992; Jalkanen und Jalkanen, 1992). Für die Bindung von CD44 an Serglycin wie auch an die konstante Kette von MHC-Klasse II sind dagegen Chondroitinsulfatmodifikationen der Liganden notwendig (Naujokas *et al.*, 1993; Toyama-Sorimachi *et al.*, 1995).

1.3.5 Funktion von CD44 in Zellen des Immunsystems

Die Expression von CD44 ist für Zellen des Immunsystems beschrieben, die im Rahmen ihrer Funktion migrieren müssen und somit in einigen Aspekten metastasierenden Tumorzellen nahekommen. Bei der Auswanderung aktivierter T-Zellen aus der peripheren Zirkulation in Entzündungsherde spielen Interaktionen zwischen aktiviertem CD44 und Hyaluronsäure eine wichtige Rolle (de Grendele *et al.*, 1997a). Eine mögliche Form der Aktivierung von CD44 in Entzündungsprozessen konnte in einer Leukozytenzelllinie gezeigt werden, in der die inaktive, nicht HA-bindende Form von CD44 durch TNF- α in eine aktive HA-bindende Form überführt wurde. Die Induktion der Bindung an Hyaluronsäure und vaskuläre Endothelzellen wurde dabei durch eine nicht näher charakterisierte Sulfatierung von CD44 katalysiert (Maiti *et al.*, 1998). In Langerhans-Zellen der Haut werden nach Antigenkontakt variante CD44-Epitope hochreguliert. Die Emigration dieser Zellen aus der Hautepidermis kann mit Antikörpern gegen CD44 blockiert werden (Weiss *et al.*, 1997). CD14⁺-Monozyten aus peripherem Blut regulieren nach Aktivierung CD44 wie auch variante CD44-Epitope auf. Diese Expression von CD44-Isoformen ist auch bei der Einwanderung in Entzündungsherde zu beobachten (Levesque und Haynes, 1996; Weiss *et al.*, 1998).

Bei der Kultivierung von humanen dendritischen Zellen aus CD14⁺-Monozyten *in vitro* ist während der Reifung eine Aufregulation von CD44-Isoformen beobachtet worden. Diese CD44-Isoformen hatten einen stimulatorischen Einfluß auf die Proliferation von T-Lymphozyten (Haegel-Kronenberger *et al.*, 1998). B- und T-Lymphozyten regulieren nach Stimulation mit Antigenen das variante CD44v6-Epitop auf. Ein Antikörper gegen dieses Epitop konnte die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten *in vivo* blockieren (Arch *et al.*, 1992). In einer Reihe von Untersuchungen wurde zudem eine kostimulatorische Funktion von CD44 bei der Aktivierung von T-Lymphozyten beschrieben (Rothman *et al.*, 1991; Naujokas *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1996).

In Zellen des Immunsystems erfüllt CD44 somit vor allem Funktionen bei der Migration und bei der Aktivierung der Immunantwort.

1.3.6 Einfluß von CD44 bei Tumorprogression und Metastasierung

Der erste Hinweis auf die Bedeutung von CD44-Isoformen beim Prozess der Metastasierung kam durch stabile Transfektion einer das CD44-Exon v6 enthaltenden Isoform von CD44 in eine nicht metastasierende Pankreas-Karzinomzelllinie der Ratte. Durch die Expression des CD44v6-Epitops war das metastatische Potential dieser Zelllinie *in vivo* stark erhöht (Günthert *et al.*, 1991). Ein gegen diese variante Isoform gerichteter monoklonaler Antikörper konnte die Bildung von Metastasen verhindern (Seiter *et al.*, 1993). Die Überexpression von CD44 wie auch die Expression varianter Exons und die damit verbundene schlechte Prognose

für Patienten ist seitdem für eine Reihe von Karzinomen und Krebsarten beschrieben worden (Überblick in: Naor *et al.*, 1997; Herrlich *et al.*, 1998).

Der Einfluß der Bindung von Hyaluronsäure durch CD44 im Zusammenhang mit Tumorprogression und Metastasierung ist ebenfalls untersucht worden. Experimente, bei denen mit CD44s- sowie CD44v8-v10-cDNAs transfizierte Burkitt-Lymphomzellen *in vivo* subkutan in Nacktmäuse injiziert wurden, zeigten für die CD44s exprimierenden Zellen ein verstärktes Primärtumorwachstum. Nach intravenöser Injektion verursachte die CD44s exprimierende Zelllinie eine erhöhte Anzahl von Metastasen, was auf eine erhöhte HA-Bindungsfähigkeit von CD44s gegenüber CD44v8-v10 zurückgeführt werden konnte (Sy *et al.*, 1991). Eine stabil mit einer CD44s-cDNA transfizierte humane Melanomlinie erzeugte nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse ebenfalls schnell wachsende Primärtumoren. Das Tumorwachstum von Zellen, die mit einer in der HA-Bindungsdomäne mutierten CD44s-cDNA transfiziert waren, war dagegen inhibiert (Bartolazzi *et al.*, 1994). In einem weiteren Modell wurde eine menschliche Burkitt-Lymphomzelllinie stabil mit cDNA-Konstrukten transfiziert, die für CD44s sowie verschiedene variante CD44-Isoformen kodierten. Nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse zeigten CD44v6-v10, CD44v7-v10, CD44v8-v10, nicht aber CD44v3,v8-v10, CD44v3-v10 und CD44s exprimierende Zellen ein vermindertes Primärtumorwachstum. Die Bindungsfähigkeit an Hyaluronsäure war dabei bei allen Zellen, die variante CD44-Isoformen exprimierten, stark verringert (Bartolazzi *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu war das metastatische Potential einer HA-bindenden Pankreas-Karzinomzelllinie nach Transfektion einer für Hyaluronidase kodierenden cDNA unverändert, obwohl diese Zellen keine Hyaluronsäure mehr binden konnten (Sleeman *et al.*, 1996b).

Der Einfluß von CD44 auf die Progression von Tumoren und die Metastasierung von Tumorzellen ist somit mit einer Modulation der Expression von CD44-Isoformen assoziiert. Der Einfluß von Interaktionen von CD44 mit Hyaluronsäure auf die Metastasierung von Tumorzellen ist dabei noch nicht vollständig verstanden.

1.3.7 Weitere postulierte Zelloberflächenrezeptoren für Hyaluronsäure

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Proteine charakterisiert, die in der Lage sind, Hyaluronsäure zu binden. Dazu zählen zunächst Proteine, die selbst nur Bestandteile der ECM sind wie z.B. Cartilage-Link-Protein, Hyaluronectin, Versikan, TSG-6 und Aggrekan (Übersicht in: Lesley *et al.*, 1993). Zu Beginn dieser Arbeit waren neben CD44 zudem zwei weitere zelluläre Proteine mit postulierten Funktionen als Hyaluronsäurerezeptor beschrieben: RHAMM/IHABP (Turley *et al.*, 1991) und ICAM-1 (CD54) (McCourt *et al.*, 1994).

1.3.7.1 RHAMM/IHABP

RHAMM/IHABP („Receptor for **HA**-mediated Motility/Intracellular **HA**-Binding Protein“) wurde ursprünglich als Zelloberflächenrezeptor für Hyaluronsäure beschrieben, der in H-ras transformierten Mausfibroblasten die Funktion der Zellbewegung vermittelte (Turley *et al.*, 1991; Hardwick *et al.*, 1992). Später konnte gezeigt werden, daß die Überexpression einer Variante von RHAMM in Mausfibroblasten transformierend wirkte und die Bildung von Metastasen vermitteln konnte (Hall *et al.*, 1995). Eine humane RHAMM-cDNA wurde aus einer Mamma-Karzinomzelllinie isoliert und ein polyklonales RHAMM-Antiserum erkannte verschiedene Proteine mit Größen von 85 kDa und möglichen Isoformen von 70 und 60 kDa

(Wang *et al.*, 1996). Aus der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurden cDNA-Sequenzen für humanes RHAMM isoliert, die für zwei Isoformen von RHAMM mit Größen von 84 und 82 kDa kodieren (Assmann *et al.*, 1998). Die verschiedenen publizierten cDNA-Sequenzen für das humane 85 kDa-RHAMM/IHABP sind bis auf eine irrtümlich in der cDNA von Wang *et al.* mitangegebenen Sequenz einer multiplen Klonierungsstelle eines Plasmides am 5'-Ende und einem Triplet an Position 260-262, das in der cDNA von Assmann *et al.* nicht zu finden ist, identisch (Wang *et al.*, 1996; Assmann *et al.*, 1998). Die Vollständigkeit der ursprünglich veröffentlichten murinen cDNA von RHAMM/IHABP (Entwistle *et al.*, 1995) ist inzwischen durch die Arbeit von Hofmann *et al.* (Hofmann *et al.*, 1998a) korrigiert worden. Gegenüber der Sequenz von Entwistle *et al.* wurde dabei ein offener Leserahmen von 2382 bp gefunden. Ein gegen ein Strukturmotiv dieses Proteins gerichtetes Serum erkannte in Totalzellextrakten von Fibrosarkomzelllinien der Maus exklusiv ein 95 kDa Protein (Hofmann *et al.*, 1998a). Eine basale Expression von RHAMM/IHABP wurde darüber hinaus in mehreren untersuchten Geweben der Maus gefunden (Fieber *et al.*, 1999).

1.3.7.2 Lokalisation und Funktion von RHAMM/IHABP

In den Studien von Assmann *et al.* und Hofmann *et al.* konnte zudem eine eindeutige Lokalisierung von RHAMM im Cytoplasma der untersuchten Zelllinien gezeigt werden, was in Widerspruch zu anfänglichen Berichten steht, die eine Membranverankerung des Proteins postuliert hatten (Turley *et al.*, 1990; Hardwick *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 1993). Das Protein wurde aufgrund dieser Befunde in IHABP (Intracellular HA-Binding Protein) umbenannt (Hofmann *et al.*, 1998a).

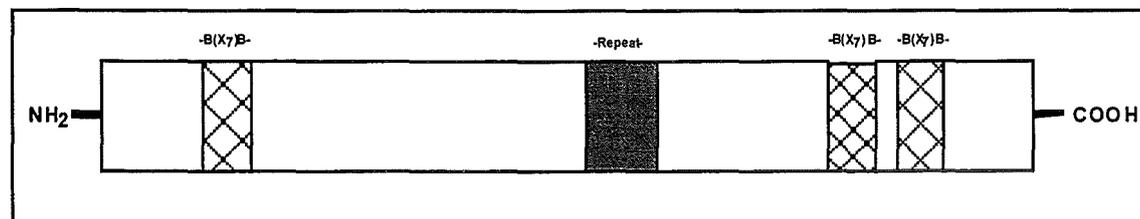


Abb. 3. Domänenstruktur des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM/IHABP. Das -B(X₇)B-Motiv bezeichnet das Konsensusmotiv für Hyaluronsäure-Bindungsdomänen. Mit der "Repeat"-Region ist die im humanen Protein nur einmal vorkommende Tropomyosin-Homologiedomäne bezeichnet.

Das menschliche Protein enthält drei potentielle, für die HA-Bindung charakteristische B(X₇)B-Motive. Eine 5x in murinem RHAMM/IHABP vorkommende Tropomyosin-Domäne ("Repeat"-Region) kommt in der menschlichen cDNA nur einmal vor (Wang *et al.*, 1996; Abb. 3). Über die Funktion dieser Domäne gibt es bislang noch keine Information. Einige der bislang veröffentlichten funktionellen Daten zu RHAMM sind durch die dabei verwendeten offensichtlich unvollständigen cDNAs in Diskussion geraten (diskutiert in: Hofmann *et al.*, 1998b). Inwieweit RHAMM/IHABP daher eine Rolle bei Prozessen wie Transformation und Onkogenese spielt, ist aufgrund dieser Unklarheiten noch nicht zu beurteilen. Die cytoplasmatische Lokalisierung des Proteins und die Fähigkeit von RHAMM/IHABP, Hyaluronsäure zu binden, können aber als gesichert gelten.

1.3.7.3 ICAM-1 (CD54)

ICAM-1 wurde als weiterer membranständiger Hyaluronsäurerezeptor beschrieben. Das Molekül wurde dabei mit Hilfe von HA-Sephrose-Affinitätschromatographie aus Endothelzellen der Rattenleber isoliert (McCourt *et al.*, 1994). Obwohl ICAM-1 das für die Hyaluronsäurebindung typische -B(X₇)B-Konsensusmotiv fehlt, wurde auch in Mastzelltumoren der Maus eine HA-Bindungsfunktion für ICAM-1 beschrieben (Gustafson *et al.*, 1995). In einer neueren Publikation derselben Autoren wird die HA-Bindungsfunktion von ICAM-1 allerdings in Frage gestellt (McCourt und Gustafson, 1997). Von einer Funktion von ICAM-1 als Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure ist daher mittlerweile nicht mehr auszugehen.

1.4 Proteolyse von CD44

1.4.1 Generelle Aspekte der Proteolyse von Membranproteinen

Die Expression von Proteinen ist generell bestimmt durch die Transkriptionsfrequenz, von der Stabilität von RNA und der Stabilität der translatierten Proteine. Als Regulationsmechanismus der Proteinexpression kommt bei Zelloberflächenproteinen die Proteolyse hinzu. Für die Elimination von Zellmembranproteinen sind mehrere Mechanismen vorstellbar: Internalisierung der Oberflächenrezeptoren, Glykolipidspaltungen bei GPI-verankerten Oberflächenmolekülen und schließlich die proteolytische Abspaltung der Membranproteine durch Proteasen. Durch die proteolytische Abspaltung der Membranproteine werden dabei häufig lösliche Formen gebildet, die nach wie vor eine Funktion haben können (Tedder *et al.*, 1991).

Die Endoproteolyse von Membranproteinen von der Zelloberfläche ist für viele Proteine beschrieben worden (Übersicht in: Bazil, 1995). Bekannte Beispiele für die Abspaltung von Zellmembranmolekülen sind einige Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-1, IL-2, Insulin, TNF, EGF und NGF. Auch für einige Adhäsionsmoleküle sind endoproteolytische Mechanismen beschrieben worden. So wird L-Selektin von der Zelloberfläche von Leukozyten abgespalten (Chen *et al.*, 1995b), wobei Matrix-Metalloproteasen beteiligt sind (Preece *et al.*, 1996). Die Abspaltung von VCAM von der Oberfläche von Lymphozyten wird ebenfalls von einer Matrix-Metalloprotease katalysiert (Leca *et al.*, 1995). Proteolytische Abspaltung wurde ebenfalls für Ng-CAM ("Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule") und für verschiedene Integrine beschrieben (Potts *et al.*, 1994; Burgoon *et al.*, 1995; Friedl *et al.*, 1997). Die Bildung von löslichem ICAM-1 während der Progression des malignen Melanoms und die daraus resultierenden Effekte auf die Immunantwort sind schon erwähnt worden. Kürzlich konnte eine Elastase identifiziert werden, die in Neutrophilen die Produktion von löslichem ICAM-1 katalysiert (Champagne *et al.*, 1998).

1.4.2 Proteolyse von CD44

Auch CD44 kann von der Zellmembran abgespalten werden (Bartolazzi *et al.*, 1995; Goebeler *et al.*, 1996; Friedl *et al.*, 1997). Bei der Migration von Melanomzellen in einer

dreidimensionalen Kollagenmatrix wurde die Proteolyse von $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -Integrinen sowie von CD44 beobachtet (Friedl *et al.*, 1997). Die Migration stark metastasierender MM-Zellen auf Hyaluronsäure ist in Verbindung zu erhöhtem CD44s-Umsatz und Abspaltung des Proteins von der Zelloberfläche gebracht worden (Goebeler *et al.*, 1996). Erhöhte Werte der löslichen Standardform von CD44 (solCD44s) wie auch varianter Isoformen (solCD44var) wurden in Seren von Krebspatienten gemessen. Eine Korrelation erhöhter solCD44s-Serumwerte mit Tumorlast und Metastasierungsgrad wurde bei Patienten mit Magen- und Darmkrebs beschrieben (Guo *et al.*, 1994b). Hohe Serumwerte von CD44s im Vergleich zu gesunden Personen wurden auch bei Patienten mit Ovariarkarzinomen und Brustkrebs gemessen (Martin *et al.*, 1997; Zeimet *et al.*, 1997; Lackner *et al.*, 1998). Die Serumwerte von löslichem CD44 in Nacktmäusen, denen menschliche Brustkrebszelllinien injiziert worden waren, stiegen in Korrelation zur Primärtumorgröße (Fichtner *et al.*, 1997).

Studien, bei denen spezifische Proteinaseinhibitoren verwendet wurden, um die Abspaltung von CD44 in menschlichen Granulozyten zu verhindern, zeigten eine Beteiligung von Metalloproteinasen und Serinproteasen beim Prozeß der Abspaltung von CD44 (Bazil und Strominger, 1994). Bislang konnte die proteolytische Aktivität aber noch keiner spezifischen Protease zugeordnet werden.

1.4.3 Funktionelle Aspekte der Proteolyse von CD44

Die Proteolyse von CD44 könnte ein unspezifischer Prozeß der Degradation eines Membranproteins sein, der ohne funktionelle Konsequenzen sein könnte. In mehreren Untersuchungen wurden aber mögliche Funktionen von löslichem CD44 beschrieben.

Die zunächst naheliegende Frage bei der funktionellen Untersuchung von löslichem CD44 ist, ob lösliches CD44 noch in der Lage ist, Hyaluronsäure zu binden. Für lösliches CD44 in der Blutzirkulation von Mäusen konnte eine Hyaluronsäurebindung nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 1994). Durch die Verwendung von aufgereinigten, löslichen CD44Rg-Fusionsproteinen, bei denen extrazelluläre Domänen verschiedener CD44-Isoformen an humanes IgG fusioniert sind, konnten gezielt funktionelle Aspekte von löslichem CD44 untersucht werden (Aruffo *et al.*, 1990, Peach *et al.*, 1993). Die Adhäsion einer Burkitt-Lymphomzelllinie an von Hyaluronsäure umgebene Lymphknoten-Stromazellen konnte durch Zugabe des CD44sRg-Fusionsproteins blockiert werden konnte. Der Einsatz eines CD44v8-v10Rg- sowie eines CD44sR41ARg-Fusionsproteins, die nur schwach Hyaluronsäure binden, hatte keinen Einfluß auf die HA-Bindung (Bartolazzi *et al.*, 1995). Zellkulturüberstände von Zellen, in denen die löslichen CD44-Isoformen solCD44v6-v10, solCD44v7-v10 und solCD44v8-v10 detektiert worden waren, konnten die von membranständigem CD44 abhängige HA-Bindung von Zellen ebenfalls blockieren (Bartolazzi *et al.*, 1995).

Die funktionellen Auswirkungen der HA-Bindungsfähigkeit von löslichem CD44 auf das Tumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen *in vivo* ist ebenfalls untersucht worden. Nach Injektion von Tumorzellen in Nacktmäuse konnte gezeigt werden, daß das Tumorwachstum durch Zugabe des HA-bindenden CD44sRg-Fusionsproteins blockierbar war (Sy *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1994). Durch Transfektion einer CD44-positiven Mamma-Karzinomzelllinie mit cDNA-Konstrukten, die für lösliches, von den Zellen sezerniertes

solCD44v6-v10, solCD44v8-v10 sowie für die HA-Bindungsmutante solCD44v6-v10R43A kodierten, wurde der Einfluß von löslichen CD44-Isoformen auf die Metastasierung untersucht (Yu *et al.*, 1997). Lösliches solCD44v6-v10 sowie lösliches solCD44v8-v10 verhinderten die Bildung von Lungenmetastasen nach intravenöser Injektion der Zellen in Nacktmäuse. Die Parentalzelllinie, Kontrolltransfektanten und mutiertes solCD44v6-v10R43A exprimierende Transfektanten zeigten dagegen ein starkes Metastasierungspotential. Der Effekt von löslichem solCD44v6-v10 und löslichem solCD44v8-v10 war mit einer stark erhöhten Anzahl apoptotischer Tumorzellen in Zielorganen wie der Lunge verbunden. (Yu *et al.*, 1997). In diesem Zellsystem führte die Konkurrenz von löslichem, variantem CD44 mit membranständigem CD44 der Tumorzellen zum programmierten Zelltod der Tumorzellen.

Zusätzlich zu einem enzymatisch kontrollierten Mechanismus ist auch eine genetisch regulierte Synthese eines löslichen Genproduktes von CD44 denkbar, der vermutlich funktionelle Konsequenzen nach sich ziehen würde. Durch alternatives Spleißen könnten Genprodukte ohne Transmembrandomäne gebildet werden, die dann von der Zelle sezerniert würden. Ein derartiger Mechanismus wurde für CD44 in Bindegewebe und Muskeln von Mäusen entdeckt. Ein zusätzliches alternativ gespleißtes Exon zwischen den Exons v9 und v10 bewirkt dort die Synthese einer löslichen Form von CD44. Eine Funktion dieses Genproduktes wurde allerdings nicht beschrieben (Yu und Toole, 1996).

1.5 Fragestellung

Die funktionellen Konsequenzen der Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 während der Tumorprogression des malignen Melanoms sind bislang kaum untersucht worden. Beschreibende oder funktionelle Daten zum postulierten Hyaluronsäurerezeptor RHAMM/IHABP in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms liegen bislang nicht vor. In einer CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP einschließenden Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung dieser drei Proteine im malignen Melanom sowohl in Tumorproben von Melanompatienten als auch in humanen Melanomzelllinien analysiert werden. Insbesondere sollten dabei die Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrixkomponente Hyaluronsäure und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Proliferation von Melanomzellen und die Synthese von Wachstumsfaktoren erforscht werden.

Für lösliche, proteolytisch erzeugte Formen von CD44 sind in Tumormodellen anti-proliferative Wirkungsmechanismen gezeigt worden. Die proteolytische Abspaltung von CD44 in Melanomzelllinien sollte daher funktionell untersucht werden. Das dafür geplante Vorgehen reichte von der Überprüfung der Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von löslichem CD44 bis hin zur Analyse des Einflusses des löslichen Proteins auf Proliferation und Adhäsion von Melanomzellen.

Durch stabile Transfektion von CD44-cDNAs, die für sezernierte, lösliche Formen von CD44 kodieren, sollte in einem definierten Zellsystem die konstitutive Produktion von löslichem CD44 durch Melanomzellen untersucht werden.

Durch die subkutane Injektion löslichen CD44 exprimierender Melanomzellen in Nacktmäuse sollten durch Konkurrenzmechanismen von löslichem CD44 mit membranständigem CD44 der Melanomzellen die Auswirkungen auf das Tumorwachstum *in vivo* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Aerosol-sichere Pipettenspitzen	Stratagene, Heidelberg
Agarose	Appligene, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, München
CsCl	Serva, Heidelberg
DEPC	Sigma, München
dNTP	Promega, Heidelberg
ddNTP	Promega, Heidelberg
DTT	Sigma, München
DMEM	Gibco, Eggenstein
DMSO	Sigma, München
DOC (Natriumdesoxycholat)	Sigma, München
ECL	Amersham, Braunschweig
Econo Pac - Säulen	Bio Rad, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	PAA, Coelbe
FITC	Sigma, München
G418	Gibco, Eggenstein
Guanidiniumisothiocyanat	Fluka, Buchs (CH)
Hyaluronsäure vom Hahnenkamm	Sigma, München
Hyaluronidase	Calbiochem, Frankfurt
Hybond Nylon N ⁺ - Membranen	Amersham, Braunschweig
Lachssperma-DNA	Sigma, München
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Boehringer, Mannheim
MGM	Promo Cell, Heidelberg
N,N'- Methylenbisacrylamid	Bio Rad, München
NP-40	Sigma, München
NTP	Promega, Heidelberg
Oligo-d(T) ₁₈	Boehringer, Mannheim
Oligo-d(T)-Zellulose	Biolabs, Schwalbach
PBS	Gibco, Eggenstein

Material und Methoden

PMSF	Sigma, München
PPO (2,5 Diphenyl-Oxazol)	Sigma, München
Protein A/G-Sepharose	Calbiochem, Bad Soden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma, München
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen, Düsseldorf
Random Primer d(N) ₆	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma, München
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham, Braunschweig
RPMI 1640	Seromed, Eching
SDS	Sigma, München
SDS-Page-Standard	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
X-Gal	Sigma, München

Chemikalien in analytischer Reinheit wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Buchs, CH) bezogen.

2.1.2 Lösungen

Bromphenolblau-Ladepuffer	50% Sucrose; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS; 0,06% BPB; 0,06% Xylencyanol
Coomassie-Färbelösung	40% Methanol; 10% Essigsäure; 0,25% Coomassie Brilliant Blue R250
Chomczynski Lysepuffer	4 M Guanidin-Isothiocyanat; 100 mM Tris pH 8,0; 100 mM β -Mercaptoethanol; 0,5% Na-Sarkosyl
Church-Hybridisierungspuffer	7% SDS; 0,5 M NaHPO ₄ ; pH 7,2
Denhardt's Lösung (100x)	2% Ficoll 400; 2% PVP; 2% BSA in H ₂ O <small>bidest</small>
FPH	5x SSC; 1% SDS; 50% Formamid; 5x Denhardt
HEPES-Puffer (isotonisch)	1 mM MgCl ₂ , 0,5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 20 mM HEPES, pH 8,1; 0,11 M NaCl
HEPES-Puffer (hypotonisch)	1 mM MgCl ₂ , 0,5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 20 mM HEPES, pH 8,1
Ladepuffer für DNA-Agarosegele	15% Ficoll 400; 60 mM EDTA; 30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau

Material und Methoden

Ladepuffer für RNA-Formaldehydgele	1x MOPS-Puffer; 50% Formamid; 6,5% Formaldehyd; 10 µg/ml Ethidiumbromid; 1x Bromphenolblau-Ladepuffer
MOPS/EDTA (10x)	0,2 M MOPS; 50 mM NaAcetat; 10 mM EDTA; pH 7,0
Phenol	mit 50 mM Tris-Base auf pH 7 äquilibriertes Phenol
PBS (10x)	0,017 M KH ₂ PO ₄ ; 0,05 M Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 M NaCl; pH 7,4
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0,5% (w/v) DOC; 0,1% SDS
2x SDS-Probenpuffer (2x Laemmli)	160 mM Tris, pH 6,6; 4% SDS; 16% Glycerin 0,57 M β-Mercaptoethanol oder 100 mM DTT; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base; 144,2 g Glycin; 10 g SDS in 1 l H ₂ O
STE	20 mM Tris; 100 mM NaCl, 2 mM EDTA; pH 7,4
STE-SDS	STE mit 0,5% SDS
SSC	0,15 M NaCl; 0,015 M Tri-Natrium-Citrat
TE	10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
TAE - Puffer (1x)	20 mM Tris-Base; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,3
X-Gal (20 mg/ml)	100 mg X-Gal in 5 ml Dimethylformamid lösen

2.1.3 Zellkulturmedien

MM-Medium	RPMI1640; 10% FCS (PAA); 2 mM L-Glutamin; 1x NEAA (100x; Gibco)
cRPMI	RPMI1640 ohne Methionin und Cystein (Sigma); 10% FCS (ü.N. dialysiert bei 4°C gegen 140 mM NaCl; 10 mM HEPES, danach steril filtriert); 1% Pen/Strep (Gibco); 1x L-Lysin (200x; Sigma); 1x L-Leucin (200x; Sigma); 2 mM L-Glutamin (200 mM-Stock; Gibco)
HaCat-Medium	DMEM; 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin

Material und Methoden

Melanozyten-Medium	MGM (Promo Cell); 1,0 ng/ml humanes bFGF; 5 µg/ml Insulin; 0,5 µg/ml Hydrocortison; 10 µg/ml PMA; 50 µg/ml Gentamicin; 2,5 µg/ml Amphotericin B; 2 ml BPE
Keratinocyten-Medium	KCM (Promo Cell, Heidelberg)
Kulturmedium für dendritische Zellen	RPMI 1640; 10% FCS (LPS- und endotoxinfrei); 50 ng/ml humanes GM-CSF; 200 U/ml humanes IL-4 (Schering, Berlin)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -T-Zellenmedium	RPMI 1640; 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin

2.1.4 Bakterienkulturmedien

SOB	2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; pH 7,0; autoklavieren
SOC	SOB-Medium + 20 mM Glukose
Ty-Medium (2x)	1,6 % Bacto-Trypton; 1 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; ad 2 l mit H ₂ O; autoklavieren
LB-Agar-Platten	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; 1 % Agar, nach autoklavieren abkühlen lassen, dann 100 µg/ml Ampicillin zugeben und Platten gießen

2.1.5 Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien wurden von Amersham (Braunschweig) bezogen:

Pro-mix L-[³⁵S] in vitro cell labelling mix (530 MBq/ml; 14,3 mCi/ml)
[methyl-³H]-Thymidin (37 MBq/ml; 1 mCi/ml)
[α-³³P]ddNTPs (ddG, ddA, ddT, ddC; 1500 Ci/mmol; 450 µCi/ml)
[α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)

2.1.6 Kits

Easy Pure DNA-Isolierungskit	BioZym, Hess. Oldendorf
ELISA-Kits:	
anti-CD44s	Bender, Wien
anti-CD44var	Bender, Wien
anti-bFGF	R&D Systems, Abington (UK)
antiTGF-β1	R&D Systems, Abington (UK)
Fix&Perm Zellpermeabilisierungs-Kit	Dianova, Hamburg
HA-RIA	Pharmacia, Uppsala
Mycoplasmen Detektions Kit	Boehringer, Mannheim
Prime-It II	Stratagene, Heidelberg
(Random Primer Labeling Kit)	

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
TA-Cloning-Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
Thermo Sequenase-Kit ©	Amersham, Braunschweig

2.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen :

New England Biolabs, Schwalbach
Boehringer, Mannheim
Pharmacia, Freiburg
Promega, Heidelberg

DNA-modifizierende Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen :

T4-DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
T4-DNA Ligase	Promega, Heidelberg New England Biolabs, Schwalbach
SuperScript™	
Reverse Transkriptase	Gibco, Eggenstein
Shrimp Alkalische Phosphatase	USB, Cleveland, USA
Taq-DNA Polymerase	Gibco, Eggenstein

2.1.8 Mausstämme

Für die Untersuchung des Tumorwachstums von MM-Zellen *in vivo* wurden MF1 nu/nu Nacktmäuse verwendet.

2.1.9 Eukaryontische Zellen

Übersicht und Herkunft der verwendeten Zelllinien und -typen:

Humane MM-Zelllinien:

HT144 und **MM1** wurden über ATCC, Rockville (USA) bezogen.

MV3 und **1F6** wurden freundlicherweise von Dr. G.P. van Muijen am Pathologischen Institut der Universität Nijmegen (Niederlande) zur Verfügung gestellt.

SB1 und **SB3** wurden uns freundlicherweise von Dr. C.V. Hamby am New York Medical College, Valhalla, New York (USA) überlassen. Die Zellen wurden bei 37°C in einer 5% CO₂-haltigen Atmosphäre gehalten.

Humane Basaliomzelllinie:

HaCat wurde vom Dr. Andy Cato, Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Humane Brustkrebszelllinien:

T47D und **MCF7** wurden freundlicherweise von Dr. Andy Cato, IGEN, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Primäre humane Melanozyten und Keratinozytenkulturen:

Die Kultur primärer, nicht transformierter Melanozyten und Keratinozyten wurde aus Vorhäuten Neugeborener etabliert. Nach Selektion in zelltypspezifischen Medien wurden die Zellen bis zu fünfmal passagiert und für Versuche eingesetzt.

CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten:

Die Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut erfolgte zunächst über einen Ficoll-Gradienten und Erythrozytenlyse. Die Aufreinigung der CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten erfolgte durch negative Depletion, wobei mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern markierte B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Lymphozyten, NK-Lymphozyten und Granulozyten selektiv mit sekundären, an magnetische Kügelchen gekoppelten Antikörpern (DynaL, Hamburg) aus der Zellsuspension entfernt wurden, wodurch eine Reinheit der T-Lymphozytenpopulation von über 90% erhalten wurde.

Dendritische Zellen:

Die Isolierung von humanen dendritischen Zellen aus peripherem Blut erfolgte zunächst ebenfalls über einen Ficoll-Gradienten und Erythrozytenlyse. Die daran anschließende positive Selektion der mit einem Maus anti-human CD14 Antikörper vormarkierten Monozyten mit einem Ziege anti-Maus IgG (H+L)-MACS-Kügelchen gekoppelten, sekundären Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) ergab eine CD14⁺-Zellpopulation von etwa 90%, die durch Zugabe von huGM-CSF und huIL-4 in einem Zeitraum von sechs Tagen in reife, Antigen-präsentierende, dendritische Zellen ausdifferenzierte.

2.1.10 Prokaryontische Zellen

E.coli K12/DH 5 α

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie: F['] endA1, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, l⁻ recA1, gyrA96, relA1

E.coli NM522 (Gough und Murray, 1983)

Genotyp: supE44, thi-1, D(lac-proAB), D(mcrB-hsdSM), (r_k⁻, m_k⁻), [F['] proAB, lacI^qZDM15]

INV α F['] (Invitrogen)

F['] endA1, recA1, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, f80 LacZDM15, D(lacZYA-argF)U169

Epicurian Coli XL1-Blue (Stratagene)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F`proAB, lacI^qZDM15Tn10(Tet^r)]^c

2.1.11 Plasmide

pAD-CMV2 (Ellen Ostermann, Bender, Wien)

Expressionsvektor, in den humanes solCD44s über die Kpn I/BamH I-Schnittstellen kloniert worden war. Ein 315 bp langes CD44-Fragment dieses Konstruktes wurde als Northern-Sonde verwendet.

pCR2.1 (Invitrogen)

Prokaryontischer Klonierungsvektor, der zwischen zwei EcoRI-Restriktionsstellen vorgeschritten ist. Die 3'-Enden weisen jeweils einen Thymidin-Überhang auf, der zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten geeignet ist.

pBluescript II SK (+/-) (Stratagene)

Klonierungsvektor, der sich von pUC19 ableitet.

pcDNA3 (Invitrogen)

Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression spezifischer Proteine. Der Vektor ist sowohl mit einem Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion nach Bakterientransformation als auch mit einem Neomycin-Resistenzgen, das zur Selektion nach Transfektion eukaryontischer Zellen durch Zugabe von G418 verwendet werden kann.

pcDNA3.1/His B/lacZ (Invitrogen)

Dieses Plasmid wurde für die β -Galaktosidase Kontrolltransfektionen verwendet.

pUC18-hu ICAM-1 (Johnson *et al.*, 1988)

Dieses Plasmid, das für Northern Blot Hybridisierungen verwendet wurde, enthält ein 580 bp-Fragment des 3'-Bereiches der humanen ICAM-1 cDNA. Dieses Fragment wurde durch Restriktionsverdau mit PstI in pUC18 kloniert.

2.1.12 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide (Birsner&Grob, Denzlingen; MWG-Biotech, Ebersberg) wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die Notation erfolgt gemäß der Konvention von 5' nach 3'. Positionsangaben beziehen sich auf die 5'-terminale Base.

Die Angaben für die RHAMM/IHABP-Oligonukleotide leiten sich aus der von Assmann *et al.* (1998) publizierten cDNA-Sequenz ab. Positionsangaben der CD44-Oligonukleotide richten sich nach der von Sreaton *et al.* (1992) publizierten Sequenz, wobei das Adenin des ATG-Startkodons von Exon 1 mit Pos. 1 bezeichnet wurde.

Besondere Sequenzbereiche (z.B. Restriktionsenzymchnittstellen) sind unterstrichen.

huRHAMM/IHABP sense (RT-PCR und Northern-Sonde)

Pos. 951: 5' CAG GAA TAG AGA ACA CAA CG 3'

huRHAMM/IHABP antisense (RT-PCR und Northern-Sonde)

Pos. 1719: 5' TCT TCC TTC TTC ATC TTC CAG C 3'

huCD44Exon4 sense (RT-PCR)

Pos. 409: 5' AAT GCC TTT GAT GGA CCA ATT 3'

CD44HR41ARg: Durch basenspezifische Mutationen wurde die Sequenz der Aminosäure 41 von CD44H so verändert, daß an Position 41 ein Alanin anstatt eines Arginin translatiert wird (Peach *et al.*, 1993). Die Klonierung erfolgte ebenfalls an humanes IgG₁.

Die oben genannten Fusionsproteine wurden uns freundlicherweise von Dr. Alejandro Aruffo, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.14 Monoklonale Antikörper und Färbereagenzien

Primäre Antikörper und Seren:

Antigen	Klon, Isotyp	Bezugsquelle
Maus IgG ₁ -Kontrolle	X40, m IgG ₁	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus IgG _{2a} -Kontrolle	X39, m IgG _{2a}	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-hu ERK1/2	K23, polyklonales Kaninchen-Serum	Santa Cruz, Heidelberg
anti-hu panCD44	LEU44, m IgG ₁	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-hu panCD44	BU75, m IgG ₁	The Binding Site, Birmingham
anti-hu panCD44	MEM85, m IgG ₁	Monosan, Uden (Niederlande)
anti-hu panCD44	Hermes 3, m IgG ₁	Dr. S. Jalkanen, University of Turku, (Finnland)
anti-m panCD44	IM7, rat IgG _{2b}	Pharmingen, Hamburg
anti-hu CD44v9	FW11.24, m IgG ₁	ATCC, Rockville (USA)
anti-hu CD44v4	FW11.10, m IgG _{2a}	ATCC, Rockville (USA)
anti-hu CD44v6	FW11.9, m IgG _{2a}	ATCC, Rockville (USA)
anti-hu MAA	HMB-45, m IgG ₁	Ortho, Neckargemünd
anti-hu ICAM-1	84H10, m IgG ₁	Immunotech SA, Marseille (F)
anti-hu S100	S100, polyklonales Kaninchen-Serum	DAKO, Hamburg
anti-hu IκB	polyklonales Kaninchen-Serum	Santa Cruz, Heidelberg
anti-hu RHAMM/IHABP	polyklonales Kaninchen-Serum	Dr. V. Assmann, St.Thomas' Hospital, London (UK)
anti-m RHAMM/IHABP	polyklonales Kaninchen-Serum	Dr. M. Hofmann, IGEN, Karlsruhe

Sekundäre Antikörper:

FITC gekoppelter Ziege anti-m IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC gekoppelter Ziege anti-Kaninchen IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
HRP gekoppelter Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Boehringer, Ingelheim
HRP gekoppelter Ziege anti-m IgG (H+L)	DAKO, Hamburg
Biotin gekoppelter Ziege anti-hu IgG ₁ F(ab') ₂	Tago Inc., Burlington, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit RNA und DNA

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden die folgenden Konstanten in die Berechnung einbezogen:

DNA : OD_{260 nm} von 1,0 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml

RNA : OD_{260 nm} von 1,0 entspricht 40 µg einzelsträngiger RNA/ml

Oligonukleotide : OD_{260 nm} von 1,0 entspricht 20 µg einzelsträngigem Oligonukleotid/ml

2.2.2 RNA - Präparation

2.2.2.1 Präparation von Poly(A)⁺-RNA aus Zellkulturen

Zellen von sechs Petrischalen (Durchmesser: 15 cm) wurden in 20 ml SDS-STE mit 400 µg/ml Proteinase K lysiert, im Ultra-Turrax homogenisiert und bei 37°C für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurden dem Lysat 100-300 mg Oligo d(T)-Zellulose zugesetzt und die Suspension auf 500 mM NaCl eingestellt. Die Bindung der polyadenylierten mRNA an die Oligo d(T)-Zellulose erfolgte ü.N. bei Raumtemperatur in einem Überkopffrotator. Nach der Ankopplung der mRNA an die Oligo d(T)-Zellulose wurde die RNA durch wiederholtes Pelletieren der Oligo d(T)-Zellulose und anschließendes Resuspendieren in Ladepuffer (400 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,2% SDS) gewaschen. Nach drei Waschschrritten wurde die Oligo d(T)-Zellulose-Suspension auf eine Econo Pac-Säule gegeben und mit 20 ml Waschpuffer (100 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,2% SDS) gewaschen. Die RNA wurde dann mit 4,5 ml salzfreien Elutionspuffer (1 mM Tris; pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 0,2% SDS) eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde im Photometer bestimmt und die RNA anschließend mit Ethanol bei -20°C ü.N. gefällt. Nach der Präzipitation der RNA wurde diese einmal mit 70% Ethanol gewaschen, durch Zentrifugieren pelletiert (20 min bei 4°C und 12000x g), getrocknet und mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.2.2.2 Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)

In Flüssigstickstoff eingefrorene Zellen wurden in 8 ml eines Lysepuffers (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 100 mM Tris, pH 8,0; 100 mM β-Mercaptoethanol; 0,5%

Sarkosyl) gegeben. Nach dem Homogenisieren der Probe (Ultra Turrax, 1 min, 12000 rpm) wurden nacheinander 2 ml 4 M Natriumacetat (pH 4,0), 8 ml Phenol (wassergesättigt) und 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Nach jedem Pipettierschritt wurden die Phasen kräftig auf einem Vortex-Schüttler durchmischt. Nach diesen Schritten wurde das Röhrchen für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 10000x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde danach nochmals mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert. Die RNA wurde dann anschließend durch Zugabe von 1 Vol. 2-Propanol präzipitiert. Durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 20000x g) wurde das Präzipitat sedimentiert und das Pellet anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Nach der Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer bei 260 nm, wurde die RNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von RNA wurde mit Formaldehyd-Gelen durchgeführt (Lehrach *et al.*, 1978). 1,0% (w/v) Agarose, 6% Formaldehyd wurden in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,0) gelöst und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde die Gelkammer mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. 3-5 µg Poly(A)⁺-RNA oder 10-20 µg Gesamt-RNA wurden im Konzentrator eingetrocknet, in 20-30 µl RNA-Ladepuffer gelöst und bei 65°C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen.

2.2.2.4 Northern Blotting

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die RNA durch UV-Licht bei 302 nm Wellenlänge visualisiert und fotografiert. Anschließend wurde das Gel in H₂O_{bidest} gewaschen und die RNA durch Kapillartransfer in 10x SSC ü.N. auf eine Nylonmembran übertragen. Für Northern Blots wurden Hybond Nylon N⁺-Membranen verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran vorsichtig vom Gel genommen und in 5x SSC äquilibriert. Zur Entfernung des Formaldehyds wurde die Membran dann 1 h bei 80°C gebacken. Anschließend wurde die RNA auf der Nylonmembran durch Bestrahlen mit 120 nJoule UV-Licht der Wellenlänge 254nm (Stratalinker, Stratagene, Heidelberg) kovalent fixiert.

2.2.2.5 Hybridisierung von Northern Blots

Der Filter wurde in eine Hybridisierungsröhre plaziert und 15-20 min in 2x SSC/1% SDS bei 50°C im Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) hydriert. Die Lösung wurde anschließend verworfen und durch den Hybridisierungspuffer ersetzt (FPH-Puffer: 5x SSC, 5x Denhardt-Lösung, 50% Formamid, 1% SDS). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Filter 2 h mit 10 ml FPH-Puffer bei 50°C vorhybridisiert. Danach wurden zur weiteren Blockierung hitzedenaturierte Lachsspermien-DNA und Hefe-tRNA (jeweils 100 µg/ml FPH-Puffer) zugesetzt und die Vorhybridisierung für 3 h fortgesetzt. Nach Ablauf der Vorhybridisierung wurden 2-5x 10⁶ cpm hitzedenaturierter, radioaktiv markierter DNA-Probe

pro ml FPH-Puffer zugefügt und die Membran ü.N. bei 50°C hybridisiert. Der Blot wurde nach der Hybridisierung 3x 20 min mit 1x SSC/1% SDS gewaschen, wobei die Waschlösung mehrfach ausgewechselt wurde. Zuletzt wurde der Filter in Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

2.2.2.6 Verfahren zum Abtrennen einer radioaktiv markierten Sonde von Membranen

Sollte derselbe Filter noch ein weiteres Mal mit einer anderen Hybridisierungssonde hybridisiert werden, war es notwendig, die radioaktive DNA-Sonde zu entfernen. Dazu wurde der Filter 15 min in einer kochenden 0,1x SSC/1% SDS-Lösung inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert um sicherzustellen, daß durch die Waschprozedur die DNA-Probe vollständig entfernt wurde.

2.2.2.7 cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)

0,5 bis 5 µg Gesamt-RNA oder 1 µg Poly(A)⁺-RNA und 125 pmol Random Primer d(N)₆ wurden in 8,5 µl H₂O_{bidest} für 10 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Zur RNA wurden 4 µl 5x Reverse Transkriptions-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂; 375 mM KCl), 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl dNTP-Stocklösung (je 2,5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 0,5 µl Rnasin (10 U) hinzugegeben. Die cDNA-Synthese wurde dann mit Zugabe von 1 µl SuperScriptTM Reverse Transkriptase (200 Units/µl) gestartet. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C für 1 h. Nach der Erststrangsynthese wurde der Ansatz mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. cDNA-Kontrollreaktionen wurden parallel in identischen Ansätzen, jedoch ohne Zugabe von Reverser Transkriptase ausgeführt.

2.2.3 DNA-Präparation

2.2.3.1 Plasmidpräparation im Minimaßstab

Von einer dichtgewachsenen 2 ml Bakterienkultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 5 min mit 5000x g sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lysozymbilösung (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris; pH 8,0; 2mg/ml Lysozym) resuspendiert und anschließend mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden dann 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,8 zugegeben und abermals vorsichtig gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min in der Kühlzentrifuge bei 10000x g zentrifugiert. In diesem Schritt werden die Zellmembranen und die genomische DNA der Bakterien sedimentiert, die Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol wurde die Plasmid-DNA 30 min auf Eis gefällt und anschließend durch Zentrifugation (10 min bei 4°C und 10000x g) pelletiert. Die DNA wurde

zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde die Plasmid-DNA in 50 μ l H₂O aufgenommen.

2.2.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Qiagen-Methode)

Für die Präparation großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden Ionenaustauschersäulen der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation folgte in allen Schritten dem von Qiagen empfohlenen Protokoll: Bakterien einer 200 ml ü.N.-Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Die Bakterien wurden anschließend in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNaseA) resuspendiert und mit weiteren 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) lysiert. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurde die Bakteriensuspension durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M KaAcetat) neutralisiert und das Gemisch bei 4°C und 20000x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde dann auf eine mit Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Ethanol; 0,1% Triton X-100) äquilibrierte Qiagensäule gegeben. Nach Adsorption der DNA an die Säulenmatrix wurde die DNA zweimal mit 10 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 7,0) gewaschen und dann mit 5ml Puffer QF (1,2 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 8,0) eluiert. Nach einer Isopropanolfällung wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in sterilem H₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

2.2.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1-2% Agarose-TAE-Gele verwendet. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer (20 mM Tris Base; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,3) durch Erhitzen gelöst, anschließend mit Ethidiumbromid (f.c. 1 μ g/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und fotografiert.

2.2.3.4 Gelreinigung von DNA-Fragmenten

Die Präparation von DNA-Fragmenten nach vorhergehender Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese wurde mit Hilfe eines DNA-Isolations-Kits (BioZym) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die doppelsträngige DNA wurde dabei nach Aufschmelzen der Agarose bei 55°C für 10 min bei RT an eine Silicamatrix gebunden. Nach zwei anschließenden Waschschritten wurde die DNA mit 20 μ l H₂O eluiert.

2.2.3.5 DNA-Transfer auf Membranen

Nach Ablauf der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 15 min unter leichtem Schütteln in 0,4 N NaOH denaturiert. Der Blot der RT-PCR-Produkte wurde nach der Methode von Southern (1975) für den Kapillartransfer aufgebaut. Der Transfer wurde mit 0,4 N NaOH ü.N. bei RT durchgeführt. Als Hybridisierungsmembranen wurden dafür Hybond Nylon N⁺-Filter verwendet. Der alkalische Transfer denaturiert die DNA und fixiert sie

zugleich kovalent an die Nylonmembran. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2x SSC für 30 min neutralisiert, wobei die 2x SSC-Lösung zweimal gewechselt wurde.

2.2.3.6 Hybridisierung von DNA-Blots

Die Nylon-Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre plaziert und je nach Größe mit 10-20 ml Church-Puffer (0,5 M NaPO₄, pH 7,2; 7% SDS) für 1 bis 2 h bei 65°C im Hybridisierungsofen (Bachofer, Reutlingen) vorhybridisiert. Der Church-Puffer wurde anschließend verworfen und 5 bis 8 ml frische Hybridisierungslösung zugegeben. Pro ml Hybridisierungslösung wurden dann 2-5x 10⁶ cpm hitzedenaturierter, radioaktiv markierter DNA-Probe zugefügt und ü.N. bei 65°C inkubiert. Der Filter wurde danach mehrere Stunden in 1xSSC/1% SDS-Lösung gewaschen, wobei die Waschlösung mehrfach gewechselt wurde. Zuletzt wurde der Filter in Folie eingeschweißt und das Ergebnis der Hybridisierung durch Autoradiographie dokumentiert.

2.2.3.7 Radioaktive Markierung von DNA

Für Hybridisierungen der DNA- und RNA-Blots wurden DNA-Proben nach dem "Random-primed-Oligolabelling"-Verfahren (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung der DNA-Proben erfolgte mit dem Random Primer Labelling Kit (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte mit Nucltrap Probe-Aufreinigungssäulen (Stratagene, Heidelberg). Vor der Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Probe zur Hybridisierungslösung wurden die DNA-Probe 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.3.8 PCR-Amplifikation bekannter cDNA-Sequenzen

4-16 µl einer Erststrangreaktion (siehe cDNA-Synthese) oder 1-5 ng Plasmid-DNA wurden mit je 20 pmol der sequenzspezifischen 3'- und 5'-Oligonukleotide in 1x PCR-Puffer, 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 2,5 Units *Taq*-DNA-Polymerase (5 Units/µl) in einer 50 µl Reaktion amplifiziert. Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Thermozykler (Gene Amp PCR System 9600 oder Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer) mit 20 bis 35 Zyklen und folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung :	30-60 sec bei 94°C
Hybridisierung der spezifischen Primer :	30-60 sec bei 55-65°C
DNA-Synthese :	1-2 min bei 72°C

Nach dem Ende der Reaktion wurden 20 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.3.9 solCD44 cDNA-Klonierung und basenspezifische Mutagenese (Punktmutagenese)

Eine lösliche CD44s cDNA, die aus den Exons 1-5, 15-16 und einem TGA-Stopcodon nach Position 804 von humanem CD44s bestand, wurde in die KpnI und EcoRV-Restriktionsstellen des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3 kloniert. Die basenspezifischen Punktmutationen, die in die solCD44s cDNA eingeführt wurden, wurden mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenese-Kit (Stratagene) durchgeführt. Dabei wurden mit 20 ng des Plasmides, das die nicht mutierte solCD44s cDNA enthielt, und mit Hilfe von spezifischen, die gewünschten Basenaustausche enthaltenden Oligonukleotiden, durch PCR (16 Zyklen; Denaturierung für 30 sec bei 94°C, Hybridisierung für 1 min bei 55°C und Neusynthese mit *Pfu* DNA-Polymerase für 14 min bei 68°C) cDNAs synthetisiert, die die gewünschten Mutationen enthielten. Dies führte für die solCD44sR41A-Mutante zur Translation eines Alanin anstatt eines Arginin an Aminosäureposition 41, für die solCD44sR150A/R154A-Doppelmutante zur Translation eines Alanin anstatt eines Arginin an den Aminosäurepositionen 150 und 154 von CD44 (Screaton *et al.*, 1992). Die PCR-Reaktion wurde danach mit 1 U DpnI inkubiert, um den nicht mutierten Ausgangsvektor zu verdauen. Epicurian Coli XL1-blue superkompetente Bakterien wurden danach mit 1 µl der PCR-Reaktion transformiert. Die transformierte Plasmid-DNA wurde sowohl mit Restriktionsenzymen wie auch durch DNA-Sequenzierung auf korrekte Orientierung und Einführung der gewünschten Mutation analysiert.

2.2.3.10 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Dafür wurde das Thermo-Sequenase DNA-Sequenzierungssystem von Amersham Life Science verwendet. Ein direkter Einbau des jeweiligen [α -³³P]ddNTPs wurde während der Synthesereaktion durchgeführt. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Durch die Verwendung der Thermo Sequenase DNA Polymerase, die thermostabil ist, Dideoxynukleotide einbauen kann und keine Exonukleaseaktivität besitzt, ist eine Sequenzreaktion im PCR-Verfahren mit sehr geringen DNA-Mengen möglich geworden.

2.2.3.11 Ligation von DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden das DNA-Plasmid und das Insert mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. In einem Ligationsansatz wurden dann in einem Reaktionsvolumen von 10 µl 100 ng Plasmid-DNA mit 300 bis 500 ng DNA-Fragment in 1x Ligasepuffer (20 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT) in Anwesenheit von 1 Unit T4-DNA-Ligase bei 15°C ü.N. inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes transformiert. Zur Klonierung PCR-amplifizierter DNA-Fragmente wurde der TA-Cloning-Kit der Firma Invitrogen verwendet, bei dem eine Eigenschaft der *Taq* DNA-Polymerase ausgenutzt wird, an jedem 3'-Ende eines synthetisierten DNA-Stranges ein Adenin anzuhängen. Durch die Verwendung vorgeschchnittener Vektoren mit Thymidinüberhängen ist eine Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe der T4-DNA-Ligase sehr effizient durchführbar.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Proteinisolierung aus Zellen

Adhärenente Zellen (ca. 5×10^7) wurden mit PBS ($-\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (0,5% (v/v) NP-40 in PBS; 2 mM PMSF) für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde danach für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand als Zelllysate bei -20°C aliquotiert.

2.2.4.2 Auftrennung von Proteinlysaten in Membran- und Cytoplasmafraktionen

5×10^8 Zellen wurden geerntet und in 6 ml kaltem, isotonischem HEPES-Puffer (1 mM MgCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 20 mM HEPES, pH 8,1; 0,11 M NaCl) aufgenommen. Nach Zentrifugation (1000 rpm für 5 min bei 4°C) wurden die Zellen in 4,5 ml kaltem, hypotonischem HEPES-Puffer (1 mM MgCl_2 ; 0,5 mM CaCl_2 ; 1 mM DTT; 20 mM HEPES, pH 8,1) aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis mit einem Dounce-Homogenisator (20x drücken) lysiert. Das Lysat wurde danach bei 1500 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei $250000 \times g$ für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand (=cytoplasmatische Proteinfraction) vorsichtig abgenommen, das Pellet (=Membranproteinfraction) wurde in 500 μl hypotonischem HEPES-Puffer aufgenommen. Nach einer Proteinbestimmung wurden gleiche Proteinmengen auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) und Western-Transfer

Die Proteingele wurden nach dem Protokoll von Laemmli gegossen. Es wurden Gele mit den Größen 16x 22 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentrationen im Trenngel variierten entsprechend der Versuchsansätze zwischen 7,5-15%. Es wurde eine Stammlösung mit 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) N',N' -Methylenbisacrylamid verwendet. Des weiteren setzte sich das Trenngel aus 375 mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,025% TEMED zusammen. Das Sammelgel bestand aus 5% Acrylamid; 125 mM Tris, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,025% TEMED. Nach der Polymerisation des Gels wurde die Gelapparatur zusammgebaut und mit Laemmli-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3) überschichtet. Die Proben wurden in die freigelassenen Taschen des Geles geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei RT mit einer Stromstärke von 25-35 mA. Nach Beendigung des Laufs wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt oder auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde 1 min mit 100% Methanol aktiviert und in H_2O hydriert. Das Proteingel wurde mit Transferpuffer (25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 10% Methanol) äquilibriert und auf die PVDF-Membran aufgelegt. Gel und Membran wurden dann zwischen sechs Lagen, in Transferpuffer getränktem 3MM-Papier montiert. Dieser "Sandwich"-Aufbau wurde zwischen zwei Nylonschwämmen in der mit

Transferpuffer aufgefüllten Transferkammer (Bio Rad) fixiert. Der Transfer erfolgte gewöhnlich mit einer Stromstärke von 260 mA ü.N. bei 4°C.

2.2.4.4 Antikörperinkubation

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit TBS (25 mM Tris; 125 mM NaCl, pH 8,1) gespült. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (4-5% fettfreiem Magermilchpulver in TBS; 0,5% Tween) für 1-3 h abgesättigt. Anschließend wurde der Blot zusammen mit 6 ml Blockierungspuffer und dem Primärantikörper in eine Plastikhülle verschweißt und 1-3 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Polyklonale Antiseren wurden gewöhnlich in einer Verdünnung von 1:500, monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml bzw. entsprechend den Angaben des Herstellers in Blockierungspuffer eingesetzt. Überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 6 min mit TBS-T-Milchpulver entfernt. Die Hybridisierung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:300 in Blockierungspuffer) erfolgte analog zur Inkubation des Primärantikörpers für 30 min bis 1 h. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit Blockierungspuffer entfernt. Anschließend wurde der Blot noch mehrmals in TBS gewaschen. Antikörperspezifische Signale wurden durch ECL-Detektion sichtbar gemacht.

2.2.4.5 Immunhistochemie

Nach zuvoriger Zustimmung wurden von Patienten mit der Diagnose eines primären malignen Melanoms (n=6), eines metastasierenden malignen Melanoms (n=5) oder gutartiger melanozytärer Nävi (n=7) Stanzbiopsien entnommen, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Fixierte Schnitte wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen panCD44-Epitope (LEU44) und ICAM-1 (84H10) sowie mit einem polyklonalen Kaninchen anti-hu RHAMM/IHABP-Serum inkubiert. Eine Färbung mit einem Kaninchen-Kontrollserum diente als Kontrolle. Die sekundäre Färbung wurde mit dem LSAB-Kit von DAKO durchgeführt und die Färbungen wurden mit dem Zeiss Axioskop analysiert und fotografiert.

2.2.4.6 Durchflußzytometrie (FACS)

Adhärente Zellen (ca 10^5 Zellen/Ansatz) wurden mit 2 mM EDTA in PBS (-Mg/Ca) von Zellkulturschalen abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS (-Mg/Ca) aufgenommen. Danach wurden die Zellen mit 2 bis 10 µg/ml Primärantikörper für 45 min auf Eis inkubiert. Das polyklonale Kaninchen anti-hu RHAMM/IHABP Serum wurde für diese Färbungen 1:10 verdünnt eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem isotypspezifischen, FITC-markierten Sekundärantikörper (2 µg/ml) für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und im FACS (FACScan; Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Analyse erfolgte mit der CellQuest Software von Becton Dickinson. Für einige Versuche wurden die Zellen vor der Primärantikörperinkubation mit dem Fix&Perm Kit (Dianova,

Hamburg) permeabilisiert, um die intracytoplasmatische Lokalisierung von Proteinen zu untersuchen.

2.2.4.7 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation von CD44 aus [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein markierten Zelllysaten und Kulturüberständen

5x 10⁵ Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und ü.N. in RPMI 1640 + 10% FCS kultiviert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für 1 h bei 37°C in 2 ml cRPMI gehungert. Die Zellen wurden dann 1x mit PBS gewaschen und für 15 min bei 37°C mit 1 ml 0,25% Trypsin behandelt, um CD44-Moleküle von der Oberfläche abzuspalten. Das Trypsin wurde dann mit 1 ml cRPMI blockiert, die Zellen in 8 ml PBS aufgenommen und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml cRPMI auf neue Platten ausgesät und mit 750 µCi L-[³⁵S]-Methionin/Cystein pro Kulturschale für 24-48 h markiert. Der Zellkulturüberstand wurde danach gesammelt und 2x bei 14000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert um Zelltrümmer aus dem Überstand zu entfernen. Dann wurde der Überstand 1:1 mit RIPA verdünnt und es wurde 2 mM PMSF zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis mit 1 ml RIPA + 2 mM PMSF lysiert, das Lysat mit einem Gummizellschaber von der Platte gekratzt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit einer 21-ger Kanüle und Spritze etwa 10x auf und ab gezogen, um die genomische DNA zu scheren. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurden jeweils 900 µl des Lysats und des Überstandes mit 100 µl Protein A/G-Sepharose ü.N. bei 4°C mit einem Überkoprotator inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an die Protein A/G-Sepharose zu minimieren. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm bei 4°C für 3 min wurden das Lysat und der Überstand je nach Anzahl der Antikörperpräzipitationen aufgeteilt. Das Volumen wurde mit RIPA-Puffer auf 900 µl gebracht, der anti-panCD44 monoklonale Antikörper Hermes 3 (5 µg/ml) oder als Kontrolle kein Antikörper zugegeben. Nach Zugabe von 50 µl Protein A/G-Sepharose wurde das Gemisch für 2 h bei 4°C über Kopf rotiert, danach abzentrifugiert und das Pellet 5x mit RIPA-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 50 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, gekocht, nochmals zentrifugiert und der Überstand einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde danach mit DMSO gewaschen, mit dem Szintillator PPO (22% in DMSO) inkubiert, mehrfach mit H₂O gewaschen, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

2.2.4.8 Aufreinigung und Konzentrierung von löslichem CD44 aus Zellkulturüberständen

Lösliches CD44 aus Zellkulturüberständen wurde mit HiTrapTM-Affinitätssäulen (Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt. Dazu wurden 48h Kulturüberstände der Zelllinien MV3 ü.N. über eine mit 1 mg/ml anti-CD44 (BU52) kovalent (1 mg in 1 ml Bindungspuffer: 0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl, pH 8,3) beladene, NHS-aktivierte, HiTrap-Affinitätssäule gegeben und mit 3 ml 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,8 eluiert. Das Eluat wurde neutralisiert, gegen PBS dialysiert und im Western Blot sowie mit ELISA-Bestimmungen nachgewiesen und quantifiziert. In einer

weiteren Reihe von Ankonzentrierungen wurden konditionierte, 48 h Kulturüberstände mehrfach in einer Centriprep-3 Säule (Amicon, Beverly, USA) bei 3000x g für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Der CD44 depletierte Überstand wurde dabei ebenso gesammelt wie das lösliche CD44-Konzentrat. Die Proben wurden im Western Blot analysiert, mit einem ELISA quantifiziert und danach bei -20°C gelagert.

Immunpräzipitation von CD44 aus ankonzentrierten Zellkulturüberständen

25 µl eines auf 10 µg/ml solCD44 ankonzentrierten Zellkulturüberstandes wurden mit RIPA-Puffer auf 900 µl verdünnt und mit 100 µl Protein A/G-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert um unspezifische Bindung zu vermeiden. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 min bei 4°C wurden zu 950 µl des Überstandes 5 µg/ml des Ratte anti-Maus panCD44 monoklonalen Antikörpers IM7 gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50 µl der Protein A/G-Sepharose zugegeben und ü.N. bei 4°C im Überkopffrotator inkubiert. Danach wurde die Reaktion für 3 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet 3x mit RIPA-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 µl 2x Laemmli aufgenommen, für 3 min bei 95°C gekocht, nochmals zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAA-Gel geladen.

2.2.5 Arbeiten mit Bakterienkulturen

2.2.5.1 Präparation elektrokompetenter Bakterien (Dower *et al.*, 1988)

300 ml SOB wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von E.coli DH5α oder E.coli NM522 angeimpft und bei 18-20°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4-0,5 inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden sie für 3 min bei 37°C in einem Wasserbad wärmebehandelt und anschließend für 20 min weiter inkubiert. Die Bakterienlösung wurde dann auf vorgekühlte 50 ml-Reaktionsgefäße verteilt, mit 3500x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in 50 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Dann folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Waschschrift wurde noch dreimal wiederholt, wobei mit jeder Resuspendierung die Pellets gepoolt wurden. Zum Abschluß wurde das gesamte Pellet in 800 µl eisgekühlten Wassers suspendiert, mit 7% (v/v) DMSO versetzt, auf 40 µl-Aliquots verteilt und mit Flüssigstickstoff schockgefroren.

2.2.5.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

1-2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 40 µl aufgetauten, kompetenten Bakterien pipettiert, vorsichtig gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Das DNA-Zell-Gemisch wurde in eine Küvette transferiert und diese in einem Küvettenhalter des E.coli-Pulsers (Bio-Rad) plaziert. Unverzöglich wurde der Impuls (1,8 kV/cm) ausgelöst. Die Küvette wurde aus dem E.coli-Pulser entnommen und sofort mit 1 ml SOC (SOB-Medium + 20 mM Glukose) aufgefüllt. Für die phänotypische Expression des Resistenzmarkergens auf dem Plasmid wurden die

Bakterien 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf einer Agarplatte ausgestrichen, die 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker enthielten.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Kultivierung von MM-Zelllinien

Die MM-Zelllinien wurden in MM-Medium kultiviert, mit 2 mM EDTA, pH 8,0 für 5 min bei 37°C von den Kulturschalen gelöst, danach mit MM-Medium neutralisiert und bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte durch langsames Abkühlen auf -80°C in Einfrierboxen mit 90% FCS + 10% DMSO. Für die Proliferationsexperimente wurden die Zellen für 24 h in RPMI + 1% FCS gehalten, bevor sie auf 96-Lochplatten ausgesät wurden.

2.2.6.2 Stabile Transfektion von MM-Zelllinien durch Elektroporation

40 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung gereinigt und in 10 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Für die Elektroporation wurden 5x 10⁶ MM-Zellen pro Ansatz je nach Zelllinie in 500 µl PBS ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen oder MM-Medium aufgenommen, in Elektroporationsküvetten mit einem Durchmesser von 0,4 cm (BioRad, München) überführt und für 5 min mit der Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen mit dem Gene-Pulser (BioRad, München) bei 250 V und 960 µFa elektroporiert, sofort mit 1 ml MM-Medium versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen ü.N. auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 2 mM EDTA, pH 8,0 gelöst und in MM-Medium, das den Selektionsmarker G418 (1000 µg/ml) enthielt, 1:5 auf neue 10 cm Kulturschalen verteilt. Nach etwa zehn Tagen wurden einzelne Klone isoliert und auf Synthese der transfizierten cDNA überprüft. Die Transfektionseffizienz wurde durch Testtransfektionen von 20 µg eines β-Galaktosidase-Gens und einem anschließenden β-Gal-Nachweis kontrolliert.

2.2.6.3 β-Galaktosidase-Färbung von Zellkulturen

Die Zellen auf einer 10 cm Kulturschale wurden 1x mit PBS gewaschen und dann für 10 min bei RT mit 6 ml einer Fixierungslösung (2% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd in PBS) inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, bevor 5 ml der Färbelösung (50 µl 400 mM K₃[Fe(CN)₆]; 50 µl K₄[Fe(CN)₆]x 3H₂O; 50 µl 200 mM MgCl₂; 250 µl 20 mg/ml X-Gal; 4,6 ml PBS) zugegeben wurden. Die Platten wurden danach für 0,5-2 h bei 37°C inkubiert und die [%]-Transfektionseffizienz (Anzahl der blauen Zellen x 100/Gesamtzahl der Zellen) unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.6.4 Präparation und Isolierung primärer Melanozyten und Keratinozyten aus menschlicher Haut

Menschliche Hautproben, die uns freundlicherweise von der chirurgischen Universitätsklinik Freiburg zur Verfügung gestellt wurden, wurden zum Transport in HBSS ohne Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen aufbewahrt. Mit Schere und Pinzette wurden große Teile des Fettgewebes und der Dermis von der Epidermis abgetrennt. Die Epidermis wurde danach in kleine, etwa 1 cm^2 große Stücke geschnitten, die ü.N. bei 4°C mit der Oberfläche nach oben auf 14 ml einer 1:250 (w/v) Trypsinlösung (ohne EDTA; Seromed Biochrom, Berlin) gelegt wurden. Danach wurde die dünne Epidermisschicht mit zwei Pinzetten von der Dermis abgezogen und wurde zur Inaktivierung des Trypsins in 10 ml MM-Medium gelegt. Mit einer $15\text{ g} \times 1\frac{1}{2}$ Kanüle und Spritze wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die noch zusätzlich über ein Zellsieb (Falcon, Heidelberg) in ein 50 ml Röhrchen filtriert wurde. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C wurden die Zellen in 10 ml Melanozyten- oder Keratinozyten-Selektionsmedium aufgenommen und auf Kollagen I beschichtete 10 cm Schalen (Falcon, Heidelberg) ausgesät. Die so gewonnenen Zellen wurden für zwei Passagen angereichert und nach Analyse des Reinheitsgrades durch Oberflächenfärbungen von Markerproteinen bis zur fünften Passage für Versuche eingesetzt.

2.2.6.5 Isolierung und Ausreifung von Dendritischen Zellen (DC)

Nach einer 1:1 Verdünnung einer Blutkonserve mit PBS wurden 30 ml des verdünnten Blutes zunächst auf 15 ml endotoxinfreiem Ficoll-Gradient (Pharmacia, Freiburg) gegeben und für 30 min mit 1400 rpm bei RT zentrifugiert (langsam abbremmen). Die Interphase des Gradienten wurde vorsichtig angenommen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die Erythrozyten wurden mit einem salzhaltigem Puffer für 1 min lysiert und die verbleibenden Zellen wurden nach einem weiteren Waschschriff mit PBS in 2,8 ml PBS aufgenommen. Die PBMCs wurden dann mit 50 μl eines anti-CD14 monoklonalen Antikörpers (erkennt ein 55 kDa Antigen auf Monozyten, Immunotech SA, Marseille) für 45 min bei 4°C inkubiert. Nach 1x waschen in PBS wurden die Zellen in 1,9 ml MACS-Puffer aufgenommen und mit 60 μl eines mit magnetischen Kügelchen gekoppelten Ziege anti-m IgG (H+L) Antikörpers für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die MACS-Apparatur wurde inzwischen unter einer Sterilwerkbank aufgebaut, eine vorgekühlte VS^+ -MACS-Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und die Zellen wurden über einen MACS-Zellfilter auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule mehrfach mit MACS-Puffer gewaschen. Bei diesem Schritt bleiben die $CD14^+$ -Zellen über die magnetische Anziehung in der Säule hängen. Die positiv selektierten Zellen wurden nach Aufhebung des magnetischen Feldes mit MACS-Puffer eluiert. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die $CD14^+$ -Zellen auf etwa 2×10^6 / 2 ml DC-Medium eingestellt und auf 6-Lochplatten verteilt. Ein Aliquot der Zellen wurde mit anti-CD14 angefärbt, um die Reinheit der Zellpopulation zu überprüfen. Nach 6 Tagen, mit Mediumwechsel nach 2 Tagen bzw. 4 Tagen, sowie einer Stimulation der DC-Reifung nach 4 Tagen mit LPS, wurden die ausgereiften dendritischen Zellen für die "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR) verwendet.

2.2.6.6 Aufreinigung von CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten aus peripherem Blut

Die bei der positiven MACS-Selektion der CD14⁺-Zellen durch die Säule durchgelaufenen PBMCs wurden mit PBS/5% FCS gewaschen und 30-50x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml PBS/ 5% FCS resuspendiert. Dann wurden die Zellen für die negative Selektion mit 1 ml eines anti-HLA-DR, -DQ (erkennt MHC-Klasse II-Antigen auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten) und 1 ml eines anti-CD11b Hybridomüberstandes (erkennt den C3bi Komplementrezeptor auf NK-Lymphozyten und Granulozyten) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C, wurden die Zellen 2x mit 10 ml PBS/5% FCS gewaschen und dann mit 2,0 ml an magnetische Kügelchen gekoppelte Schaf anti-m IgG-Dynabeads (Dynal, Hamburg) für 45 min bei 4°C inkubiert. Vor der Zugabe zu den Zellen müssen die Kügelchen 2x mit PBS/5% FCS gewaschen und für 3 min im Magnetständer vom Überstand getrennt werden. Danach werden sie in 2 ml PBS/5% FCS aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Die Anzahl der magnetischen Teilchen (4x 10⁸/ml) soll dabei etwa 10 pro Zelle entsprechen. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 3 min in den Magnetständer gegeben und der Überstand mit den CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphocyten wird abgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in T-Zellmedium aufgenommen, die Zellen wurden gezählt und mit Doppelfärbungen (anti-CD3-FITC/anti-HLA-DR-PE oder anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE, Becton Dickinson) zur Überprüfung der Reinheit im FACS analysiert.

2.2.7 Funktionelle Testsysteme

2.2.7.1 HA-Bindungsversuche

HA-Bindungsversuche an immobilisierte, an Plastik gebundene Hyaluronsäure

96-Lochplatten (Greiner, Frickenhausen) wurden mit Hyaluronsäure (1 mg/ml in NaHCO₃-Puffer; pH 9,6) oder BSA (1% (w/v) in NaHCO₃-Puffer) ü.N. bei 4°C vorbehandelt. Gleichzeitig wurden die verwendeten Zellen mit 1 µCi [³H]-Thymidin pro ml Medium markiert. Die 96-Lochplatten wurden dann mehrfach mit PBS gewaschen und für 1 h bei 37°C mit einer 1% (w/v) BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für die Blockierungsexperimente mit löslichen CD44-Präparationen wurden die Platten für 2 h bei 4°C mit jeweils 10 µg/ml löslichem CD44 vorinkubiert. Im Falle der Antikörper-Blockierungsversuche wurden 5x 10⁴ vormarkierte Zellen pro Plattenvertiefung mit den jeweiligen Antikörpern (10 µg/ml für 45 min bei 4°C) vorinkubiert, bevor die Zellen auf die zuvor nochmals 3x gewaschenen Platten ausgesät wurden. Nach einer Adhäsionszeit von 30-45 Minuten bei 4°C wurden die Platten mehrfach mit PBS gespült und alle nicht adhärenen Zellen abgenommen. Die adhärenen Zellen wurden anschließend mit einem Zell-Harvester (Canberra Packard, Dreieich) geerntet und die eingebaute Radioaktivität mit einem β-Counter (Top-Count, Canberra Packard, Dreieich) gezählt. Als Kontrolle wurde die unspezifische Adhäsion an BSA wie auch die Adhäsion an Hyaluronidase (10 U/ml für 30 min bei 4°C) behandelte Platten gemessen. Der prozentuale Anteil der Zellbindung wurde als Zerfälle/min

adhärenter Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der gemessenen Zerfälle/min aller 5×10^4 eingesetzter Zellen (=100%) gemessen.

HA-Bindungsexperimente mit FITC-markierter, löslicher Hyaluronsäure

Für die HA-Bindungsversuche mit FITC-markierter Hyaluronsäure wurde Hyaluronsäure nach dem Protokoll von de Belder und Wik (de Belder und Wik, 1975) vormarkiert. Dazu wurden 0,2 g Hahnenkamm-Hyaluronsäure in 40 ml Formamid für 24-48 h unter ständigem Schütteln gelöst. Nach Zugabe einer 50 ml DMSO-Lösung, die 0,1 g NaHCO_3 , 0,1 g Dibutylzinn-Dilaurat und 0,3 g FITC enthielt, wurde das Reaktionsgemisch für 30 min in einem Dampfbad inkubiert. Das Gemisch wurde nun in 2 Liter 100 % Ethanol (+ ein paar Tropfen 5 M NaCl) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und die fädige Hyaluronsäure wurde noch etwa $5 \times$ in kleineren Volumina 100 % Ethanol gewaschen, bis das nicht gebundene FITC aus der Lösung herausgewaschen worden war. Die gereinigte HA-FITC wurde dann im Vakuumtrockner getrocknet und die Konzentration nach Gewichtsbestimmung auf 1 mg/ml in PBS eingestellt. Für den Versuch wurden 5×10^4 Zellen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ HA-FITC für 30 min bei 4°C inkubiert, danach 2x mit PBS gewaschen und mit dem FACScan analysiert. Für die Antikörper-Blockierungsexperimente wurden die Zellen für 45 min bei 4°C mit den jeweiligen Antikörpern (20 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Die Vorblockierung von HA-FITC erfolgte mit 20 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigtem löslichen CD44.

2.2.7.2 HA-Detektionstest

Die Sekretion von Hyaluronsäure in den Zellkulturüberstand von MM-Zelllinien wurde mit einem HA-Test (Pharmacia, Uppsala) gemessen. 48 h Zellkulturüberstände von 1×10^6 Melanomzellen wurden mit einem [^{125}I]-markierten hyaluronsäurebindenden Protein (HABP) inkubiert. Nicht gebundenes [^{125}I]-HABP wurde dann mit HA-Sepharose komplexiert, zentrifugiert und gewaschen. Danach wurde die γ -Strahlung gemessen. Dieser Meßwert wurde dann invers zur sekretierten HA-Menge in den Überständen korreliert.

2.2.7.3 Proliferationsversuche

96-Lochplatten (Falcon, Heidelberg) wurden ü.N. mit verschiedenen Konzentrationen hitzeinaktivierter (20 min bei 100°C) Hyaluronsäure (in NaHCO_3 -Puffer, pH 9,6) vorinkubiert. Die Platten wurden danach 3x mit PBS gewaschen. 2500 Zellen/Plattenvertiefung wurden ausgesät und nach 2 h mit 1 μCi [^3H]-Thymidin/Plattenvertiefung für 48 h gepulst. Für die Proliferationsversuche mit monoklonalen Antikörpern wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Azid-freien Antikörpern für 45 min bei 4°C vorinkubiert und dann ausgesät. Nach 24 h wurden weitere 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper zugegeben, bevor die Zellen dann nach insgesamt 48 h geerntet wurden. Nach dem Ernten der Zellen wurde der [^3H]-Thymidineinbau in die DNA der Melanomzellen mit einem β -Strahlungsmeßgerät bestimmt (TopCount, Canberra Packard).

2.2.7.4 "Mixed-Lymphocyte"-Reaktion (MLR)

Sechs Tage ausdifferenzierte dendritische Zellen und frisch isolierte CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten von denselben oder verschiedenen Spendern (autologe oder allogene Reaktion) wurden im Verhältnis 1:10 und 1:20 in 96-Lochplatten mit Rundböden (Costar, Bodenheim) vermischt. Die Antigenpräsentation wurde in der autologen MLR mit Tetanus-Toxin (4 µg/ml) induziert. Zu Beginn der Reaktion wurden monoklonale Antikörper (10 µg/ml), MM-Kulturüberstände (300 ng/ml) oder aufgereinigte lösliche Fusionsproteine (5 µg/ml) zupipettiert, um den Einfluß von CD44 und löslichem CD44 auf die T-Zellproliferation zu untersuchen. Nach 4-6 Tagen wurden die Zellen mit 1 µCi [³H]-Thymidin/Plattenvertiefung für 24 h markiert, die Zellen danach geerntet und die eingebaute Radioaktivität gemessen.

2.2.7.5 Tierexperimentelle Methoden

Je 5x 10⁶ mycoplasmenfreie MM-Zellen (in 100 µl PBS, ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen) wurden subkutan in 5 MF1 Nacktmäuse pro Gruppe injiziert. Die Tiere wurden täglich begutachtet, das Tumorwachstum wurde jeden zweiten Tag gemessen. Ab Tag 28 wurden die Mäuse je nach Tumorlast getötet, verschiedene Organe und Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie später mit histochemischen Färbungen von Schnitten nach Mikrometastasen untersuchen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in unterschiedlichen Stadien des malignen Melanoms

3.1.1 Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP *in vivo*

Die Proteinsynthese von CD44s und ICAM-1 ist während der Progression des malignen Melanoms stark hochreguliert (Dietrich *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1989). Über die RHAMM/IHABP-Expression in der Entwicklung des malignen Melanoms ist dagegen noch nichts bekannt. Die Proteinexpression der Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM/IHABP sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wurde daher zunächst auf Gewebeschnitten von Patienten mit einem primären malignen Melanom (PMM) oder einem metastasierenden malignen Melanom (MMM) durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Zum Vergleich wurden Gewebeschnitte von gutartigen, melanozytären Nävi (BMN), die als Vorläuferläsionen des malignen Melanoms betrachtet werden können, mit in die Analyse einbezogen (Abb. 4: BMN, PMM, MMM). Die Schnitte der verschiedenen Stadien des malignen Melanoms wurden mit einem Antikörper gegen panCD44 (LEU44) inkubiert, der ein Epitop von CD44 erkennt, das in allen Isoformen von CD44 auftritt (Abb. 4: α CD44). Die Proteinexpression von ICAM-1 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes ICAM-1 (84H10) (Abb. 4: α ICAM-1), die Detektion von RHAMM/IHABP mit einem polyklonalen Kaninchen anti-human RHAMM/IHABP-Serum durchgeführt (Assmann *et al.*, 1998; Abb. 4: α RHAMM/IHABP). Zur Kontrolle wurden die Schnitte mit Isotyp-Kontrollantikörpern (nicht gezeigt) und einem irrelevanten Kaninchen-Serum angefärbt (Abb. 4: Kontrolle). PanCD44-Epitope sind in Nävuszellen von BMN-Schnitten und in den darüberliegenden Keratinozyten der Epidermis exprimiert (Abb. 4: α CD44-Färbung von BMN). Ein Anstieg der CD44-Expression kann auf der Oberfläche von Melanomzellen von MM-Primärtumoren (Abb. 4: α CD44-Färbung eines PMM) und in Tumorzellen kutaner MM-Metastasen (Abb. 4: α CD44-Färbung einer MMM) beobachtet werden. Eine gegenüber Nävuszellen (Abb. 4: α ICAM-1-Färbung eines BMN) stark erhöhte Proteinexpression von ICAM-1 wurde in Melanom- und Endothelzellen von primären Melanomen (Abb. 4: α ICAM-1-Färbung eines PMM) und Schnitten von MM-Metastasen (Abb. 4: α ICAM-1-Färbung einer MM-Metastase) gefunden. Die Proteinexpression von RHAMM/IHABP ist ebenfalls in Tumorzellen von primären Melanomen und MM-Metastasen sowie den intratumoralen Gefäßen stark erhöht (Abb. 4: α RHAMM/IHABP auf PMM und MMM). Nävuszellen zeigten dagegen nur eine schwache Immunreaktivität auf das anti-RHAMM/IHABP-Serum, während die Keratinozyten der normalen Epidermis schwach positiv gefärbt wurden (Abb. 4: α RHAMM/IHABP auf PMM und MMM). Das Kaninchen-Kontrollserum zeigte dagegen keine Immunreaktivität auf den analysierten Gewebeschnitten (Abb. 4: Kontrolle).

Melanozytäre Nävuszellen, primäre Melanomzellen und metastasierende Melanomzellen können als wichtige Stadien der Melanomentwicklung betrachtet werden. Der Prozeß der

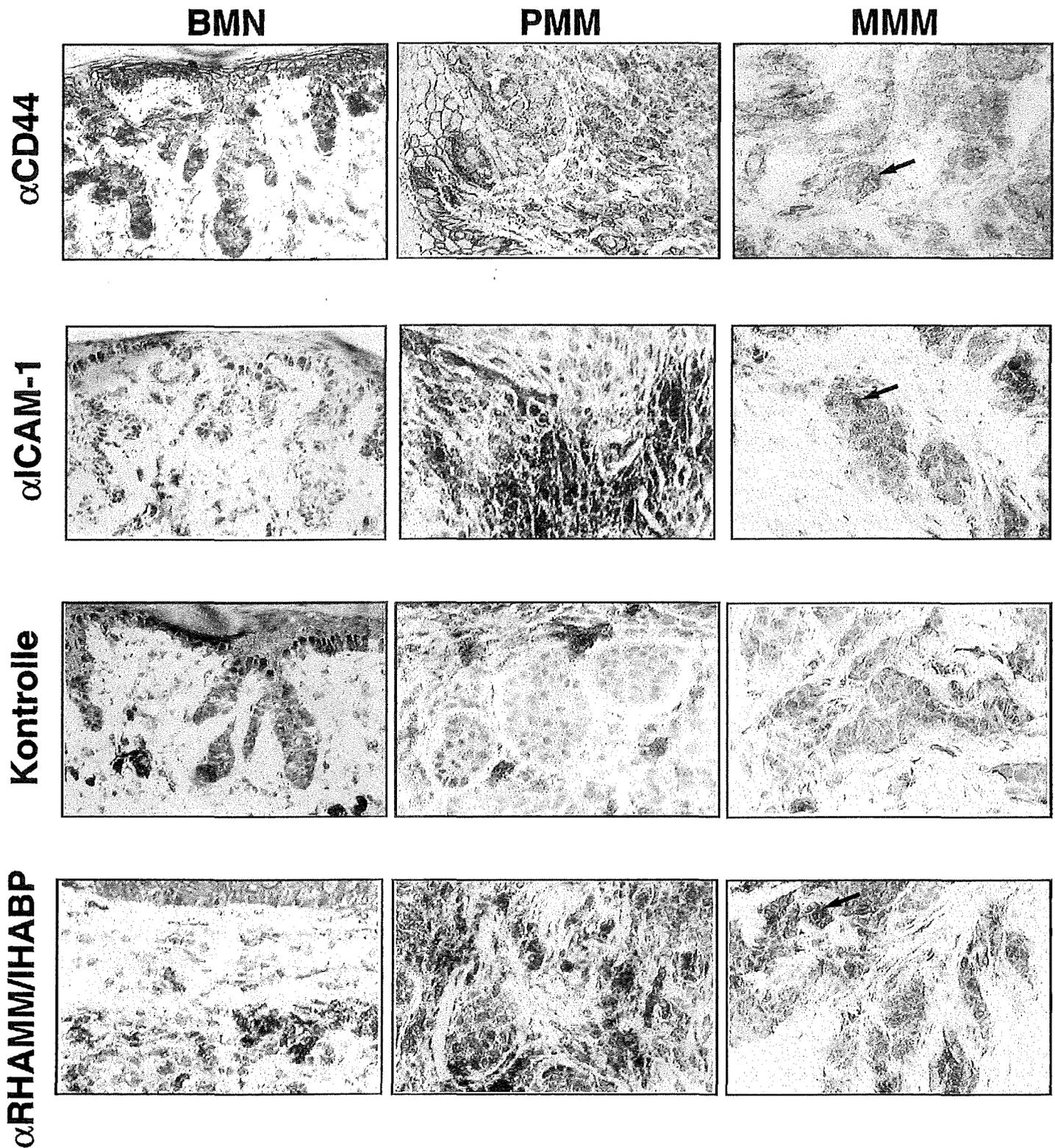


Abb. 4. Erhöhte Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in verschiedenen Stadien des malignen Melanoms. Stanzbiopsien von Patienten mit einem primären malignen Melanom (PMM, n=6) oder einem metastasierenden malignen Melanom (MMM, n=5) wurden am Tag der Operation entnommen. Ebenso wurden Gewebeproben von gutartigen, melanozytären Nävi (BMN, n=7), die als Vorläuferläsionen des malignen Melanoms betrachtet werden können, entnommen. Von allen Proben wurden Gewebeschnitte angefertigt, die mit Antikörpern gegen panCD44 (α CD44), ICAM-1 (α ICAM-1), einem anti-human RHAMM/IHABP-Serum oder einem Kaninchen-Kontrollserum inkubiert wurden. Die Sekundärfärbungen wurden mit dem LSAB-Kit (DAKO) durchgeführt. Die Pfeile zeigen für die jeweiligen Antigene positiv angefärbte Melanomzellen.

Transformation von melanozytären Zellen zu malignen Melanomzellen könnte aufgrund der *in vivo* Befunde in Abb. 4 mit einer erhöhten Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in primären Melanomen und in metastasierenden Melanomen korreliert sein.

3.1.2 Transkriptionsrate von CD44s, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in humanen MM-Zelllinien und primären Melanozyten

Die Färbungen von Gewebeschnitten legen nahe, daß eine erhöhte Expression der HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM/IHABP sowie von ICAM-1 mit der Entwicklung des malignen Melanoms einhergeht. In humanen MM-Zelllinien, die durch ihr unterschiedliches metastatisches Potential gekennzeichnet sind (Van Muijen *et al.*, 1995), und gesunden, aus Haut präparierten primären Melanozyten, die als die Ausgangszellen von malignen Melanomzellen betrachtet werden können, versuchten wir den *in vivo* erhaltenen Befund auf Transkriptionsebene zu bestätigen. Total-RNA, die aus sechs Melanomzelllinien, vier primären Melanozytenkulturen und einer primären Keratinozytenkultur isoliert worden war, wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und nacheinander mit [³²P]-markierten DNA-Sonden hybridisiert, die spezifisch für CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP waren (Abb. 5). CD44 wird von allen untersuchten Melanomlinien (Abb. 5: CD44; Spuren 1-6), den primären Melanozytenkulturen (Abb. 5: CD44; Spuren 6-10) und den Keratinozyten (Abb. 5: CD44; Spur 11) exprimiert. Die CD44-Transkription ist jedoch in den Zelllinien MV3, HT144 und 1F6 (Abb. 5: CD44; Spuren 1-3) im Vergleich zu den MM-Zelllinien MM1, SB1 und SB3 (Abb. 5: CD44; Spuren 4-6) und den primären Melanozytenkulturen Mel1 P4, Mel2 P5, Mel3 P3 und Mel5 P5 (Abb. 5: CD44; Spuren 7-10) stark erhöht. Die erhöhte CD44 RNA-Expression der Zelllinie MV3 ist insofern bemerkenswert, weil für diese Zelllinie ein hohes Metastasierungspotential beschrieben worden war (Van Muijen *et al.*, 1995). In unseren eigenen Experimenten, bei denen die MM-Zelllinien MV3, HT144, MM1 und SB3 subkutan in Nacktmäuse injiziert worden waren, konnten wir Unterschiede im Tumorwachstum der einzelnen Zelllinien feststellen. Die Zelllinien MV3 und HT144 zeigten in diesen Versuchen ein schnelleres Tumorwachstum als die MM-Zelllinien MM1 und SB3 (Daten nicht gezeigt).

Für ICAM-1 wurde in allen MM-Zellen eine starke RNA-Expression detektiert (Abb. 5: ICAM-1; Spuren 1-6). In den primären Melanozytenkulturen wurde im Unterschied dazu nur eine geringe ICAM-1-Transkription gefunden (Abb. 5: ICAM-1; Spuren 7-10). Die Expression von RHAMM/IHABP war in allen Melanomlinien (Abb. 5: RHAMM/IHABP; Spuren 1-6) gegenüber Melanozyten und Keratinozyten deutlich erhöht, in denen keine (Abb. 5: RHAMM/IHABP; Spuren 7-8) oder nur geringe RNA-Transkripte detektiert wurden (Abb. 5: RHAMM/IHABP; Spuren 9-11).

Die Northern Blot-Analyse von MM-Zelllinien und primären Melanozytenkulturen konnte die *in vivo* erhaltenen Befunde somit bestätigen.

3.1.3 Expression der varianten CD44-Isoform CD44v8-v10 in MM-Zelllinien

Die Expression und die Bedeutung von CD44-Isoformen in der Entwicklung des malignen Melanoms sind Bestandteil einiger Veröffentlichungen gewesen (Manten-Horst *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1996). Das Auftreten und eine mögliche Bedeutung von CD44-Spleißvarianten in

Ergebnisse

MM-Zelllinien und Melanozyten wurde daher zunächst mit RT-PCR-Experimenten unter Verwendung Exon-spezifischer Oligonukleotide von CD44 analysiert. Erststrang-cDNA, die aus Poly(A)⁺-RNA der MM-Zelllinien MV3, HT144, 1F6, MM1 SB1 und SB3 sowie der Basaliomzelllinie HaCat und einer Melanozyten-Primärkultur synthetisiert worden ist, wurde

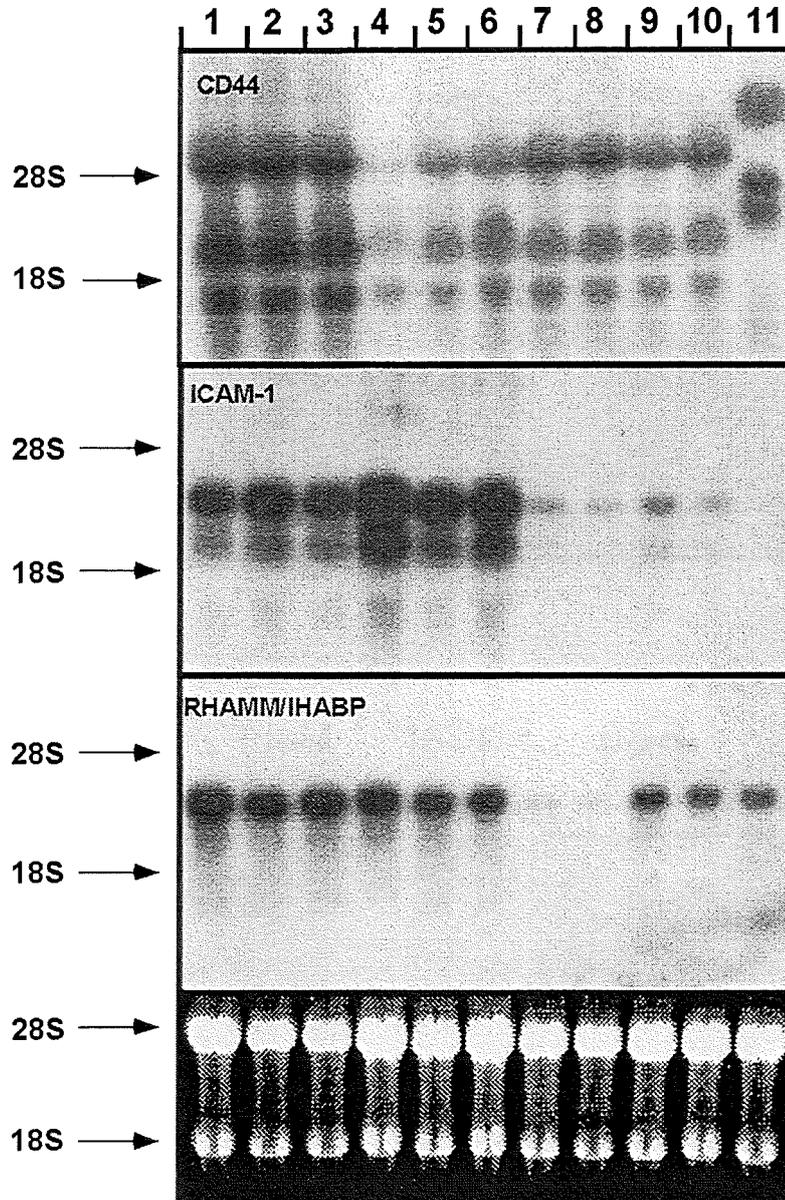


Abb. 5. RNA-Expression von CD44s, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in humanen Melanomzelllinien und primären Melanozyten- und Keratinozytenkulturen. 15 µg Total-RNA aus sechs Melanomzelllinien, vier primären Melanozyten- sowie einer primären Keratinozytenkultur wurden auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen, auf eine Nylon N⁺-Membran übertragen und nacheinander mit [³²P]-markierten, für CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP spezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Als Kontrolle für das gleichmäßige Auftragen der RNA-Proben ist ein unter UV-Licht fotografiertes Bild des RNA-Gels mit den markanten 28S- bzw. 18S-rRNA-Spezies gezeigt. Spuren 1-6 bezeichnen die Zelllinien MV3, HT144, 1F6, MM1, SB1 und SB3; In den Spuren 7-10 sind die primären Melanozytenpräparationen Mel1 P4, Mel2 P5, Mel3 P3 und Mel5 P5, in Spur 11 wurde eine primäre Keratinozytenkultur P1 aufgetragen.

Ergebnisse

mit einem für das Exon 4 und das Exon 14 (v10) von CD44 spezifischen Oligonukleotidpaar durch PCR amplifiziert (Abb. 6). Um eine semiquantitative Aussage der Expression von CD44-Isoformen zu erhalten, wurden in die PCR-Reaktion 8 bzw. 16 μ l der Erststrang-cDNA eingesetzt. Als Kontrolle für die Reinheit der Ausgangs-RNA wurden PCR-Reaktionen mit Kontrollen durchgeführt, bei denen keine Synthese einer Erststrang-cDNA durchgeführt wurde. Diese Kontrolle weist somit Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA nach.

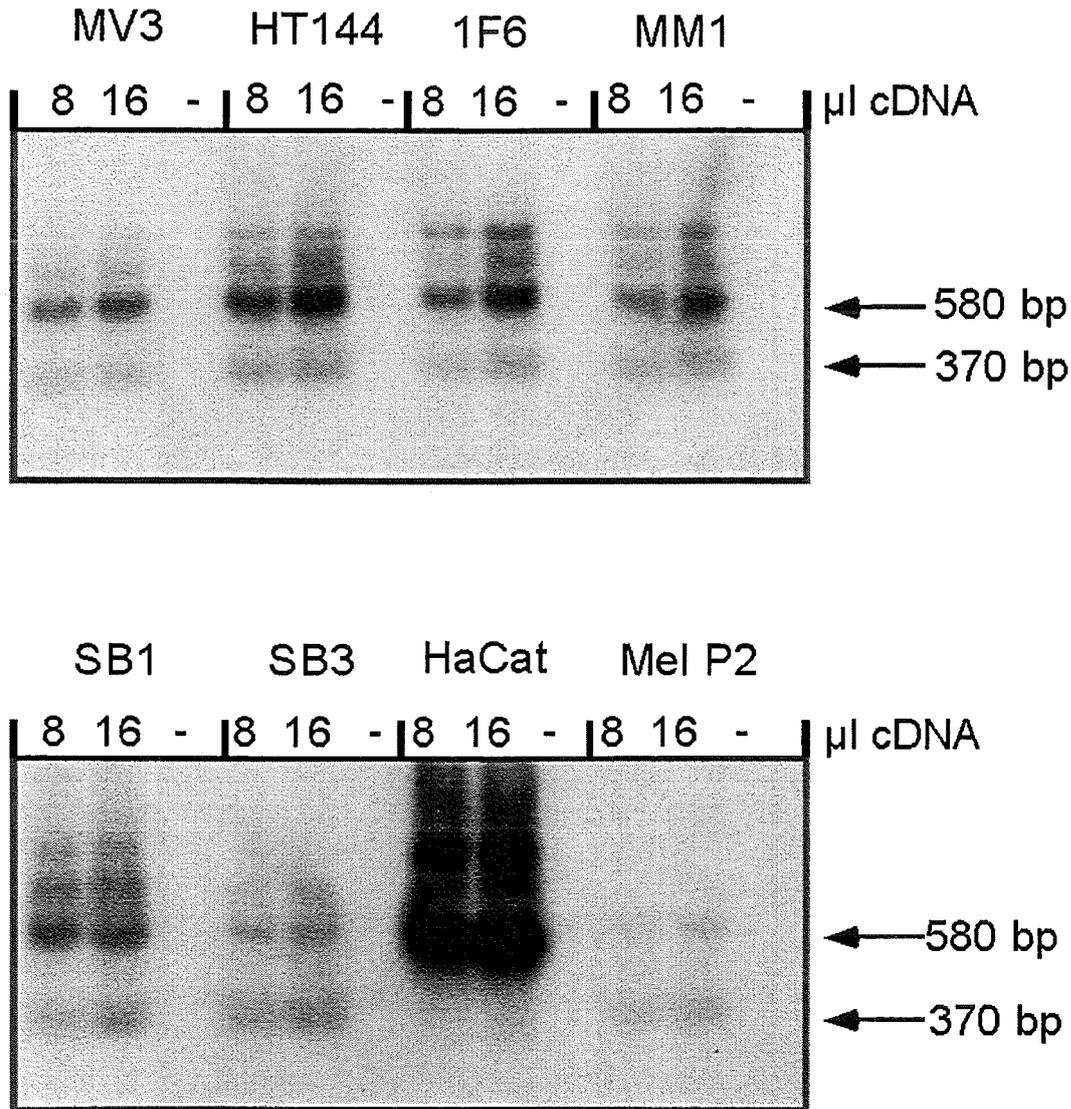


Abb. 6. Melanomzelllinien exprimieren Spleißvarianten von CD44, die die alternativen Exons 12, 13 oder 14 (v8, v9 oder v10) enthalten. Durch reverse Transkription von 1 μ g Poly(A)⁺-RNA der MM-Zelllinien MV3, HT144, 1F6, MM1, SB1 und SB3 sowie von Poly(A)⁺-RNA der Basaliomzelllinie HaCat und einer primären Melanozytenkultur (Mel P2) wurde Erststrang-cDNA synthetisiert. 8 bzw. 16 μ l dieser Erststrang-cDNA wurden mit Oligonukleotiden, die für die CD44-Exons 4 und 14 (v10) spezifisch waren, in einer PCR-Reaktion amplifiziert (94°C für 30 sek, 55°C für 1 min, 72°C für 1 min; 30 Zyklen). Mit (-) wurden die PCR-Reaktionen von Kontrollen bezeichnet, bei denen keine Reverse Transkriptase zur cDNA-Synthesereaktion zugegeben worden waren. Diese Kontrollen dienen vor allem der Detektion genomischer Verunreinigungen in der RNA-Präparation. Die PCR-Produkte wurden nach der Methode von Southern auf eine Membran transferiert und mit einer für die varianten CD44-Exons 12-14 (v8-v10) spezifischen [³²P]-DNA-Sonde hybridisiert. Die Pfeile deuten die Größe der durch diese RT-PCR erhaltenen Hauptprodukte an. Das 580 bp-Fragment entspricht der CD44-Exonstruktur 4-5-12-13-14, das 370 bp-Fragment besteht aus den CD44-Exons 4-5-14.

Ergebnisse

Die PCR-Produkte wurden über ein 1,5% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer [³²P]dCTP markierten, für die CD44-Exons v8-v10 spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Dies wurde aufgrund von Beobachtungen *in vivo* durchgeführt, wo eine Expression von CD44v7/8- und CD44v10-Epitopen in Gewebeproben von MM-Patienten gefunden worden war (Simon *et al.*, 1996). Alle Zelllinien exprimieren CD44-Isoformen mit Anteilen der CD44-Exons 12-14 (Abb. 6). HaCat Zellen, die die Isoform CD44v3-v10 exprimieren, sind als Kontrolle gezeigt (Abb. 6: HaCat). Die RT-PCR-Experimente führten vor allem zur Amplifikation eines 580 bp- und eines 370 bp-Produktes in MM-Zellen (Abb. 6: MV3, HT144, 1F6, MM1, SB1 und SB3). Diese wurden in Melanozyten nur sehr schwach exprimiert (Abb. 6: Mel P2). Durch Subklonierung und Sequenzierung der DNA-Fragmente konnte die CD44-Exonstruktur dieser 580 bp- und 370 bp-Produkte bestimmt werden. Das 580 bp-Fragment besteht aus den CD44-Exons 4-5-12-13-14, das 370 bp-Fragment aus den CD44-Exons 4-5-14. Zusätzlich wurden neben den beiden Hauptprodukten der RT-PCR noch größere, geringer exprimierte CD44-Isoformen amplifiziert, die auf eine schwache Expression weiterer varianter CD44-Exons hindeuten (Abb. 6).

In allen MM-Zelllinien, dagegen nur schwach in primären Melanozyten, konnte die Expression von CD44-Isoformen nachgewiesen werden, in denen die alternativ gespleißten Exons v8, v9 oder v10 enthalten waren. Eine Korrelation der Expression dieser varianter CD44-Exons mit dem unterschiedlichen metastatischen Potential der MM-Zelllinien konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Um eine Aussage über das Vorkommen von alternativen CD44-Isoformen im Vergleich zur Expression der Standardform von CD44 zu erhalten, wurden weitere RT-PCR-Experimente mit CD44-Oligonukleotidpaaren durchgeführt, die für Exonsequenzen konstanter sowie auch varianter Exons von CD44 spezifisch sind (Abb. 7A und 7B). Bei Verwendung von PCR-Primern, die für DNA-Sequenzen der konstanten CD44-Exons 4 und 19 spezifisch sind, wurde in RT-PCR-Reaktionen von RNA der MM-Zelllinien MV3 und HT144 sowie primärer Melanozyten lediglich ein Transkript amplifiziert, das für die Standardform von CD44 mit der Exonstruktur 4-5-15-16-17-19 kodiert (Abb. 7A: 4-19). Eine PCR mit einer zweiten Oligonukleotid-Kombination, bei der die verwendeten Oligonukleotide Sequenzen der konstanten CD44-Exons 4 und 17 flankierten, führte zur Amplifikation einer cDNA, die ebenfalls nur Sequenzen der Standardform von CD44 enthielt (Abb. 7B: 4-17). Mit diesen Oligonukleotid-Kombinationen konnten somit in MM-Zellen und Melanozyten keine varianter Exons nachgewiesen werden, was bei einer gewissen Häufigkeit von mRNA-Spezies mit alternativ gespleißten, varianter CD44-Exons zu erwarten wäre. So zeigte die Amplifikation der cDNA von HaCat Zellen, die variante CD44-Isoformen exprimieren, ein Bandenmuster, das das Auftreten von mRNA-Spezies mit varianter CD44-Exons beweist (Abb. 7A: 4-19; HaCat und Abb. 7B: 4-17; HaCat). Die Häufigkeit von mRNA-Spezies, die variante Exons von CD44 enthalten, ist somit in den untersuchten MM-Zellen und Melanozyten im Vergleich zu der Standardform sehr viel geringer.

Die PCR-Methode ist sensitiv genug um auch eine geringe Expression varianter Exons nachweisen zu können, wenn dabei Oligonukleotide verwendet werden, die spezifisch für variante Exonsequenzen von CD44 sind (Abb. 6; Abb. 7A und 7B). Eine PCR-Reaktion, bei der spezifische Oligonukleotide für Exon 14 (v10) und Exon 19 eingesetzt wurden, ergab in allen untersuchten Zellen die Detektion einer das Exon v10 enthaltenden Spleißvariante von CD44 mit der Exonstruktur 14-15-16-17-19 (Abb. 7A: 14-19). Bei Verwendung die Exons 14

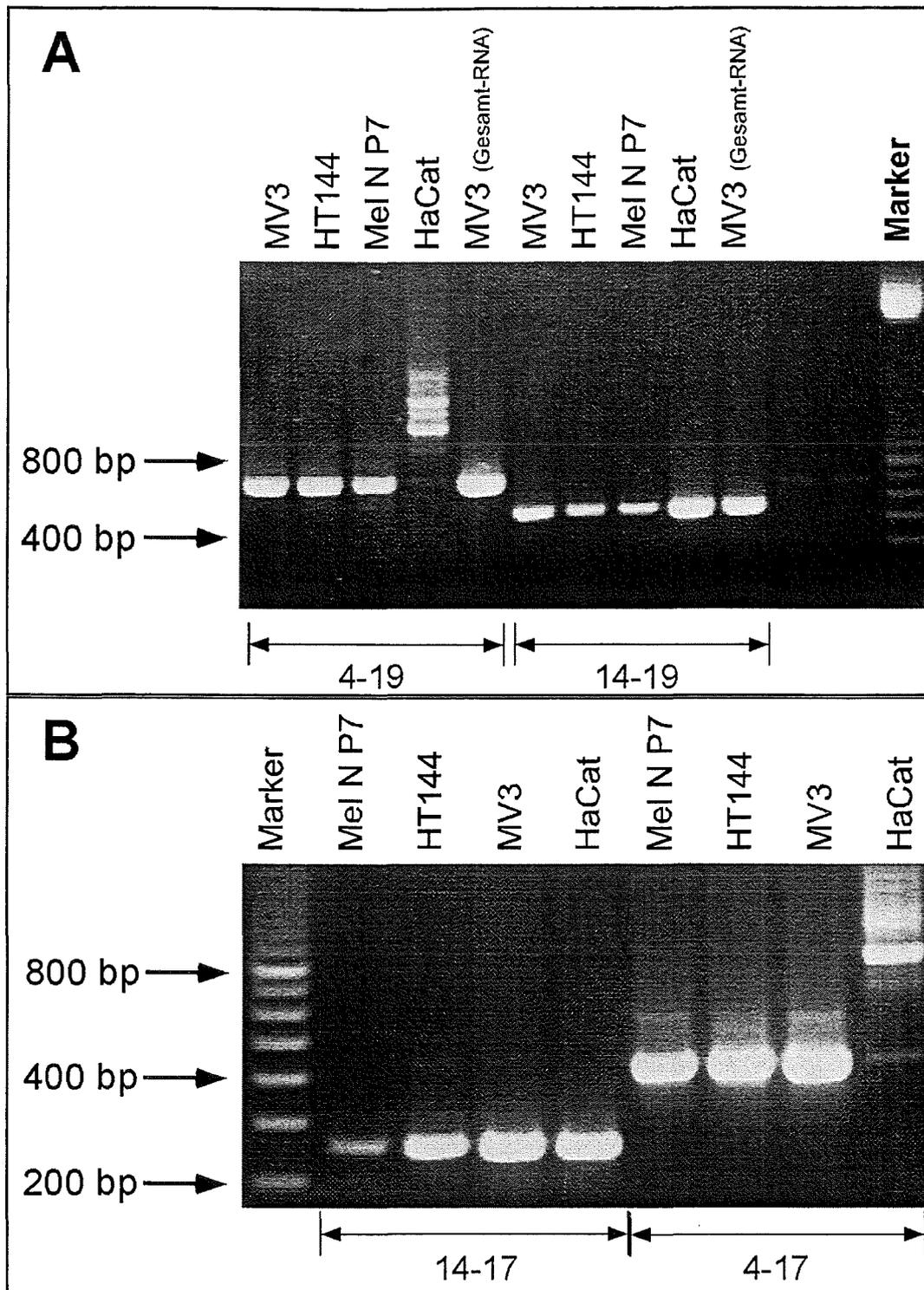


Abb. 7. RT-PCR-Experiment mit CD44-spezifischen Oligonukleotiden zur Detektion zusätzlicher alternativer Spleißvarianten von CD44. 1 µg Poly(A)⁺-RNA der MM-Zelllinien HT144, MV3, der Basaliomzelllinie HaCat, einer primären Melanozytenkultur (MeIN P7) sowie zum Vergleich 5 µg Total-RNA von MV3-Zellen (A) wurden durch reverse Transkription in Erststrang-cDNA umgeschrieben. 10 µl dieser cDNA wurden mit den unter den Fotos angegebenen, für CD44-Exons spezifischen Oligonukleotidpaaren in PCR-Reaktionen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden danach elektrophoretisch aufgetrennt. In A wurde die cDNA mit Oligonukleotidpaaren amplifiziert, die spezifisch Sequenzen der CD44-Exons 4 und 19 (4-19) bzw. 14 und 19 (14-19) binden. In B wurden Oligonukleotidpaare für die PCR benutzt, die spezifisch cDNA Sequenzen in den CD44-Exons 14 und 17 (14-17) sowie 4 und 17 (4-17) erkennen.

(v10) und 17 flankierender Oligonukleotide wurde eine Exon v10 enthaltende Spleißvariante von CD44 mit der Exonstruktur 14-15-16-17 amplifiziert (Abb. 7B: 14-17). Zusätzliche Spleißformen von CD44, die neue Spleißvorgänge der hnRNA von CD44 darstellen könnten, wurden in diesen Experimenten nicht gefunden (Abb. 7A: 14-19 und Abb. 7B: 14-17). Diese Überlegung basiert auf der Vorstellung, daß durch alternatives Spleißen der CD44-hnRNA ein CD44-Transkript entsteht, das für eine lösliche, nicht membrangebundene CD44-Isoform kodieren könnte. Eine 3'-RACE-Reaktion mit einem 18 Basen langen Oligo(dT)₁₈-Primer und einem CD44-Exon 14 (v10) spezifischen Oligonukleotid konnte ebenfalls keine neue Spleißform von CD44 nachweisen, die für eine solche lösliche Form von CD44 kodieren könnte (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Nachweis der Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in MM-Zellen und Melanozyten

Die Oberflächenexpression von CD44, das CD44v9-Epitop enthaltenden Isoformen, ICAM-1 und RHAMM/IHABP wurde auf MM-Zellen und Melanozyten mittels FACS-Analysen untersucht. Primäre Melanozyten exprimieren auf der Zelloberfläche stark CD44 (Abb. 8A: α CD44). CD44v9-enthaltende Isoformen von CD44, die mit einem Antikörper gegen das humane CD44v9-Epitop nachgewiesen wurden (Mackay *et al.*, 1994), sind dagegen nur schwach auf der Oberfläche von Melanozyten exprimiert (Abb. 8A: α CD44v9). ICAM-1 ist ebenfalls nur schwach auf der Oberfläche von Melanozyten durch Antikörper nachweisbar (Abb. 8A: α ICAM-1). Inkubation von primären Melanozyten mit Antikörpern gegen die melanozytenspezifischen, intrazellulären Proteine S100 und MAA (HMB45) zeigen zur

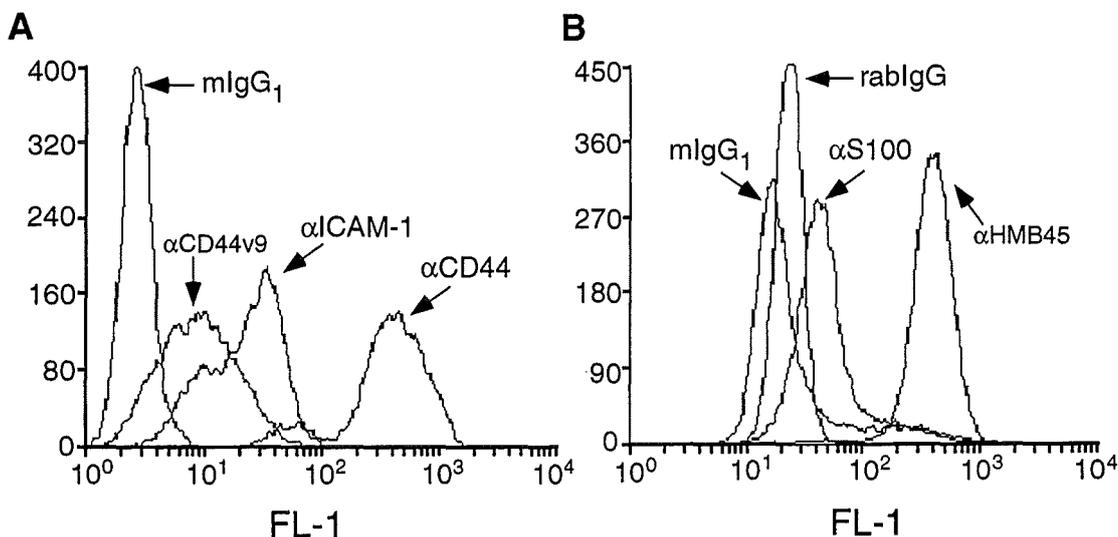


Abb. 8. FACS-Analyse einer primären Melanozytenkultur. A zeigt die Färbung von Melanozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44 (Klon BU75; α CD44), das CD44v9-Epitop enthaltende Isoformen (Klon FW11.24; α CD44v9) sowie ICAM-1 (Klon 84H10; α ICAM-1). In B sind als Kontrolle für die Melanozytenpräparation Färbungen mit Antikörpern gegen die intrazellulären, melanozytenspezifischen Proteine S100 (α S100) sowie MAA (α HMB45) gezeigt. Dafür wurden die Zellen vor der Färbung permeabilisiert. Als isotypspezifische Kontrollen wurden ein mIgG₁ und ein rabIgG eingesetzt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 μ g/ml eingesetzt. Die Sekundärfärbungen erfolgten mit FITC-markierten, sekundären anti-Maus IgG- bzw. anti-Kaninchen IgG-Antikörpern (2 μ g/ml). FL-1 bezeichnet die Fluoreszenzintensität, die Y-Achse die analysierte Zellzahl.

Kontrolle die Reinheit der aus menschlicher Haut isolierten und in Kultur genommenen Melanozyten (Abb. 8A: α S100 und α HMB45). Für die Oberflächenexpression von CD44, des CD44v9-Epitops, ICAM-1 und RHAMM/IHABP auf MM-Zellen sind exemplarisch FACS-Analysen der MM-Zelllinie 1F6 dargestellt (Abb. 9). Eine hohe CD44-Proteinexpression wurde auf der Zelloberfläche gefunden (Abb. 9A: α CD44). CD44v9-enthaltende Isoformen sind dagegen auf der Oberfläche von MM-Zellen nur schwach nachweisbar (Abb. 9A: α CD44v9). Die Proteinexpression von ICAM-1 ist wesentlich geringer als die Expression von CD44 (Abb. 9A: α ICAM-1). Im Gegensatz zu CD44 und ICAM-1 konnte RHAMM/IHABP nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 9B, ZM=Zellmembran). Nach Permeabilisierung der Zellen war jedoch ein intrazelluläres, spezifisches Signal für RHAMM/IHABP zu beobachten (Abb. 9B, Cyt=Cytoplasma).

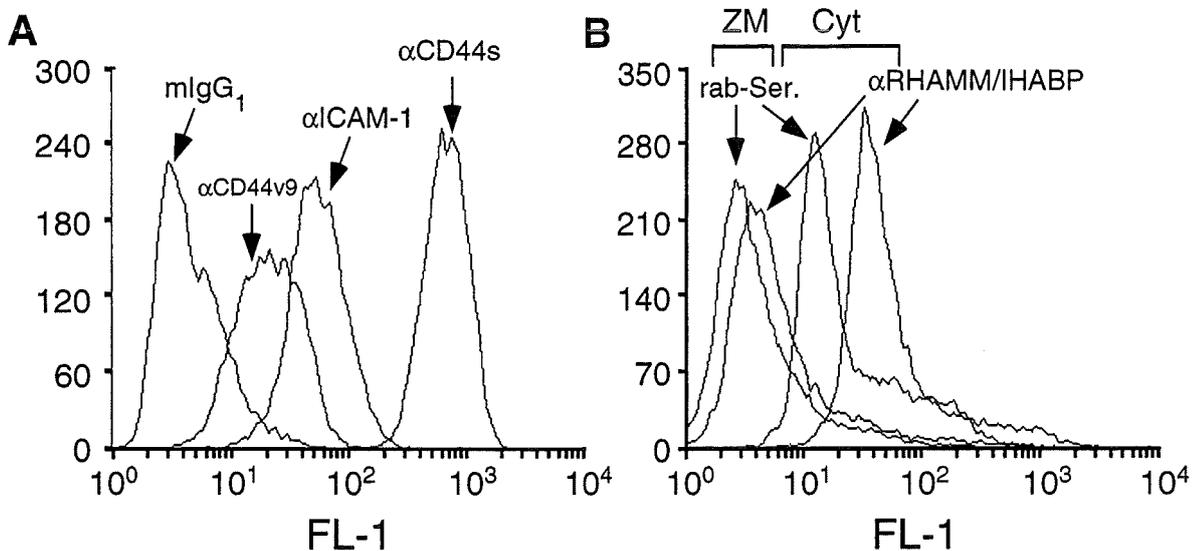


Abb. 9. FACS-Analyse der Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in der MM-Zelllinie 1F6. In A ist die Oberflächenfärbung von 1F6 Melanomzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44 (α CD44), gegen das CD44v9-Epitop (α CD44v9) sowie ICAM-1 (α ICAM-1) gezeigt. Als Isotypkontrolle wurde ein irrelevanter mIgG₁-Antikörper verwendet. In B ist die Färbung von 1F6 Zellen mit einem polyklonalen Kaninchen anti-hu RHAMM/IHABP-Serum (α RHAMM/IHABP) gezeigt. Mit ZM wurde dabei die Färbung der Zellmembran, mit Cyt ist die intrazelluläre, cytoplasmatische Färbung nach Permeabilisierung der Zellen bezeichnet. Das Präimmunserum des Kaninchens (rab-Ser.) diente als Kontrolle. Die Sekundärfärbungen erfolgten mit FITC-markierten anti-Maus IgG- bzw. anti-Kaninchen IgG-Antikörpern (2 μ g/ml). FL-1 bezeichnet die Fluoreszenzintensität, die Y-Achse die analysierte Zellzahl.

3.1.5 RHAMM/IHABP ist ein cytoplasmatisches Protein

Die FACS-Analysen von MM-Zellen hatten einen ersten Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisation von RHAMM/IHABP gegeben. Um diesen Befund zu erhärten, wurden Western Blot-Analysen von fraktionierten, subzellulären Zelllysaten von MM-Zelllinien durchgeführt. Gleiche Mengen der subzellulären Proteinfractionen der Zelllinie MV3 wurden mit SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit Antikörpern gegen CD44, I κ B sowie RHAMM/IHABP inkubiert (Abb. 10A). Die Reinheit der subzellulären Proteinfractionierung wurde zunächst mit einem α CD44- und einem α I κ B-Antikörper

mit einem Molekulargewicht von 85-90 kDa nachgewiesen (Abb. 10A: RHAMM/IHABP). Um das generelle Vorkommen und die exakte Proteingröße von RHAMM/IHABP in humanen Melanomlinien zu bestimmen, wurden Zelllysate von sechs Melanomzelllinien, (Abb. 10B: MV3, HT144, 1F6, MM1, SB1 und SB3), primären Melanozyten (Abb. 10B: Mel8 P4), zwei humanen Brustkrebszelllinien als Positivkontrollen (Abb. 10B: T47D und MCF7) und der Cervix-Karzinomzelllinie HeLa (Abb. 10B: HeLa) in einem Western Blot analysiert. In allen Proteinlysaten von MM-Zelllinien, nicht aber in Lysaten von primären Melanozyten konnte RHAMM/IHABP als 85-90 kDa großes Protein nachgewiesen werden (Abb. 10B). Die Brustkrebszelllinien T47D und MCF7 dienten dabei als Positivkontrollen (Assmann *et al.*, 1998). Das anti-RHAMM/IHABP-Serum erkannte in den Zelllinien auch kleinere Proteine mit Molekulargewichten von 72-76 kDa. Diese werden in den beiden Brustkrebszelllinien T47D und MCF7 nur sehr schwach exprimiert. In den Melanomlinien treten sie durchgehend auf, wobei die Menge dieser 72-76 kDa-Formen von RHAMM/IHABP in den beiden Zelllinien MV3 und HT144 stark erhöht ist. Diese Reaktivität des Antiserums kann durch Proteindegradation, aber auch durch Unterschiede in Glykosylierungsmustern oder alternatives Spleißen verursacht sein. Ein Versuch, mit RT-PCR aus RNA von Melanomzelllinien Spleißvarianten von RHAMM/IHABP zu isolieren, die für eine 72-76 kDa große Isoform von RHAMM/IHABP kodieren könnten, brachte kein Ergebnis. In RT-PCR-Experimenten konnte aus mRNA von Brustkarzinomzellen eine verkürzte Spleißvariante von RHAMM/IHABP amplifiziert werden, die für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 82 kDa kodieren könnte (Assmann *et al.*, 1998). Mit den dort benutzten für RHAMM/IHABP spezifischen Primern wurde in der mRNA der Melanomlinien MM1 und 1F6 zusätzlich zu einem 650 bp-Produkt ebenfalls ein kleineres 590 bp-Produkt entdeckt, das in den MM-Zelllinien MV3 und HT144 aber nicht vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

3.2 Funktionelle Aspekte der Oberflächenexpression von HA-Rezeptoren beim malignen Melanom

3.2.1 Hyaluronsäuresynthese von MM-Zellen

Hyaluronsäure kann durch Interaktion mit CD44 zu einer Steigerung der Proliferation von Zellen beitragen (Hamann *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 1997; Rafi *et al.*, 1997). Neben der erhöhten Proteinexpression von CD44 in der Entwicklung des Melanoms könnte durch Eigensynthese von Hyaluronsäure ein zusätzlicher stimulierender Effekt auf die Proliferation der Zellen erzielt werden. Daher wurde zunächst die endogene Hyaluronsäuresynthese von MM-Zellen gemessen (Abb. 11). Die Hyaluronsäurekonzentration wird bei diesem HA-RIA ("Radio Immunosorbent Assay"; Pharmacia, Uppsala) durch Inkubation der zu messenden Lösung mit einer bestimmten Menge eines [¹²⁵I]-markierten, HA-bindenden Proteins ([¹²⁵I]-HABP) bestimmt. Nicht gebundenes [¹²⁵I]-HABP wird dann mit HA-Sepharose komplexiert, präzipitiert und schließlich wird der durch Messung der γ -Strahlung bestimmte Anteil an präzipitiertem [¹²⁵I]-HABP invers korreliert zum Anteil, der in der ersten Inkubation Hyaluronsäure gebunden hatte. 1×10^6 MM-Zellen bzw. primäre Melanozyten (Abb. 11: Mel2 P6) sezernieren in einem Zeitraum von 48 h bis zu 600 ng/ml Hyaluronsäure in das Zellkulturmedium (Abb. 11: MV3). Bis auf die MM-Zelllinie SB3, deren Hyaluronsäureproduktion mit 30 ng/ml in etwa dem von primären Melanozyten entspricht,

Ergebnisse

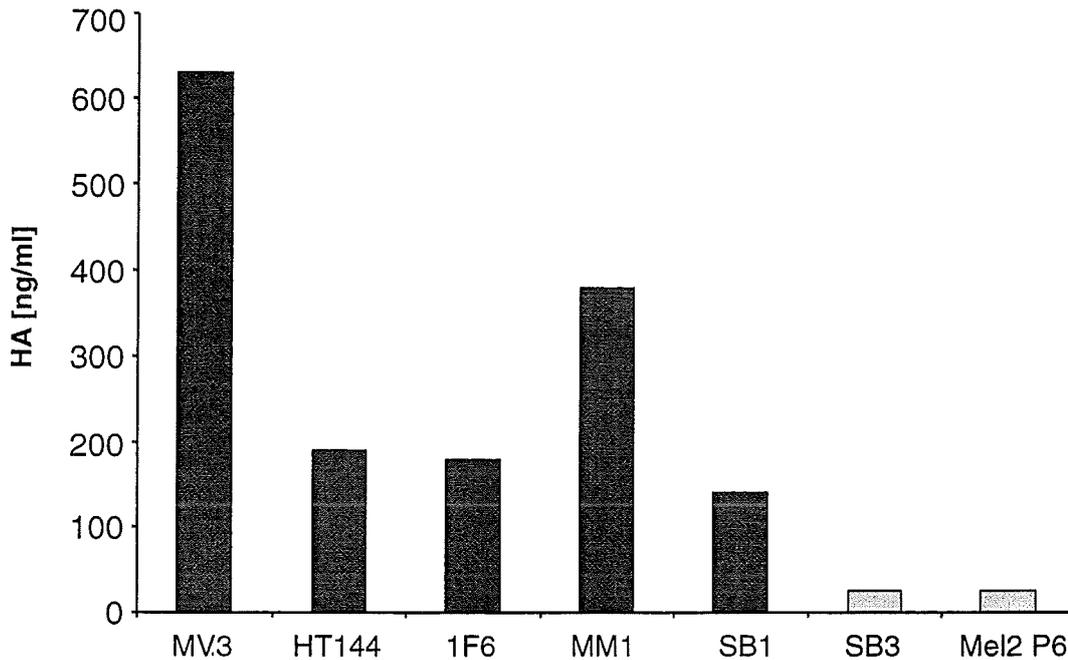


Abb. 11. Endogene Hyaluronsäuresynthese verschiedener MM-Zelllinien und primärer Melanozyten (Mel2 P6). 48 h Kulturüberstände von 1×10^6 Zellen wurden mit einem [125 I]-markierten HA-bindenden Protein (Pharmacia, Uppsala) inkubiert. Nicht gebundenes [125 I]-HABP wurde mit HA-Sepharose komplexiert. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die Menge des an HA-Sepharose gebundenen [125 I]-HABP durch Messung der γ -Strahlung bestimmt. Diese Meßwerte wurden dann invers zu den von MM-Zellen in die Zellkulturüberstände sekretierten Hyaluronsäurekonzentrationen korreliert.

zeigten alle anderen MM-Zelllinien eine höhere Sezernierung von Hyaluronsäure in das Kulturmedium (Abb. 11). Die MV3 Zelllinie ist als stark metastasierend beschrieben worden. Die HA-Synthese dieser Zelllinie war gegenüber den anderen untersuchten Zelllinien stark erhöht. Die Hyaluronsäuresynthese der MM-Zelllinie SB3, die als gering metastasierend gilt (Herlyn, persönliche Mitteilung), war in diesem Versuch fünffach geringer als die der SB1 MM-Zelllinie. Für die SB1 Zelllinie war nach Injektion in Nacktmäuse ein starkes Metastasierungspotential festgestellt worden (Herlyn, persönliche Mitteilung). Durch RT-PCR-Experimente konnte diese Syntheseleistung auch auf RNA-Ebene mit der Expression der humanen HA-Synthase II (Watanabe und Yamaguchi, 1996) korreliert werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu der erhöhten Expression von CD44 durch Melanomzellen ist somit in Melanomzellen auch eine erhöhte Synthese von Hyaluronsäure nachweisbar.

3.2.2 CD44 vermittelt die Bindung von löslicher Hyaluronsäure an MM-Zellen

Nachdem die Zunahme der Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in unterschiedlichen Entwicklungsstufen des malignen Melanoms *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte, sollte der Beitrag dieser Rezeptoren für die Interaktion von Melanomzellen mit Hyaluronsäure bestimmt werden. Der Einfluß von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP auf die HA-Bindungsfähigkeit von MM-Zellen kann dabei auf verschiedene Weise bestimmt werden. Eine Form der HA-Bindungsexperimente macht sich FITC-markierte, lösliche Hyaluronsäure zunutze. Die HA-Bindung durch Zellen kann dann durch FACS-Analyse fluorimetrisch gemessen werden (Abb. 12: HA-FITC). Abb. 12 zeigt

einen solchen Versuch für die Zelllinien MV3 (Abb. 12A) und HT144 (Abb. 12B). Die Bindung der Zellen an FITC-markierte Hyaluronsäure konnte in diesen Versuchen durch Vorinkubation der Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44 (BU75 und MEM85) um etwa 60-70% inhibiert werden (Abb. 12: α CD44). Diese beiden monoklonalen Antikörper

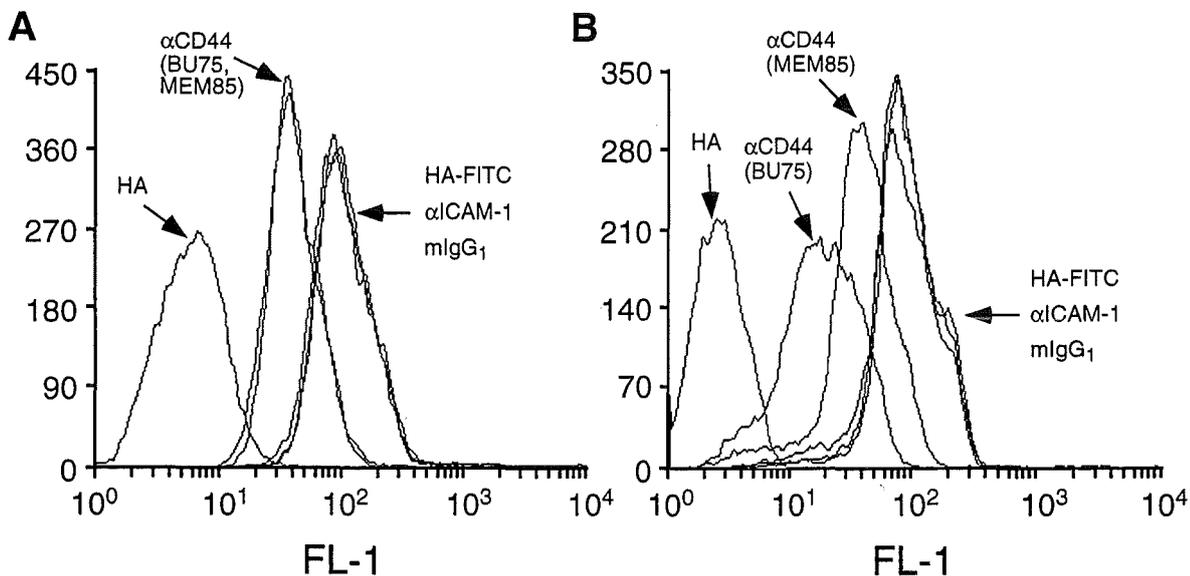


Abb. 12. Blockierung der Bindung FITC-markierter, löslicher Hyaluronsäure an MM-Zellen durch Antikörper gegen CD44. In A ist die Bindung von FITC-markierter Hyaluronsäure (HA-FITC) an MV3 Zellen gezeigt. Für die Blockierung der Hyaluronsäurebindung wurden die Zellen vor der Zugabe von HA-FITC mit Antikörpern gegen CD44 (α CD44), ICAM-1 (α ICAM-1) oder einem Maus-IgG₁-Kontrollantikörper (mIgG₁) inkubiert (alle mit 20 μ g/ml eingesetzt). Als Negativkontrolle diente die Eigenfluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit unmarkierter HA (HA). Abb. B zeigt die HA-FITC Bindung der MM-Zelllinie HT144. FL-1 bezeichnet die Fluoreszenzintensität, die Y-Achse die analysierte Zellzahl.

interferieren mit der Hyaluronsäurebindung durch CD44 (Levesque und Haynes, 1996; Weiss *et al.*, 1998). Vorinkubation der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1 oder einem IgG₁-Kontrollantikörper zeigten keinen Effekt auf die Bindung FITC-markierter Hyaluronsäure (Abb. 12: α ICAM-1 und mIgG₁). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit unmarkierter Hyaluronsäure inkubiert (Abb. 12: HA). Die Bindung löslicher Hyaluronsäure durch MM-Zellen ist somit in hohem Maße durch CD44 reguliert. Die Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen die varianten Epitope CD44v6 oder CD44v10 hatte in diesem Versuchssystem ebenso keinen Effekt auf die Bindung von HA-FITC wie das anti-RHAMM/IHABP Serum (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Die MM-Zelladhäsion an immobilisierte Hyaluronsäure ist abhängig von CD44

Die Zellbindung an immobilisierte Hyaluronsäure ist eine weitere Methode, um die HA-Bindung von Zellen *in vitro* zu bestimmen. Nicht alle Zelltypen können sowohl lösliche wie auch immobilisierte Hyaluronsäure binden. Wir untersuchten daher auch die Bindung von Melanomzellen an immobilisierte Hyaluronsäure. Dafür werden vormarkierte Zellen für einen gewissen Zeitraum auf mit Hyaluronsäure beschichteten oder unbeschichteten Platten inkubiert, mehrfach gewaschen und der Anteil adhärenter Zellen bestimmt. Zur Durchführung

dieser Versuche wurde zunächst die Effizienz der HA-Beschichtung von 96-Lochplatten mit einem ELISA bestimmt (Abb. 13). 96-Lochplatten wurden ü.N. mit Hyaluronsäure (1 mg/ml) oder 1% (w/v) BSA beschichtet und am folgenden Tag mit verschiedenen CD44Rg-Fusionsproteinen (20 µg/ml) inkubiert, die sich durch ihre unterschiedliche HA-Bindungsfähigkeit auszeichnen (Peach *et al.*, 1993). Das CD44HRg-Fusionsprotein ist ein chimäres Protein, das aus der extrazellulären Domäne von humanem CD44s und der humanen IgG₁-Antikörperperdomäne besteht (Aruffo *et al.*, 1990). Das CD44ERg-Fusionsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne der CD44-Isoform CD44v8-v10 und der humanen IgG₁-Antikörperperdomäne. Dieses Fusionsprotein wurde als nicht HA-bindend beschrieben (Peach *et al.*, 1993). Das Arginin an Aminosäureposition 41 von humanem CD44 ist mitentscheidend für die Hyaluronsäurebindung von CD44. Eine Mutation dieser Aminosäure verringert die Hyaluronsäurebindung von CD44 erheblich. Das dritte in diesen Versuchen benutzte CD44-Fusionsprotein (CD44MutRg oder CD44HR41ARg) enthält einen Aminosäureaustausch an dieser Position 41 des humanen CD44-Proteins (Peach *et al.*, 1993). Das CD44MutRg-Fusionsprotein enthält an dieser Position anstatt eines Arginins ein Alanin. Nach der Inkubation der verschiedenen CD44-Fusionsproteine auf Hyaluronsäure wurden die 96-Lochplatten gewaschen und mit einem biotinylierten anti-human IgG_{1γ} Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper erkennt die humane Rezeptorglobulin-Domäne der CD44-Fusionsproteine. Nach einer weiteren Inkubation der Platten mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin wurde die Adhäsion der Fusionsproteine an Hyaluronsäure durch Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt (Abb. 13).

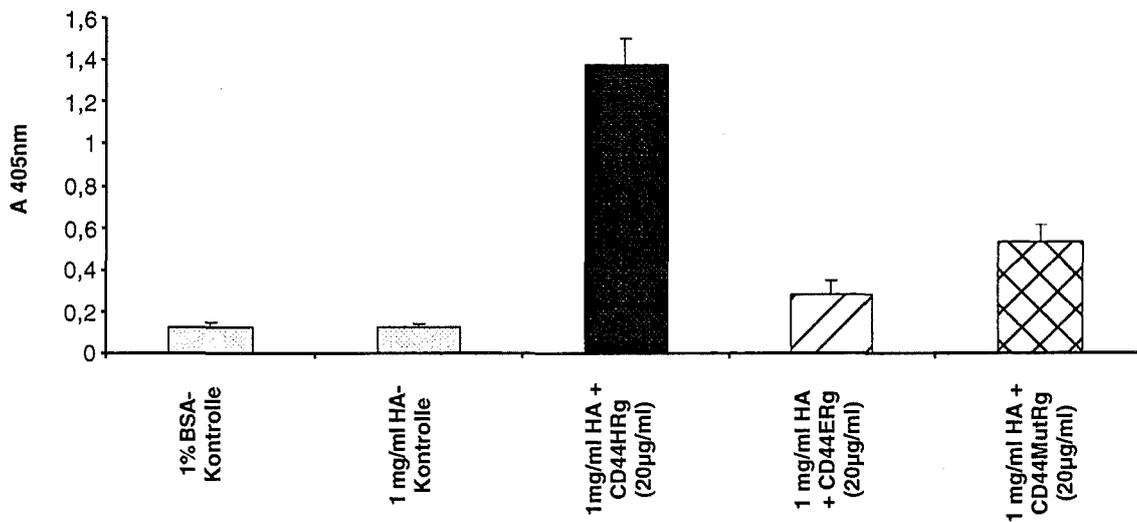


Abb. 13. Kontrollversuch zur Überprüfung der Hyaluronsäure-Beschichtung von 96-Lochplatten. Eine 96-Lochplatte wurde ü.N. bei 4°C mit 1 mg/ml Hyaluronsäure oder 1% (w/v) BSA beschichtet. Die CD44Rg-Fusionsproteine CD44HRg, CD44ERg und CD44MutRg (CD44HR41ARg) wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml für 1 h bei 37°C auf Hyaluronsäure inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde ein biotinylierter Ziege anti-human IgG_{1γ}-F(ab)₂ Antikörper (1:500) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin (1:1000) wurde nach Substratzugabe (pNpp) die Absorption bei 405 nm gemessen.

Das HA-bindende CD44HRg-Fusionsprotein zeigte dabei eine dreifach bessere Bindung an die Hyaluronsäure beschichteten Platten als die nicht HA-bindenden CD44ERg- und CD44MutRg-Fusionsproteine (Abb. 13), die nur eine geringe Bindung an die beschichteten Platten zeigten. Zur Kontrolle wurde die unspezifische Bindung des Biotin-markierten anti-

Ergebnisse

human IgG_{1γ} Antikörpers an BSA-beschichtete sowie mit Hyaluronsäure beschichtete Platten gemessen (Abb. 13: 1% BSA-Kontrolle, 1 mg/ml HA-Kontrolle). Die effektive Beschichtung der 96-Lochplatten mit Hyaluronsäure konnte somit bestätigt werden, eine wichtige Voraussetzung für nachfolgende Experimente.

Mit den so beschichteten Platten wurden HA-Bindungsexperimente mit MM-Zellen durchgeführt, um die Funktion von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP bei der Bindung an immobilisierte Hyaluronsäure zu ergründen. MM-Zellen wurden zunächst für 24 h mit 1 µCi [³H]-Thymidin pro ml Medium radioaktiv markiert. 96-Lochplatten wurden sowohl mit 1 mg/ml Haluronsäure oder als Kontrolle mit 1% (w/v) BSA beschichtet, um später spezifische Bindung der Zellen an Hyaluronsäure von unspezifischer Bindung unterscheiden zu können.

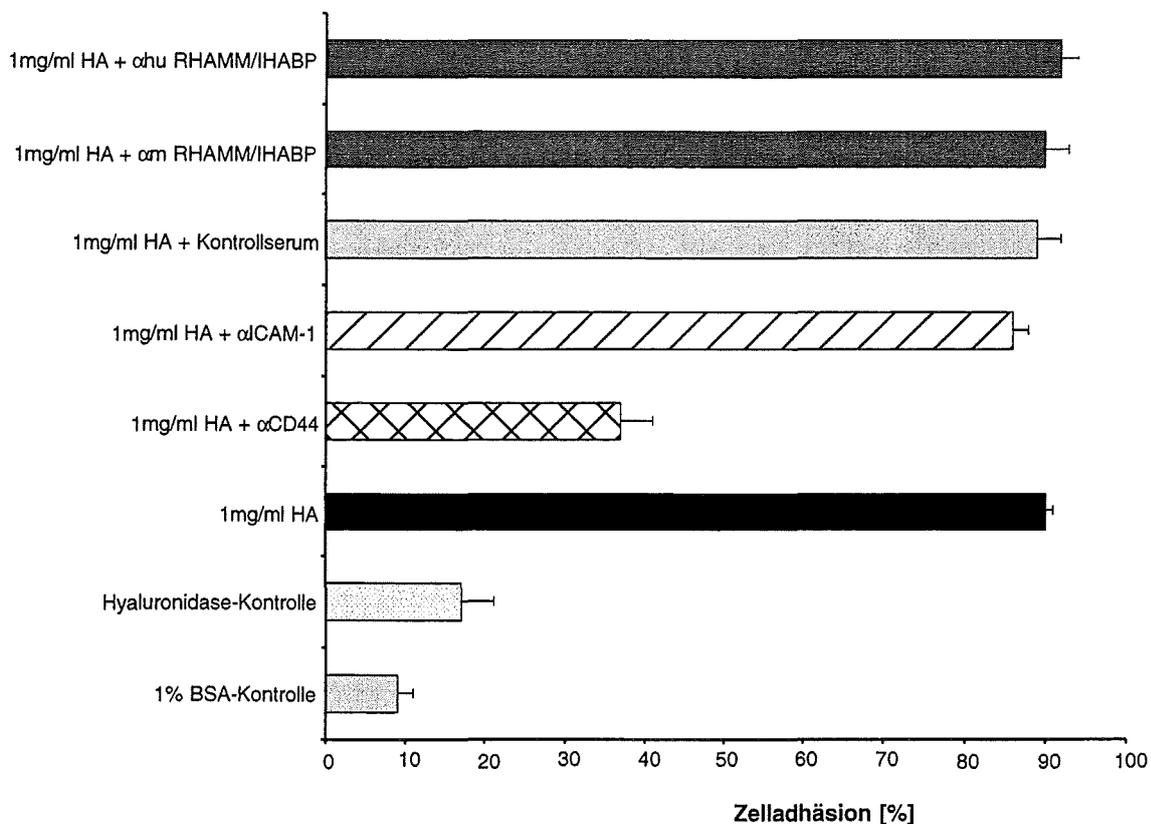


Abb. 14. CD44 inhibiert die Zelladhäsion von MM-Zellen an immobilisierte Hyaluronsäure. Je 5×10^4 mit [³H]-Thymidin markierte HT144 Zellen wurden auf mit Hyaluronsäure (1 mg/ml) beschichtete 96-Lochplatten ausplattiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Als Kontrollen für unspezifische Bindung wurde die Bindung an 1% (w/v) BSA oder mit Hyaluronidase inkubierte Plattenvertiefungen bestimmt. Die Blockierung der HA-Bindung erfolgte durch Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen CD44 (BU75, 10 µg/ml) und ICAM-1 (84H10, 10 µg/ml), mit verschiedenen gegen RHAMM/IHABP gerichteten Seren (αhu RHAMM/IHABP und αm RHAMM/IHABP) und einem Kontrollserum. Die Zelladhäsion ist als prozentualer Anteil adhärenter Zellen zur Gesamtzahl (=100%) eingesetzter Zellen angegeben. Die Daten sind als Mittelwerte von sechs Meßwerten pro Ansatz +/- Standardabweichung dargestellt. Ähnliche Daten wurden auch für die Zelllinien MV3 und 1F6 erhalten.

5×10^4 radioaktiv markierte MM-Zellen wurden dann pro Plattenvertiefung ausplattiert und für 30 min bei 4°C auf den beschichteten Platten inkubiert. Nach 30 min wurden die Platten mehrfach gespült, um nicht adhärenente Zellen von den Plattenböden zu entfernen. Die

verbliebenen, am Boden haftenden Zellen wurden geerntet und die eingebaute Radioaktivität im Verhältnis zur Radioaktivität der eingesetzten Ausgangszellzahl wurde bestimmt. Dies wurde durch Messung der β -Strahlung der mit [^3H]-Thymidin markierten Zellen erreicht. Um die Funktion von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP zu untersuchen, wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44, ICAM-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) oder mit Seren gegen RHAMM/IHABP (1:10 Verdünnung) für 30 min bei 4°C vorinkubiert und danach ausplattiert. Melanomzellen binden sehr schnell und mit einem hohen Prozentsatz (75-90% der eingesetzten Zellen) an Hyaluronsäure (Abb. 14: 1 mg/ml HA). Der gegen CD44 gerichtete monoklonale Antikörper BU75 hemmt nicht nur die Bindung an lösliche HA-FITC, sondern inhibiert auch die Adhäsion von HT144 MM-Zellen an immobilisierte Hyaluronsäure um 65-70% (Abb. 14: 1 mg/ml HA + αCD44). Ein Antikörper gegen ICAM-1, Seren gegen RHAMM/IHABP sowie ein Kontrollserum hatten keinen Effekt auf die HA-Bindung der Zellen (Abb. 14: 1 mg/ml HA + $\alpha\text{hu RHAMM/IHABP}$, + $\alpha\text{m RHAMM/IHABP}$, + $\alpha\text{ICAM-1}$, + Kontrollserum). Die unspezifische Bindung von MM-Zellen an BSA-beschichtete Plattenböden (Abb. 14: 1% BSA-Kontrolle) oder an HA-beschichtete Plattenböden, die vor dem Ausplattieren der Zellen noch für 30 min bei RT mit Hyaluronidase behandelt worden waren (Abb. 14: Hyaluronidase-Kontrolle), lag in diesen Versuchen zwischen 5 und 15%.

Sowohl die Bindung von Melanomzellen an lösliche, FITC-markierte Hyaluronsäure wie auch an immobilisierte Hyaluronsäure ist somit zu einem überwiegenden Teil abhängig von der Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure, nicht aber von ICAM-1 oder RHAMM/IHABP.

3.2.4 Hyaluronsäure erhöht die Proliferation von MM-Zellen

Auf der Suche nach funktionellen Konsequenzen aus der CD44 vermittelten Adhäsion von MM-Zellen an Hyaluronsäure untersuchten wir den Einfluß von Hyaluronsäure auf das Proliferationsverhalten von MM-Zellen. Die MM-Zelllinien 1F6, MV3 und HT144 wurden auf HA-beschichteten 96-Lochplatten ausplattiert und für 48 h kultiviert. In diesem Zeitraum wurde die Proliferation der Melanomzellen durch [^3H]-Thymidineinbau in die genomische DNA der Zellen gemessen. Wachstumsfaktoren als mögliche Verunreinigung der Hyaluronsäurepräparation wurden durch Hitzebehandlung der Hyaluronsäure (20 min, 100°C) inaktiviert. In Abbildung 15 ist ein solches Experiment für die Zelllinie HT144 dargestellt. Der [^3H]-Thymidineinbau von 2500 Zellen/Plattenvertiefung auf unbeschichteten Platten unter gleichen Bedingungen wurde als 100% Proliferation der Zelllinie gesetzt (Abb. 15: Kontrolle). Mit der Kultivierung der Zellen auf Hyaluronsäure wie auch nach Zugabe löslicher Hyaluronsäure ist eine Steigerung der Proliferation von bis zu 40% zu beobachten (Abb. 15: 1 mg/ml HA und 1 mg/ml lösl. HA). Diese ist zudem von der eingesetzten HA-Konzentration abhängig (Abb. 15: 0,1 mg/ml HA). Die Zunahme der Proliferation ist durch Vorinkubation der Zellen mit dem CD44 Antikörper BU75 vollständig inhibierbar (Abb. 15: 1 mg/ml HA + αCD44 und 1 mg/ml lösl. HA + αCD44). Inkubation der Zellen mit einem Antikörper gegen ICAM-1 zeigte in diesen Experimenten keinen Effekt auf die durch Hyaluronsäure vermittelte Steigerung der Proliferation von MM-Zellen (Abb. 15: 1 mg/ml HA + $\alpha\text{ICAM-1}$ und 1 mg/ml lösl. HA + $\alpha\text{ICAM-1}$). Ein genereller toxischer Einfluß der Antikörper wurde nicht beobachtet, da die Basisproliferation der Kontrollzellen (Abb. 15: Kontrolle) durch Zugabe der Antikörper (Abb. 15: Kontrolle + $\alpha\text{ICAM-1}$ und Kontrolle + αCD44) nicht negativ

Ergebnisse

beeinflusst wurde. Die Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure ist demnach nicht nur für die Adhäsion von Melanomzellen an Hyaluronsäure von entscheidender Bedeutung, sie führt auch zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation von Melanomzellen. Dies bedeutet in der Konsequenz einen Wachstumsvorteil für die Tumorzellen.

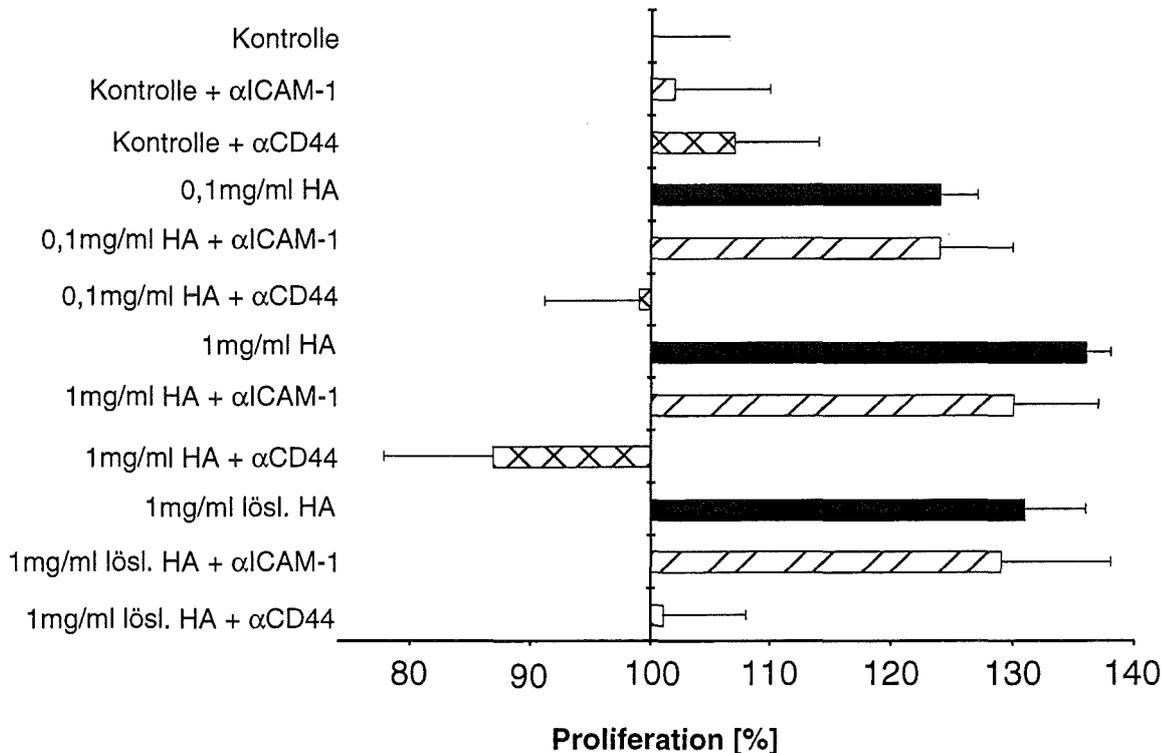


Abb. 15. Hyaluronsäure erhöht die Proliferationskapazität von Melanomzellen. 2500 HT144 Melanomzellen wurden für 48 h auf unbeschichteten, mit 0,1 mg/ml oder mit 1 mg/ml HA beschichteten 96-Lochplatten ausgesät und direkt mit 1 μ Ci [3 H]-Thymidin pro Ansatz markiert. Lösliche Hyaluronsäure (1 mg/ml) wurde ebenfalls zu Versuchsbeginn hinzupipettiert. Für die Blockierungsexperimente wurden die Zellen mit Antikörpern (10 μ g/ml) gegen CD44 (BU75) und ICAM-1 (84H10) für 30 min bei 4°C vorinkubiert. Nach 24 h wurden weitere 5 μ g/ml der angegebenen Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden nach insgesamt 48 h geerntet und der [3 H]-Thymidineinbau in die DNA gemessen. Die Daten sind als prozentuale Steigerung oder Inhibition gegenüber der Kontrolle ([3 H]-Thymidineinbau von 2500 HT144 Zellen in 48 h, Mittelwert aus vier Meßwerten \pm Standardabweichung) dargestellt, die als 100% Proliferation gesetzt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den Zelllinien MV3 und 1F6 erzielt.

3.2.5 Kultivierung von Melanomzellen auf Hyaluronsäure erhöht die Sekretion der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β 1

Die Kultivierung von Melanomzellen mit Hyaluronsäure führt zu einer erhöhten Proliferation, die CD44 abhängig ist. In einem Melanommodell führte die Kultivierung von metastatischen Melanomzellen auf Fibronectin zu einer Aufregulation der Genexpression von IL-1 α , IL-6, IL-8 und TGF- β 2 (Lupetti *et al.*, 1996). Die Wachstumsstimulation von MM-Zellen durch Hyaluronsäure könnte durch die Induktion der Synthese von Wachstumsfaktoren bedingt sein. Wir untersuchten daher, ob solche Wachstumsfaktoren nach Inkubation von MM-Zellen auf Hyaluronsäure sezerniert werden.

Ergebnisse

Wichtige Wachstumsfaktoren und Zytokine für die Proliferation von Melanomzellen und Melanozyten sind TGF- α , TGF- β , PDGF-AB, Gro α , IL-6, IL-8, IL-1 α und bFGF (Shih und Herlyn, 1993). Nicht transformierte Melanozyten der Haut produzieren keine

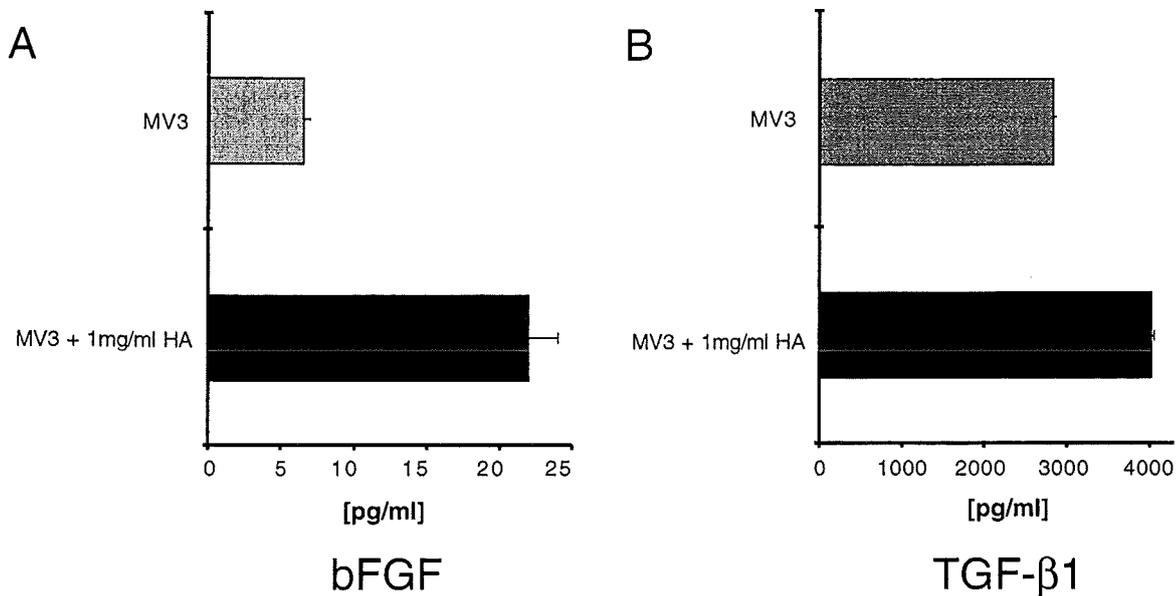


Abb. 16. Kultivierung von Melanomzellen auf Hyaluronsäure erhöht die Sekretion der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β 1. 2500 MV3 MM-Zellen wurden auf mit 1 mg/ml HA beschichteten oder unbeschichteten 96-Lochplatten kultiviert. Nach 48 h wurden die Kulturüberstände von sechs Plattenvertiefungen pro Ansatz gesammelt. Die ELISA-Messungen für bFGF (A) und TGF- β 1 (B) wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert von drei Meßwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

Wachstumsfaktoren, primäre Melanomzellen nur bFGF, metastasierende Melanomzellen hingegen alle der oben erwähnten Wachstumsfaktoren und Zytokine (Shih und Herlyn, 1993). Für diesen Versuch wurden 2500 MV3 MM-Zellen pro Plattenboden einer 96-Lochplatte für 48 h auf unbeschichteten und mit 1 mg/ml HA beschichteten Platten inkubiert. Danach wurden die konditionierten Zellkulturüberstände abgenommen und in ELISA-Messungen wurde die sekretierte Menge von TGF- β 1, IL-6, IL-8, PDGF-AB, Gro α , TNF- α und bFGF bestimmt. Die Inkubation von MV3 Zellen auf Hyaluronsäure führte zu einem dreifachen Anstieg der Synthese von bFGF (Abb. 16A: MV3 + 1mg/ml HA) und einem etwa zweifachen Anstieg der Produktion von TGF- β 1 (Abb. 16B: MV3 + 1 mg/ml HA). Die Synthese der anderen Wachstumsfaktoren blieb in diesem Zeitraum unverändert (PDGF-AB, Gro α , IL-8) oder war nicht detektierbar (IL-6, TNF- α). Die Hochregulierung der Synthese von bFGF und TGF- β 1 während der Kultivierung von MM-Zellen auf Hyaluronsäure beschichteten Platten könnte die gleichzeitig beobachtete Steigerung der Proliferation erklären.

Die erhöhte Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und auch RHAMM/IHABP in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms konnte für Gewebeschnitte von Tumorpatienten *in vivo* und in Zellkulturen *in vitro* gezeigt werden. Neben der bekannten Akkumulation von Hyaluronsäure in Tumorgeweben haben wir eine erhöhte endogene HA-Synthese in MM-Zelllinien gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Hyaluronsäure an Melanomzellen hauptsächlich von CD44 vermittelt wird. Die Interaktion

von CD44 mit Hyaluronsäure führte zu einer Steigerung der Proliferation von Melanomzellen, die von einer Sekretion der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β 1 begleitet war.

3.3 Lösliches CD44s (solCD44s)

3.3.1 Proteolyse von membranständigem CD44 in Melanomzellen

Die Expression von CD44 bei Tumorerkrankungen ist in einigen Fällen mit erhöhten Meßwerten an löslichen Isoformen von CD44 im Serum von Patienten in Verbindung gebracht worden (Guo *et al.*, 1994b; Martin *et al.*, 1997; Schaidler *et al.*, 1997). In diesen Untersuchungen ist lösliches CD44 aber nur als Marker-Molekül beschrieben worden. Funktionelle Aspekte von löslichem CD44 wurden dabei nicht adressiert. In Arbeiten dagegen, die sich mit funktionellen Analysen von löslichem CD44 beschäftigt haben, wurden inhibitorische Einflüsse von löslichem CD44 auf Tumorwachstum und Metastasierung beschrieben (Sy *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1994; Bartolazzi *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997; Zawadzki *et al.*, 1998).

Wir untersuchten daher Melanomzelllinien und primäre Melanozyten auf proteolytisch abgespaltenes lösliches CD44 im Zellkulturmedium (Abb. 17). Zu diesem Zwecke wurden Zellen für 48 h mit [³⁵S]-Methionin/Cystein metabolisch markiert. Danach wurde CD44 aus dem Zelllysate und aus dem Kulturüberstand der Zellen mit dem CD44-Antikörper Hermes 3 (5 μ g/ml) mit Hilfe von Protein A/G-Sepharose immunpräzipitiert. Vor allem aus den Kulturüberständen der Zelllinien MV3 und HT144 konnten größere Mengen von löslichem CD44 mit einer Proteingröße von etwa 70 kDa mit dem Hermes 3-Antikörper präzipitiert werden (Abb. 17: MV3/ÜS + α CD44; HT144/ÜS + α CD44). In Kulturüberständen der Zelllinien 1F6 und SB1 sowie in Überständen von primären Melanozyten konnte kein lösliches CD44-Protein nachgewiesen werden (Abb. 17: 1F6/ÜS + α CD44; SB1/ÜS + α CD44; Mel P2/ÜS + α CD44). In den Zellkulturüberständen der MM-Linien MM1 und SB3 waren geringe Menge lösliches CD44 präzipitiert worden (MM1/ÜS + α CD44; SB3/ÜS + α CD44). Membranständiges CD44s mit einer Proteingröße von 85 kDa wurde aus den Zelllysaten aller untersuchten Zelllinien präzipitiert (Abb. 17: Lysat + α CD44). In Kontrollen, bei denen die Proteinpräzipitation ohne Antikörper durchgeführt wurde, waren keine Proteine nachweisbar (Abb. 17: Lysat-Kontrollen und ÜS-Kontrollen). Die Größe des löslichen CD44 von 70 kDa legt nahe, daß es sich dabei um die proteolytisch abgespaltene Form von membranständigem CD44s ohne Transmembran- und cytoplasmatischer Domäne handelt.

In Melanomzellen ist somit ein verstärktes Abspalten von CD44 von der Zelloberfläche zu beobachten. Wir versuchten die Funktion von löslichem CD44 näher zu charakterisieren. Zum einen sollte proteolytisch abgespaltenes lösliches CD44 aus dem Kulturüberstand von Melanomzellen isoliert, aufgereinigt und dann für funktionelle Experimente eingesetzt werden. Zum anderen sollte eine MM-Zelllinie, die kein CD44 von der Oberfläche abspaltet, stabil mit verschiedenen für lösliches CD44 kodierenden cDNAs transfiziert werden. Die Konsequenzen, die eine kontinuierliche Produktion eines löslichen CD44-Proteins für die HA-

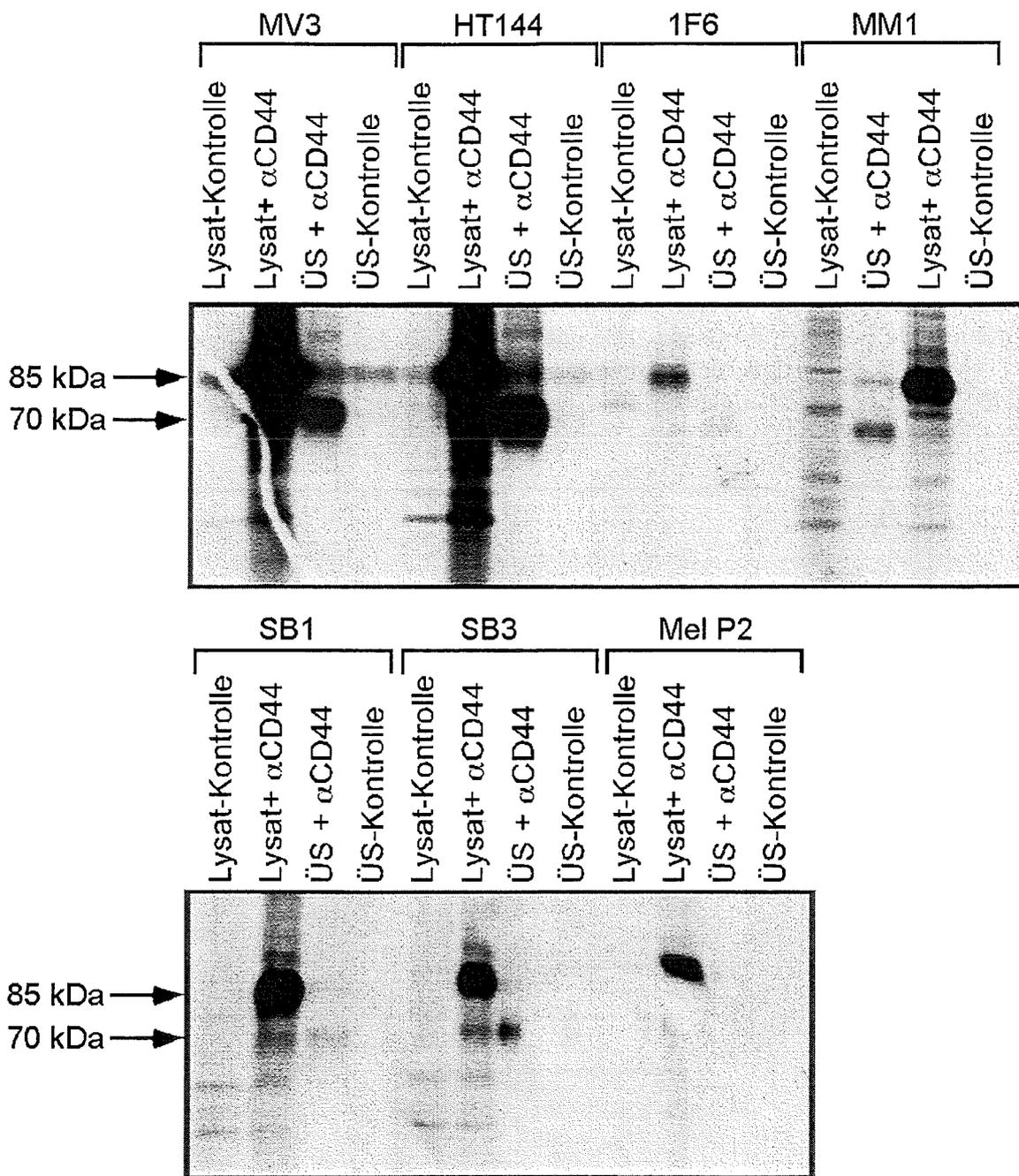


Abb. 17. Immunpräzipitation von CD44 aus Proteinlysaten und Kulturüberständen verschiedener mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markierten MM-Zelllinien und Melanozyten mit dem monoklonalen αCD44-Antikörper Hermes 3. 1x 10⁶ Zellen der MM-Zelllinien MV3, HT144, 1F6, MM1, SB1 und SB3 sowie einer primären Melanozytenkultur (Mel P2) wurden auf 10 cm Kulturschalen in 5 ml RPMI-Medium ausgesät und für 48 h mit 750 μCi [³⁵S]-Methionin/Cystein pro Kulturschale radioaktiv markiert. Danach wurde CD44 aus den Zelllysaten und aus Kulturüberständen mit dem monoklonalen αpanCD44-Antikörper Hermes 3 (5 μg/ml) mit Hilfe von Protein A/G-Sepharose präzipitiert (Lysat + αCD44; ÜS + αCD44). Als Kontrolle wurden Präzipitationen ohne Zugabe des CD44-Antikörpers durchgeführt, um unspezifische Bindungen von Proteinen an Protein A/G-Sepharose nachweisen zu können (Lysat-Kontrolle; ÜS-Kontrolle). Die Proteinpräzipitate wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele wurden getrocknet und die präzipitierten Proteine durch Autoradiographie nachgewiesen.

abhängigen Funktionen von membranständigem CD44 hat, sollten *in vitro* wie *in vivo* getestet werden.

3.3.2 Aufreinigung von löslichem CD44s aus Zellkulturüberständen

Die Aufreinigung von proteolytisch abgespaltenem CD44 aus 48 h Kulturüberständen der Zelllinie MV3 erfolgte über eine mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD44 (Klon BU52) beladene Affinitätsäule. Nach der Aufreinigung wurde das gereinigte Protein mit einem Antikörper gegen CD44 im Western Blot auf Molekulargewicht und Identität getestet. Die Konzentration des isolierten Proteins wurde mit einem CD44-ELISA bestimmt. In Abbildung 18 sind zwei Western Blots der Aufreinigung von löslichem CD44 der Zelllinie MV3 dargestellt. Die ELISA-Messungen für diese beiden Isolationen hatten Werte von 193 µg/ml lösliches CD44 (Abb. 18A) und 73 µg/ml lösliches CD44 (Abb. 18B) ergeben.

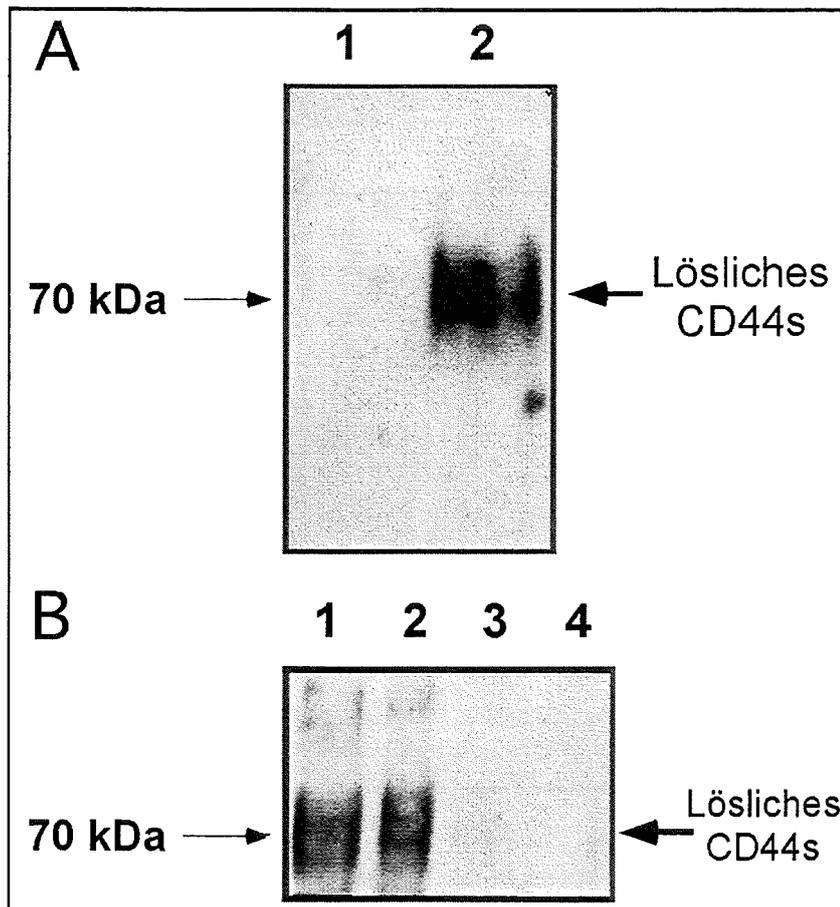


Abb. 18. Western Blot von aufgereinigtem CD44s der Zelllinie MV3. In A ist der Nachweis von gereinigtem löslichem CD44s aus 48 h Zellkulturüberständen der Zelllinie MV3 dargestellt. In Spur 1 wurde der solCD44s depletierte Überstand aufgetragen. In Spur 2 das gereinigte lösliche CD44 (200 ng Gesamtmenge). In B ist ein weiterer Nachweis von gereinigtem löslichem CD44 aus der MM-Zelllinie MV3 gezeigt. In Spur 1 und 2 waren 100 ng des gereinigten solCD44 aufgetragen, wobei die Probe in Spur 2 zusätzlich über Gelfiltration gereinigt worden war. In den Spuren 3 und 4 sind die solCD44 depletierten Überstände aufgetragen. Der Nachweis des löslichen Proteins wurde in beiden Fällen nach Transfer des Proteins auf PVDF-Membranen mit dem α CD44-Antikörper BU52 (10 µg/ml) durchgeführt.

In Abb. 18A wurden davon 200 ng, in Abb. 18B 100 ng des löslichen CD44s in einem Western Blot analysiert. Das mit dieser Methode gereinigte Protein hatte das erwartete Molekulargewicht von 70 kDa für lösliches CD44s. Dies entsprach der in Immunpräzipitationen aus Zellkulturüberständen der Zelllinie MV3 nachgewiesenen Form von löslichem CD44 (Abb. 17).

Das aufgereinigte Protein wurde dann in einer Reihe von funktionellen Experimenten eingesetzt. Zunächst sollte die HA-Bindungsfähigkeit des isolierten Proteins geklärt werden. In daran anschließenden Experimenten wurden noch denkbare Auswirkungen des löslichen CD44s auf die Aktivierung von T-Lymphozyten in sogenannten "Mixed Lymphocyte Reactions" (MLRs) untersucht.

3.3.3 HA-Bindungsexperimente mit aufgereinigtem löslichem CD44

Zunächst wurde in einem Kontrollexperiment getestet, ob die Bindung von MM-Zellen an immobilisierte Hyaluronsäure durch Absättigung der Bindungsstellen auf den beschichteten 96-Lochplatten mit CD44-Proteinen möglich ist. Tatsächlich konnte die Bindung von MV3 Zellen an Hyaluronsäure durch das CD44HRg-Fusionsprotein (20 µg/ml) um 35% inhibiert werden (Abb. 19A: 1 mg/ml HA + CD44HRg). Die nicht HA-bindenden CD44HMutR41ARg- oder CD44ERg-Fusionsproteine (20 µg/ml) konnten die Zellbindung von MV3 Zellen dagegen nicht beeinflussen (Abb. 19A: 1 mg/ml HA + CD44MutR41ARg; 1 mg/ml HA + CD44ERg). Die Zelladhäsion der MV3 Zellen an Hyaluronsäure lag in diesen Experimenten bei 40-50% der eingesetzten 5×10^4 Zellen (Abb. 19A und 19B). Durch Vorinkubation der HA-beschichteten Platten mit dem aus Kulturüberständen der MV3 Zelllinie gereinigten löslichen CD44 (15 µg/ml) konnte bei diesen Bindungsversuchen keine signifikante Inhibition der HA-Bindung gegenüber den Kontrollen erzielt werden (Abb. 19B: 1 mg/ml HA + solCD44s). Als Kontrollen wurden die HA-beschichteten Platten mit dem solCD44 depletierten Überstand (Abb. 19B: 1 mg/ml HA + 48 h ÜS solCD44s depl.) und mit einem 48 h Kulturüberstand der MM-Zelllinie MV3 vorinkubiert (Abb. 19B: 1 mg/ml HA + solCD44s 48 h ÜS). Die Konzentration von löslichem CD44 in diesem Ausgangsüberstand war 300 ng/ml. Für das gereinigte CD44 war eine Konzentration von 15 µg/ml gemessen worden. Die HA-Bindung von MV3 MM-Zellen konnte in diesem Versuch durch Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen CD44, die die HA-Bindungsfunktion von CD44 blockieren, um 70% inhibiert werden (Abb. 19B: 1 mg/ml HA + α CD44). Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen ICAM-1 und das CD44v9-Epitop konnten die HA-Bindung dagegen nicht beeinflussen (Abb. 19B: 1 mg/ml + α ICAM-1; 1 mg/ml + α CD44v9).

Das aufgereinigte lösliche CD44 wurde in weiteren Versuchen eingesetzt, um eine HA-Bindung des Proteins zu untersuchen. Die Bindung von MM-Zellen an HA-FITC konnte durch gereinigtes CD44 ebenfalls nicht blockiert werden (Daten nicht gezeigt). CPC-Präzipitationen (Sleeman *et al.*, 1997), mit denen proteinchemisch die Bindung von Proteinen an Hyaluronsäure nachgewiesen werden kann, konnten auch keine Interaktion des löslichen gereinigten CD44 mit Hyaluronsäure nachweisen. Eine Funktionalität des durch Proteolyse entstandenen und dann aufgereinigten Proteins in Bezug auf die HA-Bindung konnte durch diese Experimente nicht gezeigt werden.

Ergebnisse

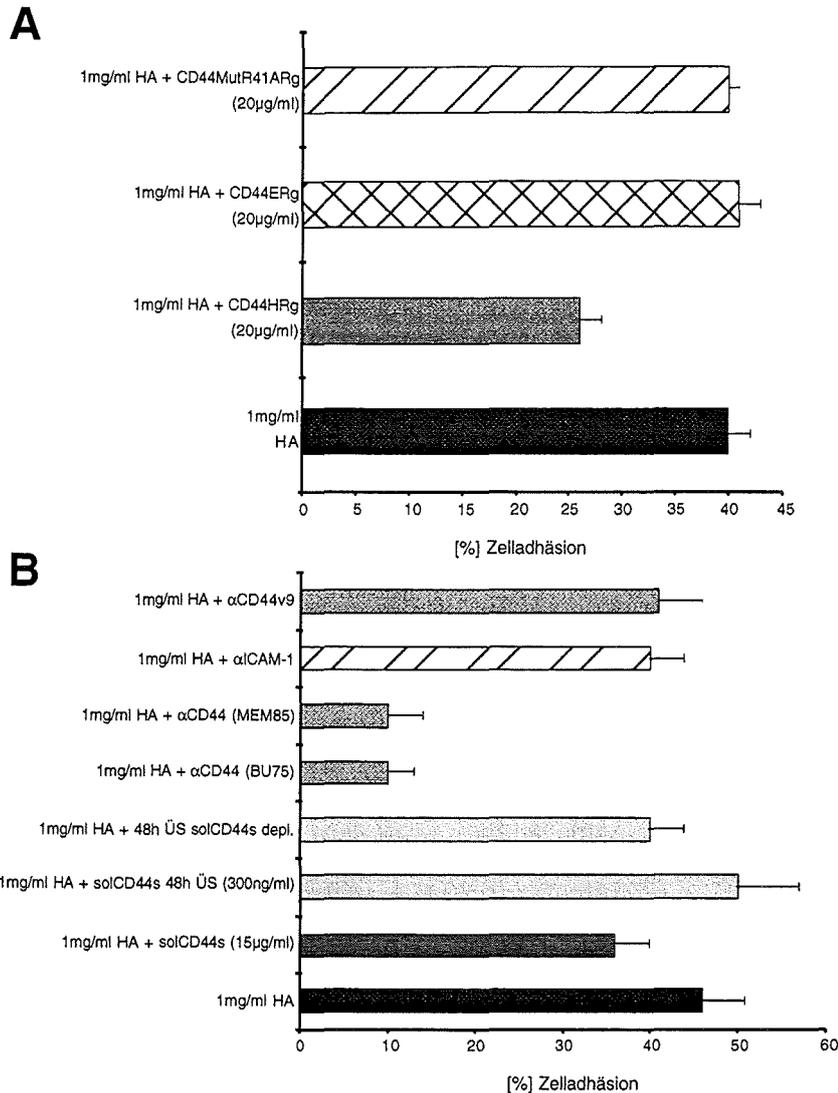


Abb. 19. HA-Bindungsexperimente mit CD44Rg-Fusionsproteinen und aufgereinigtem löslichem CD44. In **A** ist die Adhäsion von MV3 MM-Zellen an mit Hyaluronsäure beschichtete 96-Lochplatten gezeigt. Die mit Hyaluronsäure beschichteten Platten wurden dabei mit jeweils 20 µg/ml der verschiedenen CD44Rg-Fusionsproteine (CD44HRg, CD44ERg und CD44MutR41ARg) für 2 h bei 4°C vorinkubiert. Danach wurden 5×10^4 durch [3 H]-Thymidineinbau markierte Zellen pro Plattenvertiefung für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt und der prozentuale Anteil adhärenter Zellen gegenüber der Ausgangszellzahl (=100%) durch Messung der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Die Mittelwerte (cpm der adhärenen Zellen) von sechs Meßwerten +/- Standardabweichung wurde dabei ins Verhältnis zu der gemessenen Radioaktivität der eingesetzten Zellen (5×10^4) gesetzt. In **B** ist ein weiteres HA-Bindungsexperiment der Zelllinie MV3 gezeigt. Hierbei wurden die Zellen zum einen mit verschiedenen Antikörpern (20 µg/ml) gegen CD44 (αCD44 (MEM85) und αCD44 (BU75)), ICAM-1 (αICAM-1) oder gegen das CD44v9-Epitop (αCD44v9) vorinkubiert. In parallelen Ansätzen wurden die beschichteten Platten mit einem 48 h Kulturüberstand (solCD44s 48 h ÜS), aufgereinigtem löslichem CD44 (solCD44s, 15 µg/ml) oder dem solCD44 depletierten Säulendurchlauf (48 h ÜS solCD44s depl.) vorinkubiert, bevor dann die Zellen ausplattiert wurden.

3.3.4 Einfluß von löslichem CD44 auf MLR-Reaktionen ("Mixed Lymphocyte Reaction")

CD44 spielt bei der Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen eine Rolle (Rothman *et al.*, 1991; Arch *et al.*, 1992). Eine kostimulatorische Funktion von CD44s konnte bei der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen gezeigt werden, wobei in dieser Untersuchung ein CD44Rg-Fusionsprotein keinen Effekt ausüben konnte (Guo *et al.*, 1996). Da uns ein System zur Untersuchung der T-Lymphozytenaktivierung durch Antigen präsentierende dendritische Zellen zur Verfügung stand, wurde in weiteren Funktionstests untersucht, ob lösliches CD44 einen Einfluß auf die Antigenpräsentation von humanen dendritischen Zellen (DC) und die Aktivierung von humanen CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten (TC) haben könnte. Die Bedeutung von membranständigem CD44 bei der Aktivierung der T-Zellproliferation durch dendritische

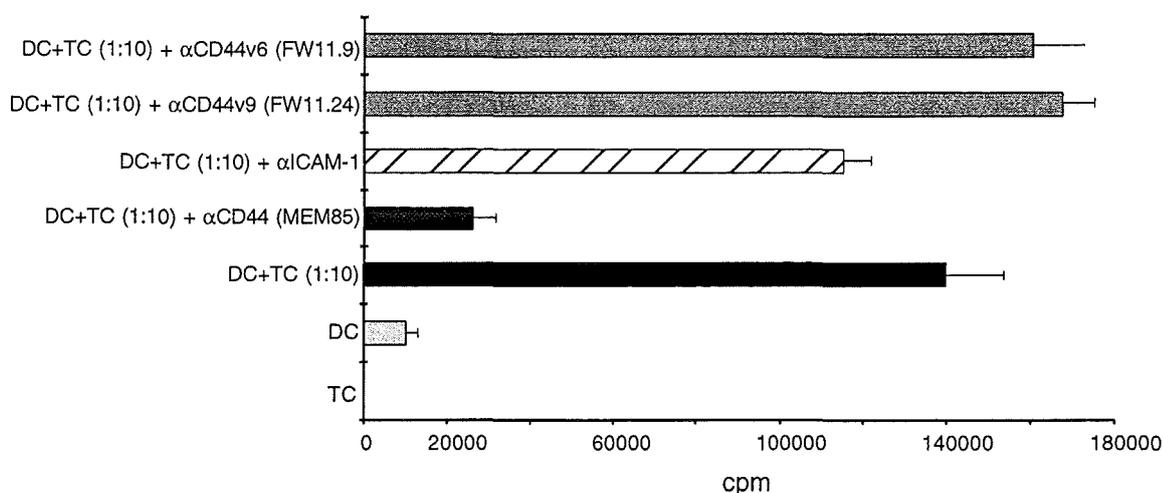


Abb. 20. Ein Antikörper gegen panCD44 blockiert die Proliferation von CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten in einer autologen MLR-Reaktion. Ausdifferenzierte dendritische Zellen (DC) wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten (TC) gemischt. Die Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen wurde durch Zugabe von Tetanus-Toxin (4 μ g/ml) induziert. Verschiedene Antikörper (10 μ g/ml) gegen CD44, ICAM-1, das CD44v6- bzw. das CD44v9-Epitop wurden direkt in die Reaktion zugegeben. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit 1 μ Ci [³H]-Thymidin/Plattenvertiefung für 24 h gepulst. Danach wurden die Zellen geerntet und der [³H]-Thymidineinbau [cpm] der T-Lymphozyten gemessen. Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Meßwerten +/- Standardabweichung.

Zellen zeigt Abb. 20. Differenzierte, LPS-stimulierte dendritische Zellen und frisch präparierte CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten, die vom selben Spender isoliert worden waren, wurden in einem Verhältnis von 1:10 in 96-Lochplatten pipettiert (Abb. 20: DC+TC (1:10)). Zu diesen Ansätzen wurden direkt 10 μ g/ml Antikörper gegen panCD44, ICAM-1 und CD44v6- bzw. CD44v9-enthaltende Isoformen von CD44 hinzupipettiert (Abb. 20: + α CD44 (MEM85); + α ICAM-1; + α CD44v6; + α CD44v9). Nach fünf Tagen Kokultur der autologen MLR wurde die T-Zellproliferation durch Zugabe von 1 μ Ci [³H]-Tymidin pro Plattenvertiefung für 24 h gemessen. Als Kontrolle wurde die Eigenproliferation der beiden Zellpopulationen bestimmt (Abb. 20: DC; TC). Die T-Zellproliferation ließ sich in diesen Experimenten durch den monoklonalen α CD44-Antikörper MEM85, der auch mit der HA-Bindungsfunktion von

Ergebnisse

CD44 interferiert, fast vollständig inhibieren (Abb. 20: DC+TC + α CD44). Antikörper gegen ICAM-1, CD44v6- sowie CD44v9-Epitope konnten die T-Zellproliferation dagegen nicht beeinflussen (Abb. 20).

Nachdem der inhibitorische Einfluß von membranständigem CD44 auf die Proliferation von T-Lymphozyten in einer MLR-Reaktion gezeigt worden war, untersuchten wir die Auswirkungen von löslichem CD44 in diesem Versuchssystem (Abb. 21).

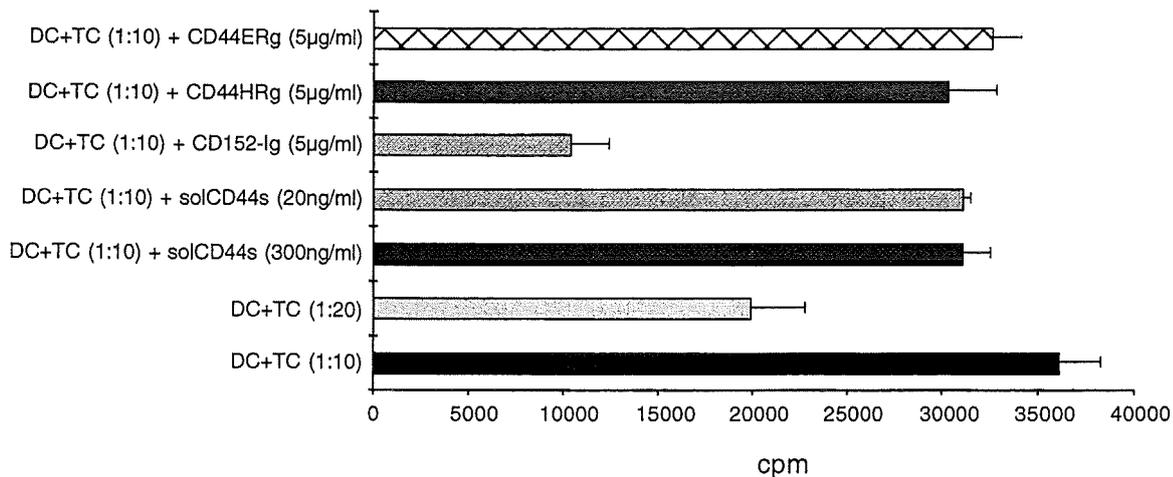


Abb. 21. CD44-Fusionsproteine und lösliches CD44 haben keinen Effekt auf die Proliferation von T-Lymphozyten in einer allogenen MLR. Ausdifferenzierte dendritische Zellen (DC) wurden in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 mit $CD4^+/CD8^+$ -T-Lymphozyten (TC) vermischt. Die verschiedenen Fusionsproteine (CD44ERg, CD44HRg, CD152-Ig) sowie unterschiedliche Konzentrationen von löslichem CD44 wurden direkt in die MLR-Reaktionen zugegeben. Nach fünf Tagen wurden die einzelnen Ansätze mit $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-Thymidin/Plattenvertiefung für 24 h markiert. Danach wurden die Zellen geerntet und der [^3H]-Thymidineinbau [cpm] in die DNA der T-Lymphozyten gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Meßwerten +/- Standardabweichung.

Zu einer allogenen MLR aus ausdifferenzierten, humanen dendritischen Zellen und $CD4^+/CD8^+$ -T-Lymphozyten wurden verschiedene Konzentrationen aufgereinigter Fusionsproteine und MM-Zellkulturüberstände mit verschiedenen Konzentrationen an löslichem CD44 gegeben (Abb. 21). Ein inhibitorisches CD152-Ig-Fusionsprotein, das als Kontrolle die kostimulatorische Wirkung von B7-1-Molekülen auf den dendritischen Zellen blockiert, inhibierte die T-Zellproliferation um 70% (Abb 21: CD152-Ig). Die beiden eingesetzten CD44Rg-Fusionsproteine sowie MM-Kulturüberstände hatten dagegen keinen Effekt auf die Proliferation der $CD4^+/CD8^+$ -T-Lymphozyten. Weitere Versuche mit aufgereinigtem löslichem CD44 ergaben ähnliche Resultate (Daten nicht gezeigt). Lösliches CD44 hatte in diesen Versuchen keinen Einfluß auf die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung durch dendritische Zellen.

3.4 Analyse von konstitutiv lösliches CD44s sezernierenden Transfektanten der 1F6 MM-Zelllinie

Ein weiterer Ansatz, der in dieser Arbeit verfolgt wurde, um die Funktion von löslichem CD44 zu untersuchen, war die Herstellung stabiler Transfektanten, die verschiedene lösliche Formen

von CD44 exprimieren sollten. Die Zielsetzung war hierbei, die Auswirkungen von konstitutiv sezerniertem löslichem CD44 *in vitro* und *in vivo* auf durch membranständiges CD44 vermittelte Funktionen in einem definierten Zellsystem untersuchen zu können. Dafür sollte eine CD44-positive MM-Zelllinie, die kein CD44 von der Zellmembran abspaltet, stabil mit verschiedenen für lösliches CD44 kodierenden cDNAs transfiziert werden. Diese sich nur in einer Eigenschaft unterscheidenden Zellklone dieser Zelllinie sollten dann auf ihre HA-Bindung, Proliferationskapazität und nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse auf ihr Tumorwachstum *in vivo* untersucht werden

3.4.1 Klonierung und Mutagenese von löslichen CD44s-cDNAs

Eine für humanes lösliches CD44s kodierende cDNA mit einer Länge von 807 bp wurde in die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Kpn I und EcoR V des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3 kloniert (Abb. 22C). Die für lösliches CD44 kodierende cDNA war ursprünglich mit CD44s-spezifischen Oligonukleotiden über eine PCR amplifiziert worden und in die Kpn I- und Bgl II-Schnittstellen des pAD-CMV2-Expressionsvektors kloniert worden. Für die PCR war das 3'-Oligonukleotid so konstruiert worden, daß in die CD44-cDNA nach Position 804 ein TGA-Stopkodon eingebaut worden war, das zum Abbruch der Translation an dieser Stelle führt. Diese cDNA kodiert für ein verkürztes lösliches CD44s-Protein (solCD44s) bis zur Aminosäure 268, der 3'-terminalen Aminosäure des CD44-Exons 16 (Abb. 22C). Der verkürzten Form von CD44 fehlen somit die von den Exons 17 (Transmembranregion) und Exon 19 (Cytoplasmatische Domäne) kodierten Proteindomänen.

Transfektion dieser cDNA-Expressionskonstrukte in Zellen sollte zur Sezernierung des löslichen Proteins in den Kulturüberstand führen. Transfektanten, die dieses lösliche CD44s exprimierten, wurden in dieser Arbeit mit 1F6 solCD44s bezeichnet.

Zusätzlich wurde die cDNA spezifisch an Stellen durch Basenaustausche verändert, die für wichtige Aminosäuren bei der Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure kodieren (Peach *et al.*, 1993; Abb. 22A und B). Durch eine sequenzspezifische Mutation wurde die solCD44-cDNA so verändert, daß im translatierten Protein die Aminosäure Arginin an Position 41 von CD44 (Screaton *et al.*, 1992) durch ein Alanin ersetzt ist (Abb. 22B). Transfektanten, die dieses mutierte lösliche CD44 exprimierten, wurden mit 1F6 solCD44sR41A bezeichnet.

In einem zweiten cDNA-Konstrukt wurden zwei basenspezifische Mutationen eingeführt, die bei der Translation der mRNA dieses Konstruktes an den Positionen 150 und 154 des Proteins zum Einbau von Alanin anstatt der Aminosäure Arginin führen (Abb. 22A). Diese Transfektanten erhielten die Bezeichnung 1F6 solCD44sR150A/R154A (Zur Vereinfachung mit 1F6 solCD44sR150A bezeichnet).

Abbildung 22 zeigt alle für lösliches CD44s kodierenden cDNA-Konstrukte, die für die stabile Transfektion von Zellen verwendet wurden. Die Sequenzen der basenspezifischen Mutationen sind indiziert (Abb. 22A und B).

Ergebnisse

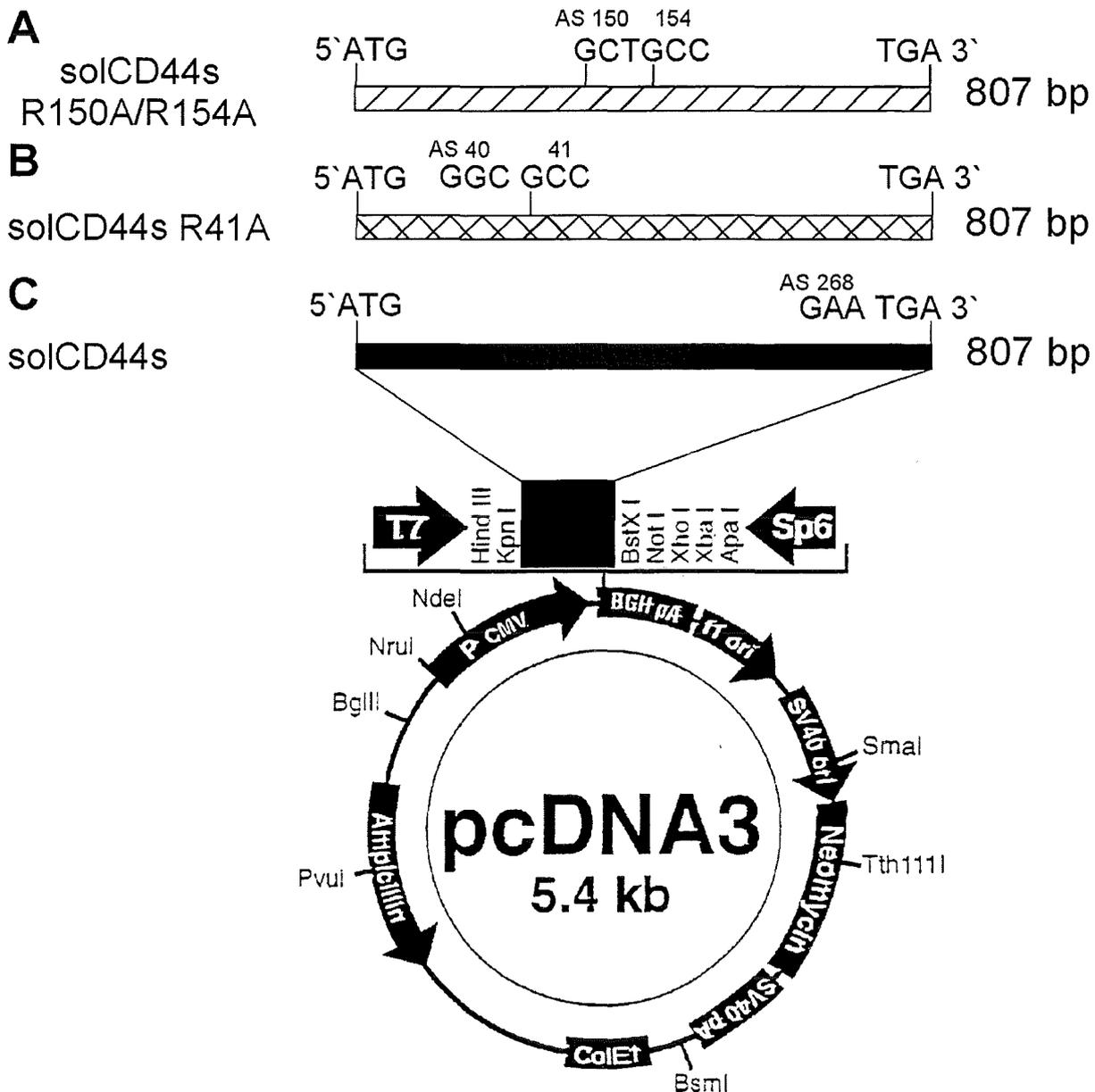


Abb. 22. Plasmidkarte der für lösliches CD44s kodierenden cDNA-Expressionskonstrukte, die stabil in 1F6 Melanomzellen transfiziert wurden. Eine verkürzte, 807 bp lange humane CD44s-cDNA mit einem Translations-Stopkodon direkt hinter der Aminosäure 268 des CD44s-Moleküls (nach Sreaton *et al.*, 1992) wurde in die Kpn I- und EcoR V-Schnittstellen der Klonierungsstelle des pcDNA3-Vektors kloniert (C; solCD44s). Durch basenspezifische Mutagenese der cDNA wurde die Translation der Aminosäure 41 von einem Arginin in ein Alanin verändert (B; solCD44sR41A). Zur Herstellung der solCD44R150A/R154A-Doppelmutante wurde die solCD44-cDNA durch die angegebenen Basenaustausche verändert. Dadurch wurde die Translation der beiden Aminosäuren 150 und 154 von Arginin in Alanin verändert (A; solCD44sR150A/R154A). Die beiden erzeugten Mutanten kodieren für lösliche CD44-Proteine mit Defekten in der HA-Bindungsdomäne (Peach *et al.*, 1993).

3.4.2 Analyse der solCD44s-Proteinexpression in stabilen Transfektanten von 1F6

Die MM-Zelllinie 1F6 spaltet nur sehr wenig CD44 von der Oberfläche ab (Abb. 17). Zellen dieser Zelllinie wurden stabil mit den verschiedenen cDNA-Konstrukten für solCD44.

Ergebnisse

transfiziert. Für jedes transfizierte cDNA-Konstrukt wurden 20 dem Selektionsmarker G418 gegenüber resistente Einzelklone ausgewählt. Die Expression von löslichem CD44 durch die Transfektanten wurde zunächst durch Messung der CD44-Konzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abb 23). Dazu wurden zunächst 1×10^6 Zellen der verschiedenen Zellklone auf Petrischalen ausgesät. Nach 48 h wurden Kulturüberstände abgenommen und die Konzentrationen von löslichem CD44 gemessen (Abb. 23). Dabei wurden unter 1 Transfektanten zusammengefaßt, die mit den basenspezifischen Mutanten der löslichen CD44-cDNA transfiziert worden waren (Abb. 23: 1). Die solCD44sR150A/R154A exprimierenden Doppelmутanten wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zur Vereinfachung als R150A-Mutanten bezeichnet. Die 1F6 solCD44sR41A-Zellen sezernierten etwa 130 ng

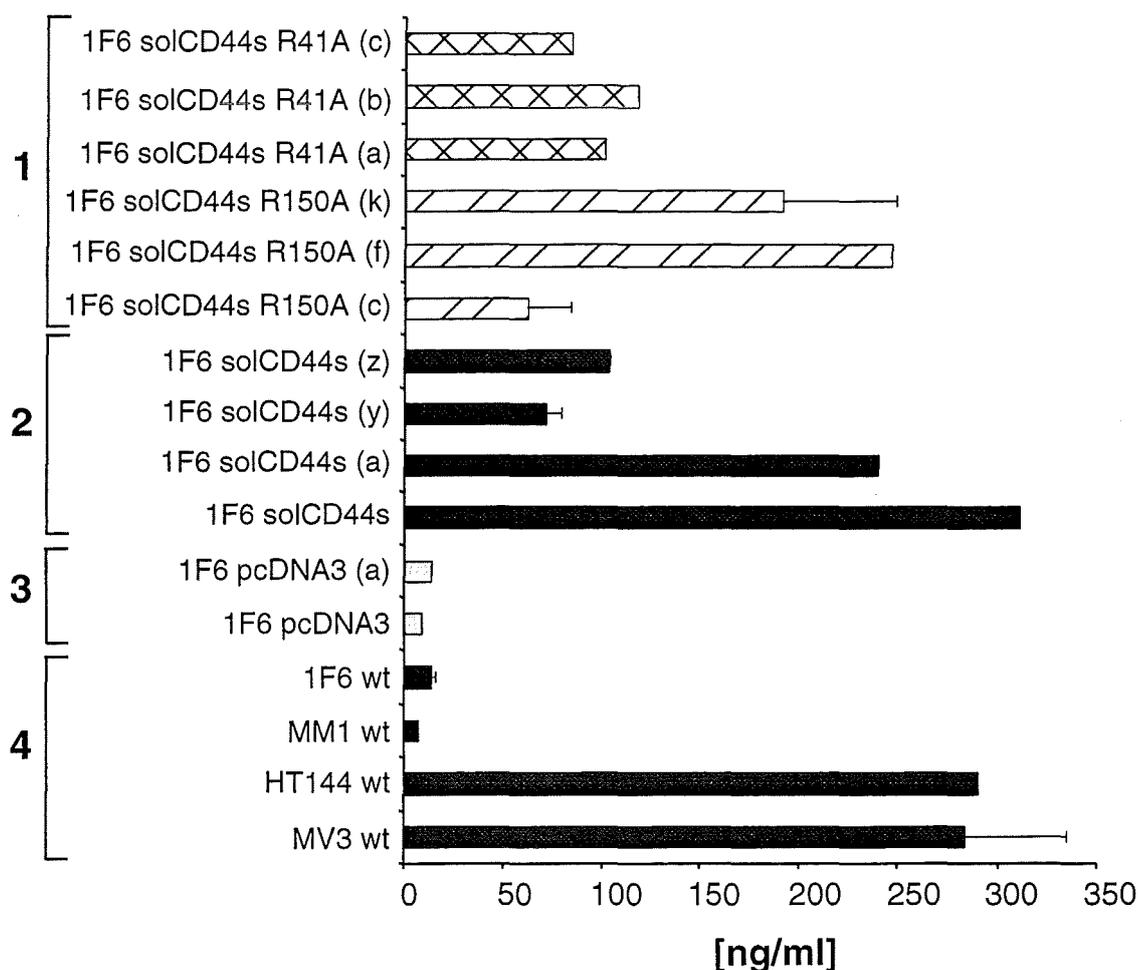


Abb. 23. CD44-ELISA-Messung von 48 h Zellkulturüberständen stabil mit löslichen CD44s-cDNAs transfizierter 1F6 MM-Zellen. Die Menge an löslichem CD44 in 48 h Überständen von 1×10^6 Zellen wurden mit einem CD44-ELISA nach Angaben des Herstellers gemessen. Unter Nr. 1 ist die Expression von mutiertem löslichem CD44 von Transfektanten gezeigt, die entweder das mutierte solCD44sR41A oder das mutierte solCD44sR41A/R150A synthetisieren. Gruppe 2 zeigt die solCD44s-Sekretion von Transfektanten, die mit dem unmutierten cDNA-Konstrukt (solCD44s) transfiziert worden waren. In 3 sind die mit dem Expressionsvektor (pcDNA3) transfizierten Kontrolltransfektanten aufgeführt. In 4 wird die Sezernierung von löslichem CD44 einiger Wildtyp-Melanomlinien gezeigt. Die Buchstaben in Klammern indizieren einzelne Transfektanten. Die Konzentrationsangabe [ng/ml] bezieht sich auf ng lösliches CD44 pro ml Kulturüberstand.

lösliches CD44 pro ml Kulturmedium (Abb. 23: 1). Die solCD44sR150A sezernierenden Zellen exprimierten das lösliche Protein in einer Konzentration von 50-250 ng/ml (Abb. 23: 1).

Unter Nr. 2 ist die Sezernierung von löslichem CD44 von Transfektanten gezeigt, die mit dem nicht mutierten cDNA-Konstrukt transfiziert worden sind (Abb. 23: 2; solCD44s). Diese unterscheiden sich in der Sekretion von löslichem CD44 ganz erheblich. Für die späteren *in vivo* Versuche wurden die beiden Zellklone 1F6 solCD44s und 1F6 solCD44s (a) eingesetzt. Diese beiden Klone synthetisieren annähernd gleiche Mengen lösliches CD44 wie die MM-Zelllinien MV3 und HT144 (Abb. 23: 1F6 solCD44s, 1F6solCD44s (a), MV3 wt und HT144 wt). Bei diesen war das Abspalten des löslichen CD44s ursprünglich beobachtet worden (Abb. 17). Unter Nr. 3 sind zwei der mit dem pcDNA3-Vektor als Kontrolle transfizierten Zelllinien zusammengefaßt (Abb. 23: 3). Für diese Transfektanten konnte kein lösliches CD44 im Kulturmedium nachgewiesen werden. Unter 4 wurden die Wildtyp-Melanomlinien vereint (Abb. 23: 4). Die Zelllinien MV3 und HT144 sezernieren etwa 280 ng/ml lösliches CD44 in das Zellkulturmedium, während für die Zelllinien MM1 und 1F6 keine erhöhten Werte gemessen wurden (Abb. 23: 4).

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der verschiedenen löslichen CD44-Formen gibt eine Information über die korrekte Expression der transfizierten cDNAs, läßt aber auch Rückschlüsse auf das von MM-Zellen proteolytisch abgespaltene lösliche CD44 zu. Die Proteingröße und Menge der von den Transfektanten sezernierten löslichen CD44-Formen wurde durch Immunpräzipitation von [³⁵S]-Methionin/Cystein metabolisch markiertem CD44 aus Zelllysaten und Kulturüberständen nachgewiesen (Abb. 24). Für diese Immunpräzipitation wurde der monoklonale panCD44-Antikörper Hermes 3 (5 µg/ml) verwendet. Die Immunpräzipitation von CD44 aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen der Wildtyp-Zelllinie 1F6 (1F6 wt), einer Kontrolltransfektante (1F6 pcDNA3) und eines mit der löslichen CD44s-cDNA transfizierten Zellklones (1F6 solCD44s) zeigt deutlich die Sezernierung von löslichem CD44 durch die Zelllinie 1F6 solCD44s (Abb. 24A: 1F6 solCD44s; ÜS + αCD44). Das lösliche CD44 dieser Transfektante hat ein Molekulargewicht von 75 kDa. Damit ist das sezernierte lösliche CD44 um etwa 5 kDa größer als das von den Zelllinien MV3 und HT144 abgespaltene CD44, das ein Molekulargewicht von nur etwa 70 kDa besitzt. In den Überständen der untransfizierten Wildtyp-Zelllinie und der Kontrolltransfektante war kein lösliches CD44 detektierbar (Abb. 24A: 1F6 wt und 1F6 pcDNA3; ÜS + αCD44). Als Positivkontrolle wurde das membranständige CD44 der Zelllysate mit dem Hermes 3-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 24A: Lysate + αCD44). Als Negativkontrollen wurden Präzipitationen aus Lysaten und Überständen ohne Antikörperzugabe mit Protein A/G-Sepharose durchgeführt (Abb. 24A: Lysat-Kontrollen; ÜS-Kontrollen).

Das Molekulargewicht von löslichem solCD44sR150A und solCD44sR41A im Zellkulturüberstand von jeweils drei Transfektanten lag ebenfalls bei 75 kDa (Abb. 24B: 48 h ÜS). Die Menge des durch die Zelllinie 1F6 solCD44sR150A (c) exprimierten löslichen Proteins war, wie schon im ELISA zuvor festgestellt (Abb. 23), geringer als die der beiden anderen 1F6 solCD44sR150A-Transfektanten (Abb. 24: 48 h ÜS + αCD44). Als Positivkontrolle wurde auch hier das membranständige CD44 der Zelllysate mit dem Hermes 3-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 24B: Zelllysate + αCD44). Die transfizierten solCD44-cDNAs führen somit zur Expression von 75 kDa großen, löslichen Formen von CD44. Im Kulturüberstand der 1F6 Wildtyp-Zelllinie war auch hier keine lösliche Form von CD44 nachweisbar (Abb. 24B: 48h ÜS + αCD44; wt).

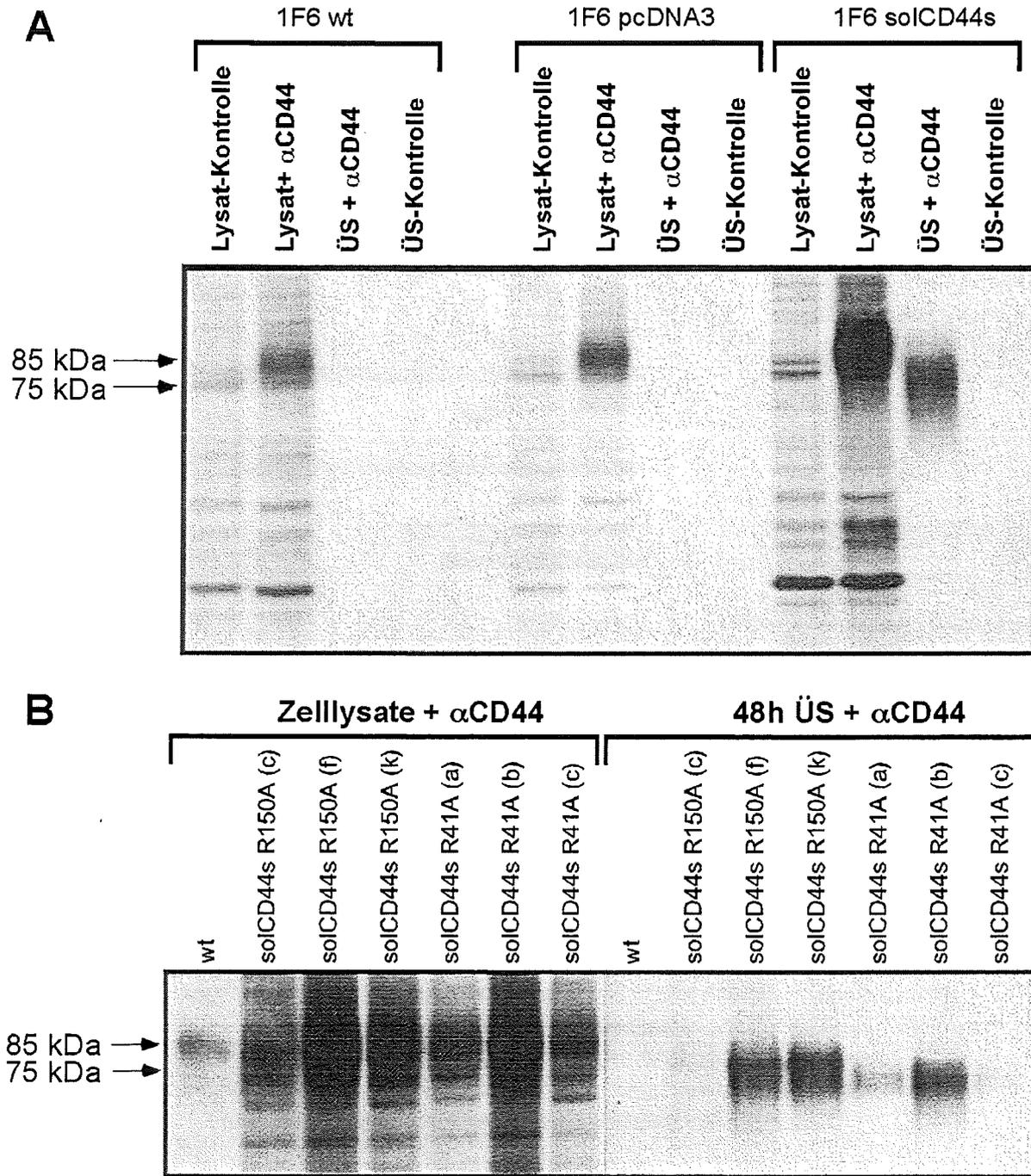


Abb. 24. Immunpräzipitation von [35 S]-Methionin/Cystein metabolisch markiertem CD44 aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen verschiedener lösliches CD44s sezernierender 1F6 Transfektanten. 1×10^6 Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen in 5 ml Medium ausgesät und für 48 h mit 750 μ Ci [35 S]-Methionin/Cystein pro Kulturschale markiert. Danach wurde CD44 aus den Zelllysaten und den Kulturüberständen mit dem panCD44-Antikörper Hermes 3 (5 μ g/ml) präzipitiert. Als Kontrolle wurden Präzipitationen ohne Zugabe des Antikörpers (Lysat-Kontrolle; ÜS-Kontrolle) durchgeführt. In **A** ist dies für 1F6 wt, eine Kontrolltransfektante (1F6 pcDNA3) sowie exemplarisch für eine solCD44 exprimierende Transfektante (1F6 solCD44s) gezeigt. **B** zeigt für jeweils drei solCD44sR41A sowie solCD44sR150A exprimierende Zellklone die Immunpräzipitation von CD44 aus 48 h Zellkulturüberständen (48h ÜS + α CD44) und Zelllysaten der Zelllinien (Zelllysate + α CD44). Buchstaben in Klammern indizieren dabei die verschiedenen Transfektantenklone.

3.4.3 Bindung von solCD44s sezernierenden Transfektanten an immobilisierte Hyaluronsäure

In FACS-Analysen der solCD44s exprimierenden Transfektanten wurden keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD44 und in der Bindung von HA-FITC durch die Zelllinien festgestellt. Die Sezernierung der verschiedenen löslichen CD44-Formen hatte somit keinen Einfluß auf die Bindung von löslicher HA-FITC (Daten nicht gezeigt). Dennoch könnte die Expression von löslichem CD44 vielleicht Auswirkungen auf die Bindung der Zellen an

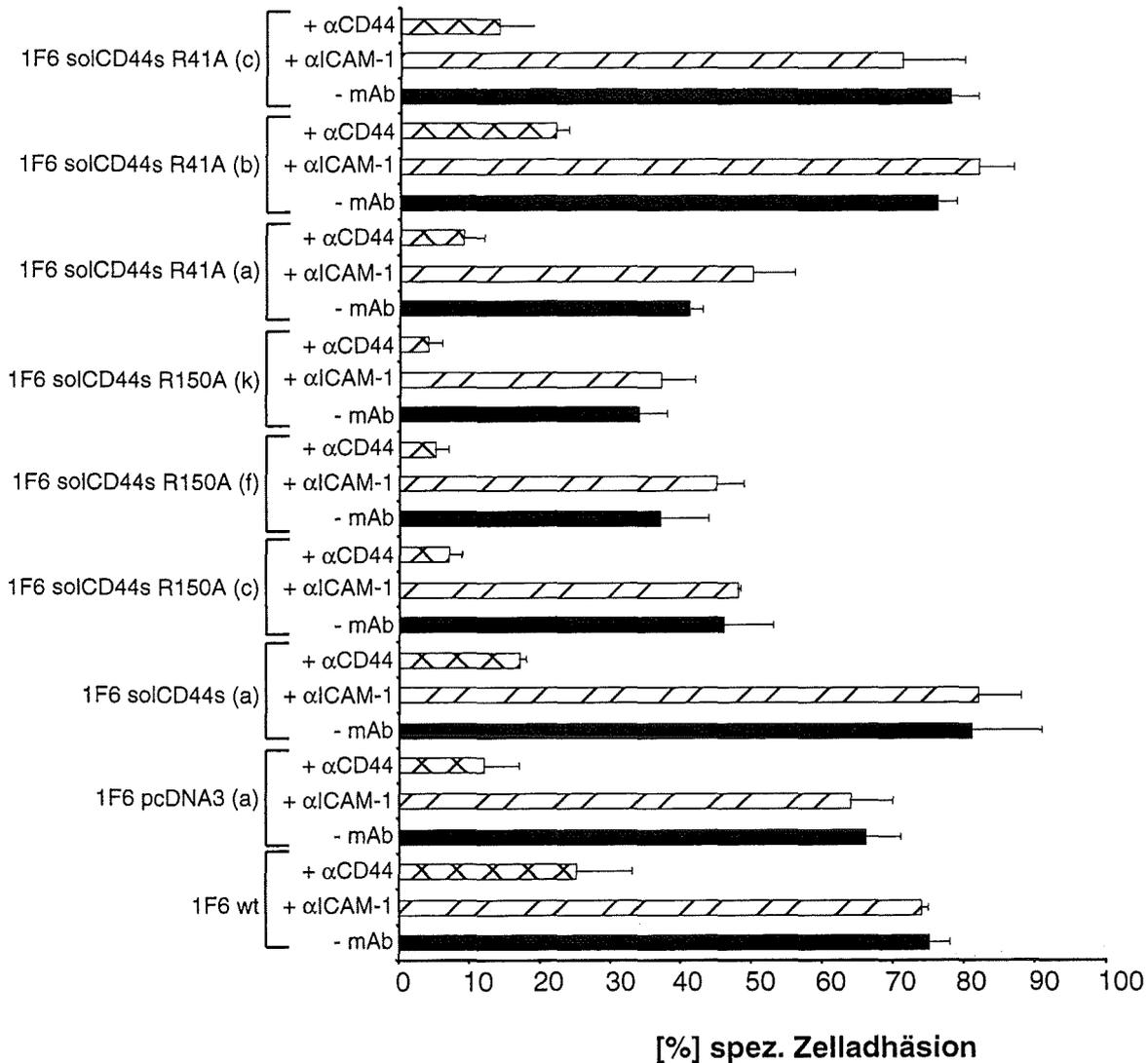


Abb. 25. Bindung von solCD44-Transfektanten der MM-Zelllinie 1F6 an immobilisierte Hyaluronsäure. Je 5×10^4 durch [^3H]-Thymidineinbau markierte Zellen wurden auf mit Hyaluronsäure (1 mg/ml) oder mit 1% BSA beschichtete 96-Lochplatten ausplattiert und für 45 min bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden nicht adhärenente Zellen abgenommen, die adhärenente Zellen geerntet und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Die Blockierung der HA-Bindung erfolgte durch Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern gegen CD44 (BU75, 10 µg/ml) und ICAM-1 (84H10, 10 µg/ml). Die Zelladhäsion ist als prozentualer Anteil adhärenente Zellen zur Gesamtzahl (=100%) eingesetzt Zellen angegeben, wobei die unspezifische [%] Bindung an BSA subtrahiert wurde. Es wurden Mittelwerte (gemessene Radioaktivität [cpm] der adhärenente Zellen einer Zelllinie) von sechs Meßwerten +/- Standardabweichung ins Verhältnis zu der gemessenen Radioaktivität [cpm] der 5×10^4 eingesetzten Zellen gesetzt.

immobilisierte Hyaluronsäure haben. Wir führten daher mit den solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A sezernierenden Transfektanten Bindungsversuche an immobilisierte Hyaluronsäure durch (Abb. 25). Zur Kontrolle wurde der Versuch mit nicht transfizierten 1F6 Wildtyp-Zellen und mit einer Kontrolltransfektante durchgeführt (Abb. 25: 1F6 und 1F6 pcDNA3 (a)). Für alle getesteten Zelllinien wurde dabei eine spezifische Zelladhäsion an Hyaluronsäure von 40-75% gemessen (Abb.25: - mAb). Die spezifische Zelladhäsion ist dabei als der prozentuale Anteil adhärenter Zellen an der Gesamtzahl eingesetzter Zellen definiert. Durch Vorinkubation der Zellen mit dem CD44-Antikörper BU75 konnte die HA-Bindung aller Zelllinien um 70-80% inhibiert werden (Abb. 25: + α CD44). Eine Vorinkubation der Zellen mit einem gegen ICAM-1 gerichteten Antikörper blieb dagegen ohne Auswirkungen (Abb. 25: + α ICAM-1). Die Adhäsion von solCD44s (Abb. 25: 1F6 solCD44s), von solCD44sR150A (Abb. 25: 1F6 solCD44sR150A) wie auch von solCD44sR41A (Abb. 25: solCD44sR41A) produzierenden Zellen an Hyaluronsäure wurde durch die Synthese von löslichem CD44 nicht wesentlich verändert. Die Adhäsion aller Zelllinien an Hyaluronsäure ist in diesem Versuchssystem (Adhäsion an Hyaluronsäure für 45 min bei 4°C) nach wie vor von membranständigem CD44 der 1F6 Zelllinie abhängig. Diese durch Oberflächen-CD44 vermittelte Adhäsion konnte in allen Zelllinien sehr effektiv durch Vorinkubation der Zellen mit einem α CD44-Antikörper blockiert werden.

3.4.4 Anreicherung von solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A aus konditionierten Kulturüberständen

Aufgereinigtes CD44HRg-Fusionsprotein konnte die Bindung von MV3 MM-Zellen an Hyaluronsäure blockieren (Abb. 19A). Es wäre möglich, daß Neusynthese von löslichem CD44 durch die Transfektanten die HA-Bindung von Zellen in einem Zeitraum von 45 min bei 4°C nicht wesentlich beeinflussen kann (Abb. 25). Aus Kulturüberständen angereichertes

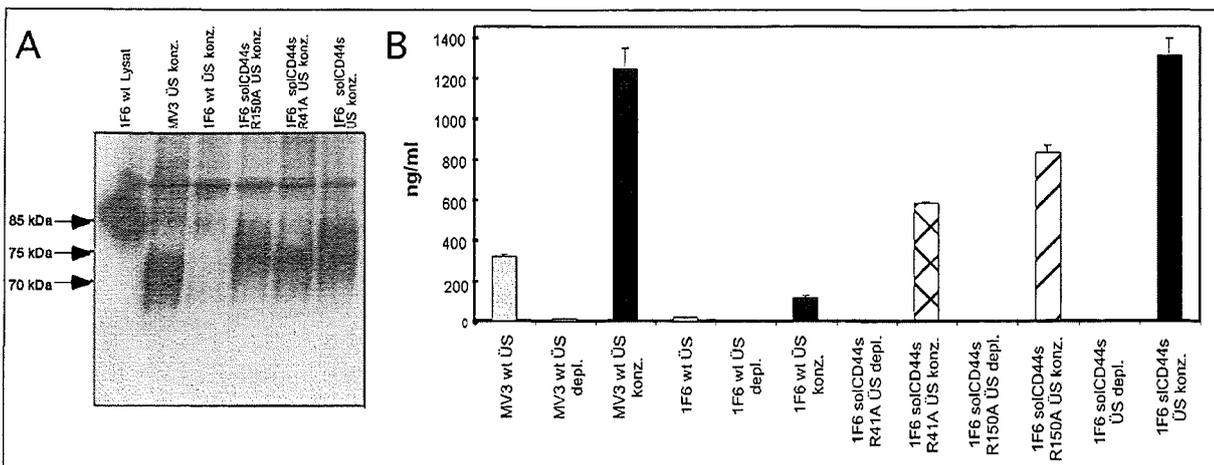


Abb. 26. Anreicherung von solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A aus Kulturüberständen der solCD44-Transfektanten und der MM-Zelllinien MV3 und 1F6 wt. 48 h Kulturüberstände wurden mit Amicon-Säulen für lösliches CD44 angereichert und im Western Blot nachgewiesen (A). 250 ng der durch ELISA-Messung in (B) quantifizierten Menge an löslichem CD44s wurde mit dem CD44-Antikörper IM7 und mit Hilfe von Protein A/G-Sepharose präzipitiert. Nach elektrophoretischer Trennung des Proteinpräzipitats durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis der löslichen Proteine erfolgte mit dem α CD44-Antikörper Hermes 3.

lösliches CD44 dieser Zelllinien könnte aber dennoch Bindungsstellen von membranständigem CD44 an Hyaluronsäure absättigen. Konditionierte 48 h Kulturüberstände der verschiedenen solCD44s-Transfektanten, der MV3 und der 1F6 wt MM-Zelllinien wurden daher mit Amicon-Säulen für lösliches CD44 angereichert (Abb. 26). Nach Bestimmung der Konzentration des angereicherten löslichen CD44 mit einem CD44-ELISA (Abb. 26B: ÜS konz. gegenüber ÜS depl.) wurden 250 ng lösliches CD44 der verschiedenen Zelllinien mit dem gegen CD44 gerichteten monoklonalen Antikörper IM7 immunpräzipitiert. Nach elektrophoretischer Trennung durch SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen wurden die löslichen Proteine mit dem Hermes 3-Antikörper nachgewiesen (Abb. 26A). Als Positivkontrolle für die Immunpräzipitation und den Western Blot von CD44 wurden 15 µg Proteinextrakt der 1F6 Wildtyp-Zelllinie verwendet (Abb. 26A: 1F6 wt Lysat). Das von den MV3 Zellen abgespaltene lösliche CD44 ist um etwa 5 kDa kleiner als die löslichen CD44-Formen der mit solCD44s-, solCD44sR150A- und solCD44sR41A-Expressionskonstrukten transfizierten Zellen. (Abb. 26A: MV3 ÜS konz.; 1F6 solCD44sR150A ÜS konz.; 1F6 solCD44sR41A ÜS konz.; 1F6 solCD44s ÜS konz.). Im Konzentrat des Zellkulturüberstandes der 1F6 wt Zellen wurde kein lösliches CD44 nachgewiesen (Abb. 26A und B: 1F6 wt ÜS konz.).

3.4.5 Die HA-Bindung von MM-Zellen ist durch sezerniertes solCD44s, nicht aber durch solCD44sR41A, solCD44sR150A oder proteolytisch abgespaltenes solCD44 inhibierbar

Der Einfluß der ankonzentrierten Kulturüberstände auf die Zelladhäsion wurde in einem Bindungsassay an immobilisierte Hyaluronsäure getestet (Abb. 27). HA-beschichtete 96-Lochplatten wurden mit solCD44 negativen oder mit auf eine Konzentration von 10 µg/ml lösliches CD44 angereicherten Überständen für 2 h bei 4°C vorinkubiert (Abb. 27: 1 mg/ml HA + ÜS konz. bzw ÜS CD44 neg.). Danach wurden die Platten gewaschen und 5×10^4 durch [³H]-Thymidineinbau markierte MV3 Zellen pro Plattenvertiefung für 30 min bei 4°C ausgesät. Die Platten wurden danach mehrfach gewaschen, die adhärenen Zellen wurden geerntet und die eingebaute Radioaktivität dieser adhärenen Zellen gemessen.

Nach 30 min adhärenen 60% der eingesetzten Zellen an mit Hyaluronsäure beschichtete Platten (Abb. 27: 1 mg/ml). Die unspezifische Bindung an mit BSA beschichtete Platten lag bei 10% (Abb. 27: 1% BSA-Kontrolle). Der Überstand der 1F6 wt Zelllinie konnte die HA-Bindung der Zellen nicht beeinflussen (Abb. 27: 1 mg/ml HA + 1F6 wt ÜS konz.). Die für mutiertes lösliches CD44 angereicherten Überstände von solCD44sR41A- und solCD44sR150A-Transfektanten hatten ebenfalls keinen Einfluß auf die Adhäsion der Zellen an Hyaluronsäure (Abb. 27: 1F6 solCD44sR41A ÜS konz. und 1F6 solCD44sR150A ÜS konz.). Auch das aus Überständen der MV3 Zelllinie ankonzentrierte, „natürliche“ lösliche CD44 zeigte keinen Effekt auf die HA-Bindung (Abb. 27: MV3 solCD44s ÜS konz.). Dies deckt sich mit früheren Versuchen, die mit aufgereinigtem, proteolytisch abgespaltenem CD44 dieser Zelllinie durchgeführt worden waren (Abb. 19). Das aus Überständen von solCD44s-cDNA transfizierten Zellen angereicherte lösliche CD44 konnte die HA-Bindung der MV3 Zellen dagegen vollständig blockieren (Abb. 27: 1F6 solCD44s ÜS konz.).

Für lösliches CD44 angereicherte Zellkulturüberstände der solCD44s-Transfektanten können die Zelladhäsion von MM-Zellen an Hyaluronsäure komplett inhibieren. Dieses künstlich produzierte lösliche CD44 kann mit der HA-Bindungsfunktion von membranständigem CD44

Ergebnisse

wirkungsvoll kompetitieren und die von CD44 abhängige HA-Bindung von MM-Zellen verhindern.

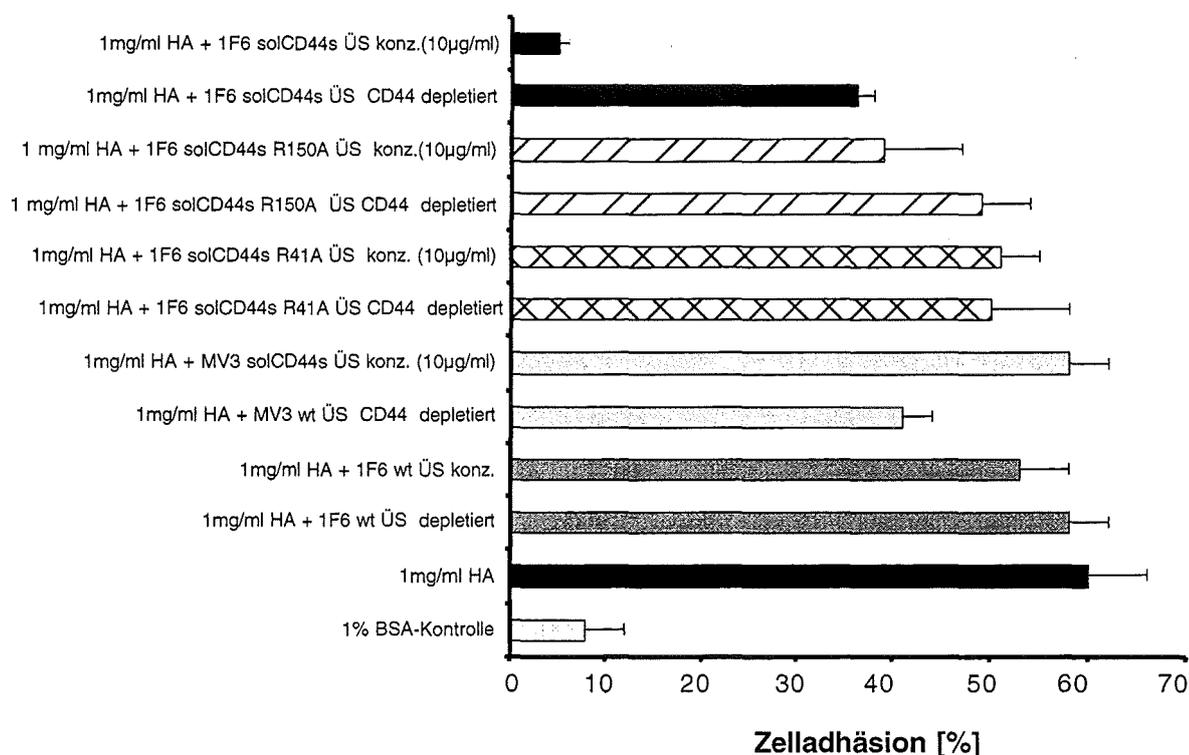


Abb. 27. Auswirkungen von angereichertem solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen an Hyaluronsäure. Mit HA vorbehandelte 96-Lochplatten wurden für 2 h bei 4°C mit 10 µg/ml der für solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A angereicherten Zellkulturüberständen vorinkubiert (ÜS konz.). Als Positivkontrolle diente die HA-Bindung der Zellen ohne Vorinkubation der Platten mit löslichem CD44 (1 mg/ml HA). Als weitere Kontrollen wurden die unspezifische Bindung an BSA (1% BSA-Kontrolle) und Bindung an Platten durchgeführt, die mit CD44-negativen Überständen vorinkubiert worden waren (ÜS CD44 depletiert). Nach mehreren Waschschritten wurden 5×10^4 durch [3 H]-Thymidineinbau markierte Zellen pro Plattenvertiefung für 30 min bei 4°C inkubiert und nach nochmaligem Spülen der Platten wurde der prozentuale Anteil adhärenter Zellen gegenüber der eingesetzten Ausgangszellzahl (=100%) bestimmt. Die Mittelwerte (gemessene Radioaktivität [cpm] der adhärenter Zellen) von vier Meßwerten +/- Standardabweichung wurden dabei ins Verhältnis gesetzt zu der gemessenen Radioaktivität [cpm] der 5×10^4 eingesetzten Zellen.

3.4.6 Konkurrenz von sezerniertem CD44s mit membranständigem CD44 inhibiert die HA-induzierte Steigerung der Proliferation von MM-Zellen *in vitro*

Die Kultivierung von Melanomzellen auf Hyaluronsäure führte zu einer Induktion der Proliferation, die von CD44 abhängig ist (Abb. 15). Wir waren daher interessiert, ob lösliches CD44 die hyaluronsäureabhängige Proliferationszunahme in diesem Versuchssystem beeinflussen kann. Die HA-induzierte Proliferationssteigerung konnte in den solCD44s-Transfektanten nicht beobachtet werden, zum Teil wurde die Basalproliferation der Transfektanten sogar verringert (Abb. 28). Durch Inkubation der MM-Zellen auf HA-beschichteten Platten konnte die Basalproliferation, die für jede der analysierten Zelllinien als 100% gesetzt wurde, für die 1F6 Wildtyp-Zelllinie um 60% gesteigert werden (Abb. 28: 1F6 + 1 mg/ml HA). Die Basalproliferation der einzelnen Zelllinien wurde durch den [3 H]-

Thymidineinbau von 2500 Zellen in 48 h auf unbeschichteten Platten definiert. Dieser lag für alle Zelllinien bei etwa 40000 cpm (Daten nicht gezeigt). Bei den beiden Kontrolltransfektanten wurde ebenfalls eine Steigerung der Proliferation gegenüber der Grundproliferation gemessen, wenn auch im Fall von 1F6 pcDNA3 nicht in dem gleichen Ausmaß wie bei 1F6 wt (Abb. 28: 1F6 pcDNA3 und 1F6 pcDNA3 (a)). Die vier solCD44s sezernierenden Transfektantenklone zeigten eine Inhibition der Basalproliferation um 30%.

Die HA-induzierte Proliferation von MM-Zellen ist somit durch konstitutive Sezernierung von löslichem CD44 inhibierbar (Abb. 28: 1F6 solCD44s + 1 mg/ml HA). Die Auswirkungen von löslichem CD44 gehen dabei über die Wirkung des CD44-Antikörpers BU75 in Abb. 15 hinaus, wo die HA-induzierte Proliferation auf die Grundproliferation verringert werden konnte. Lösliches CD44 kann durch Konkurrenz mit membranständigem CD44 der MM-Zellen die HA-abhängige Steigerung der Proliferation *in vitro* inhibieren. Diese Hemmung der Proliferation von Melanomzellen fällt auf etwa 70% der Basalproliferation der einzelnen Zellklone ab. Diese Daten deuten zudem darauf hin, daß konstitutiv sezerniertes CD44 eine zusätzliche, über Hyaluronsäure vermittelte, proliferationsinhibierende Wirkung haben könnte.

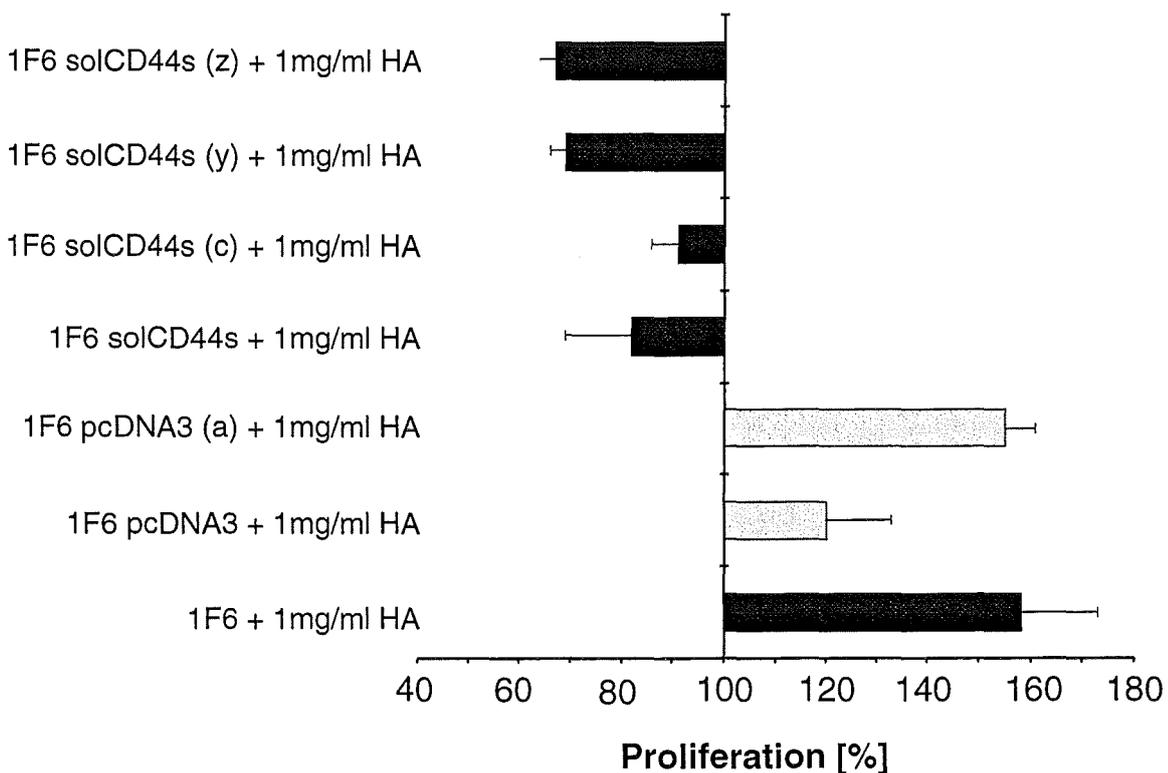


Abb. 28. Lösliches, konstitutiv von Zellen sezerniertes CD44s inhibiert die HA-induzierte Steigerung der Proliferationskapazität von 1F6 Melanomzellen. 2500 Melanomzellen der angegebenen Transfektanten wurden auf unbeschichtete oder mit 1 mg/ml HA beschichtete 96-Lochplatten ausgesät und direkt mit 1 μ Ci [3 H]-Thymidin pro Plattenvertiefung markiert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und der [3 H]-Thymidineinbau in die DNA gemessen. Die Daten sind als prozentuale Steigerung oder Inhibition gegenüber der Basalproliferation der einzelnen Zelllinien dargestellt, die als 100% Proliferation gesetzt wurde. Die Basalproliferation entspricht dabei dem Mittelwert aus vier Meßwerten +/- Standardabweichung der [3 H]-Thymidinaufnahme von 2500 Zellen in 48 h auf unbeschichteten Platten.

3.4.7 Konkurrenz von sezerniertem solCD44s mit membranständigem CD44 inhibiert das Tumorwachstum von MM-Zellen *in vivo*

Die Auswirkungen dieses HA-bindenden, von den solCD44s-Transfektanten sezernierten löslichen CD44 auf das Tumorwachstum der MM-Zellen wurde in MF1-Nacktmäusen *in vivo* untersucht. Dazu wurden je 5×10^6 pathogenfreie Melanomzellen subkutan in jeweils fünf

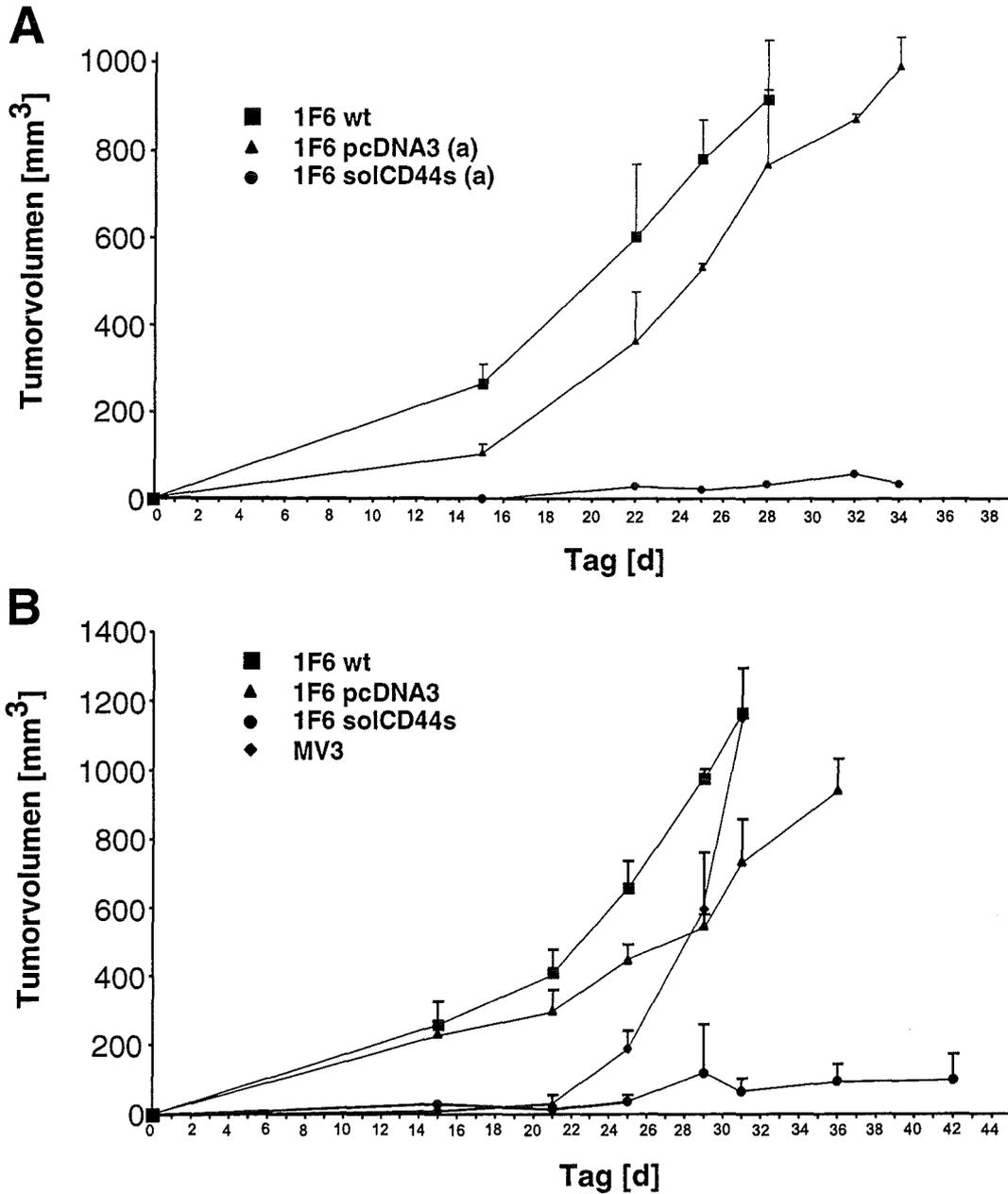


Abb. 29. Die Expression von solCD44s blockiert das Tumorwachstum von 1F6 MM-Zellen in MF1-Nacktmäusen. 5×10^6 mycoplasmenfreie Melanomzellen wurden in 0,1 ml PBS subkutan in jeweils 5 Tiere pro Gruppe injiziert. Die Tiere wurden täglich kontrolliert und an jedem zweiten Tag wurde das Tumolvolumen gemessen. In A wurden die Zelllinien 1F6 wt, 1F6 pcDNA3 (Kontrolltransfektante) und die solCD44s sezernierende Transfektante 1F6 solCD44s (a) injiziert. In B wurden nochmals die Wildyp-Zelllinie 1F6, eine zweite Kontrolltransfektante (1F6 pcDNA3) und eine weitere solCD44s-Transfektante (1F6 solCD44s) injiziert. In diesem Versuch wurden zudem je 5×10^6 Zellen der proteolytisch löslichen CD44 abspaltenden MM-Zelllinie MV3 in fünf Nacktmäuse injiziert.

Tiere einer Gruppe injiziert und das Tumorwachstum über 35-42 Tage beobachtet und gemessen (Abb. 29). Diese Experimente wurden mit unterschiedlichen Klonen von Kontrolltransfektanten (Abb. 30A und B: 1F6 pcDNA3 (a) und 1F6 pcDNA3), lösliches CD44 sezernierenden solCD44s-Transfektanten (Abb. 29A und B: 1F6 solCD44s (a) und 1F6 solCD44s) sowie der 1F6 Wildtyp-Zelllinie (Abb. 29A und B: 1F6 wt) durchgeführt. Dabei wurde eine fast vollständige Inhibition des Tumorwachstums durch die Expression von löslichem CD44 beobachtet. Die 1F6 wt Zelllinie und die Kontrolltransfektanten bildeten dagegen schnell wachsende Primärtumore. Die MM-Zelllinie MV3, die nicht HA-bindendes lösliches CD44 von der Zelloberfläche proteolytisch abspaltet, wurde ebenfalls auf ihr Tumorwachstum *in vivo* untersucht (Abb. 29B: MV3). Die Zellen der Zelllinie MV3 zeigten dabei ein Tumorwachstum in Nacktmäusen, das dem der 1F6 Wildtyp-Zelllinie und dem der Kontrolltransfektanten gleich ist (Abb. 29B).

Das proteolytisch abgespaltene CD44 der Zelllinie MV3 kann das Tumorwachstum *in vivo* nicht inhibieren. Eine Kompetition von proteolytisch abgespaltenem CD44 mit membranständigem CD44 findet hier offenbar nicht statt. Die HA-Bindung dieser Zelllinie war *in vitro* durch proteolytisch abgespaltenes CD44 ebenfalls nicht beeinflussbar (Abb. 27). Proteolytisch abgespaltenes CD44 der Zelllinie MV3 hat somit keinen Einfluß auf die durch HA-Bindung vermittelten Funktionen des membranständigen CD44 dieser Zelllinie.

Im Gegensatz dazu ergänzen die *in vivo* erzielten Daten für künstlich produziertes, sezerniertes CD44 die *in vitro* gewonnenen Proliferations- und Adhäsionsdaten, wo die Proliferation und Zelladhäsion von MM-Zellen durch die konstitutive Produktion des sezernierten löslichen CD44 inhibiert werden konnte. Der Mechanismus dieser das Tumorwachstum inhibierenden Wirkung liegt in einer wirkungsvollen Kompetition von sezerniertem löslichem CD44 mit membranständigem CD44 der Zellen um Bindungsstellen für Hyaluronsäure. Die Expression von löslichem CD44 in der MM-Zelllinie 1F6 führt *in vitro* zu einer Blockierung der Adhäsion von Melanomzellen an die ECM-Komponente Hyaluronsäure. Durch diese Inhibition der Interaktion von membranständigem CD44 auf der Oberfläche von MM-Zellen mit Hyaluronsäure ist auch die proliferationssteigernde Wirkung von Hyaluronsäure aufgehoben.

MM-Zellen, die kein lösliches CD44 produzieren, erzeugen nach subkutaner Injektion *in vivo* schnell wachsende Tumore in Nacktmäusen. Die Entstehung von Tumoren wird dagegen vollständig blockiert, wenn MM-Zellen konstitutiv HA-bindendes lösliches CD44 in die extrazelluläre Matrix abgeben und damit HA-abhängige Zellrezeptorfunktionen von membranständigem CD44 stören.

4 Diskussion

4.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in verschiedenen Stadien des malignen Melanoms

Die Expression von CD44-Isoformen und ICAM-1 ist als prognostischer Faktor für das maligne Melanom beschrieben worden (Johnson *et al.*, 1989; Manten-Horst *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1997). Die Expression des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM/IHABP in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms ist bislang noch nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurde zunächst die Expression der bislang beschriebenen Hyaluronsäurerezeptoren CD44 und RHAMM/IHABP sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Gewebeschnitten von Melanompatienten und in Melanomzelllinien untersucht. In nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluß der extrazellulären Matrixkomponente Hyaluronsäure auf die Bindung von MM-Zellen und die damit verbundenen Konsequenzen für die Proliferation und die Synthese von Wachstumsfaktoren untersucht.

4.1.1 Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP *in vivo* und *in vitro*

Die vergleichende Analyse der Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP auf Gewebeschnitten von gutartigen Nävi melanozytären Ursprungs, Primärtumoren des malignen Melanoms und schließlich kutanen Metastasen des malignen Melanoms zeigte eine erhöhte Expression von panCD44, ICAM-1 sowie von RHAMM/IHABP in verschiedenen Entwicklungsstufen des malignen Melanoms (Abb. 4). Eine schwache Expression dieser drei Proteine war zunächst in Nävuszellen zu detektieren. Gutartige Nävi können als Vorläuferläsionen des malignen Melanoms betrachtet werden. Dies macht Nävi zu einem geeigneten Gegenstand für die Untersuchung der Entstehung von Primärtumorzellen des malignen Melanoms. Primärtumore des Melanoms exprimieren im Vergleich zu Nävuszellen verstärkt CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP. Diese Überexpression ist in kutanen Melanommetastasen noch weiter verstärkt (Abb. 4).

Die Überexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP *in vivo* konnte in Northern Blot-Analysen auf Ebene der Transkription für verschiedene MM-Zelllinien bestätigt werden (Abb. 5). Als Kontrollen für die Untersuchungen *in vitro* wurden primäre Melanozyten der Haut verwendet, die als nicht transformierte Primärzellen die Ausgangszellen der Entwicklung des malignen Melanoms darstellen. Im Unterschied zu primären Melanozyten ist die Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in den Zelllinien MV3, HT144 und 1F6 stark erhöht (Abb. 5). In Experimenten, bei denen diese Zelllinien subkutan in Nacktmäuse injiziert worden waren, war ein beschleunigtes Tumorwachstum dieser Zellen gegenüber den Zelllinien MM1 und SB3 festgestellt worden (Daten nicht gezeigt). Ein hohes Metastasierungspotential ist für die Zelllinie MV3 beschrieben worden (Van Muijen *et al.*, 1995). Auf Transkriptionsebene ist die Expression von CD44 in den Melanomzelllinien MV3, HT144 und 1F6 gegenüber den Zelllinien MM1 und SB3 stark erhöht. Melanozyten exprimieren CD44 signifikant schwächer als die, aus kutanen Metastasen isolierten, Melanomlinien MV3, HT144 und 1F6. Die Expression von ICAM-1 und RHAMM/IHABP

war in den untersuchten Melanomzelllinien gegenüber primären Melanozyten durchgehend stark erhöht (Abb. 5). Die Untersuchung von Gewebeschnitten *in vivo* sowie der RNA-Expression *in vitro* konnte somit die zunehmende Expression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP mit verschiedenen Entwicklungsstufen des malignen Melanoms korrelieren.

Die Bedeutung varianter Isoformen von CD44 scheint beim malignen Melanom eine untergeordnete Rolle zu spielen. In einer Publikation wurde die Hochregulation der Isoform CD44v5 während der Progression des Melanoms postuliert, weil CD44v5-Transkripte in stark metastasierenden und nicht in schwach metastasierenden Zelllinien gefunden wurden (Manten-Horst *et al.*, 1995). In einer weiteren Untersuchung von Gewebeproben von Melanompatienten konnte dies nicht bestätigt werden (Simon *et al.*, 1996). Hier wurden in Nävuszellen, primären Melanomen und MM-Metastasen CD44v7/8- und CD44v10-Isoformen gefunden, nicht aber CD44v5- oder CD44v6-Epitope. Mittels RT-PCR untersuchten wir MM-Zelllinien und Melanozyten auf die Expression alternativ gespleißter CD44-Exons. Mit CD44-spezifischen Primern wurde in allen untersuchten MM-Zelllinien ein CD44v8-v10-Spleißprodukt amplifiziert (Abb. 6). Diese v8-v10-Spleißvariante war in primären Melanozyten nur sehr schwach nachweisbar. In RT-PCR-Experimenten mit Verwendung von Oligonukleotiden, die spezifisch konstante Exons von CD44 erkennen, versuchten wir die Häufigkeit dieser alternativen Spleißformen von CD44 gegenüber der konstanten Form von CD44 zu zeigen. Dabei wurde nur die konstante Spleißform von CD44 amplifiziert (Abb. 7). Das Auftreten einer signifikanten Menge von mRNA-Spezies, die alternativ gespleißte, variante CD44-Exons enthalten, hätte in diesen Experimenten zu zusätzlichen amplifizierten Produkten führen müssen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit haben CD44-Antikörper, die spezifisch gegen CD44v9 oder gegen CD44v6 gerichtet sind, in HA-Bindungsversuchen (Abb. 19) und bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Abb. 20) keine Effekte erzielt. Die funktionelle Bedeutung von CD44 beim malignen Melanom liegt wohl eher in der gegenüber Primärzellen erhöhten Expression der konstanten CD44s-Isoform und in der weiter unten diskutierten Rolle von löslichen Formen des Moleküls.

4.1.2 Cytoplasmatische Lokalisierung von RHAMM/IHABP

Die Proteinexpression von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP in Melanomzellen und Melanozyten wurde mit FACS-Analysen (Abb. 8 und Abb. 9) und Western Blots überprüft. Dabei konnten die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen bestätigt werden. Im Widerspruch zu Veröffentlichungen, die für den HA-Rezeptor RHAMM/IHABP eine membranständige Lokalisierung postuliert hatten (Turley *et al.*, 1990; Hardwick *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 1993), konnten wir RHAMM/IHABP nicht auf der Zelloberfläche von MM-Zellen nachweisen (Abb. 9). In unseren Experimenten mit einem polyklonalen RHAMM/IHABP-Antiserum (Assmann *et al.*, 1998) war RHAMM/IHABP eindeutig als cytoplasmatisches Protein detektierbar. In zwei parallelen Studien wurde die intrazelluläre Lokalisation von RHAMM/IHABP ebenfalls bestätigt. In einer Reihe von Mamma-Karzinomzelllinien wurde RHAMM/IHABP als ein 85 kDa großes Protein im Cytoplasma exprimiert (Assmann *et al.*, 1998). Parallel dazu wurde RHAMM/IHABP intrazellulär als 95 kDa-Protein in mehreren Fibrosarkomzelllinien der Maus gefunden (Hofmann *et al.*, 1998a). Aufgrund der proteinchemischen Daten wurde das Protein von Hofmann *et al.* als IHABP (Intracellular HA Binding Protein) bezeichnet. Von einer cytoplasmatischen Lokalisierung von

RHAMM/IHABP wurde auch in humanen Bronchial-Karzinomzelllinien (Teder *et al.*, 1995) und in menschlichen Epithelzellen der Retina (Da Cruz *et al.*, 1996) berichtet.

Eine ubiquitäre Expression von RHAMM/IHABP wurde bei einer Analyse verschiedener muriner Gewebe gefunden (Fieber *et al.*, 1999). Wir haben eine schwache Expression von RHAMM/IHABP sowohl in Keratinozyten der Epidermis wie auch in einigen der primären Melanozytenkulturen beobachtet (Abb. 4 und Abb. 5). Diese Expression war allerdings erheblich schwächer als die in transformierten Tumorzellen festgestellte RHAMM/IHABP-Expression. In Western Blots von Totallysaten mehrerer MM-Zelllinien konnten wir spezifisch ein RHAMM/IHABP-Protein mit einer Größe von 85-90 kDa nachweisen. Die stimmt mit den Daten von Assmann *et al.* überein (Abb. 10). RHAMM/IHABP war dabei in einem Totallysat einer primären Melanozytenkultur nicht nachweisbar (Abb. 10). In diesen Western Blots waren in MM-Zellen zusätzlich 72-76 kDa-Formen von RHAMM/IHABP nachweisbar. Diese könnten durch alternatives Spleißen, den Glykosylierungsstatus des Proteins, oder aber auch durch Proteindegradation entstanden sein. In RT-PCR-Experimenten, die mit unterschiedlichen RHAMM/IHABP-spezifischen Oligonukleotidpaaren durchgeführt wurden, konnten keine mRNA-Spezies amplifiziert werden, die für ein 72-76 kDa großes Protein kodieren könnten (Daten nicht gezeigt).

Eine HA-Bindungsfunktion von cytoplasmatischem RHAMM/IHABP konnte gezeigt werden (Assmann *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 1998). Welche Bedeutung RHAMM/IHABP als intrazellulärer HA-Rezeptor besitzen könnte, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Die erhöhte Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms lassen aber auf eine mögliche Funktion diese HA-bindenden Proteins in der Entwicklung des malignen Melanoms schließen.

4.1.3 Die Bindung von Hyaluronsäure durch Melanomzellen ist CD44-abhängig

Die Funktion von CD44, ICAM-1 und RHAMM/IHABP bei der HA-Bindung wurde durch HA-Bindung von Zellen an immobilisierte und lösliche Hyaluronsäure ermittelt (Abb. 14 und Abb. 12). Mit CD44Rg-Fusionproteinen (Aruffo *et al.*, 1990) hatten wir zunächst die effiziente Beschichtung von 96-Lochplatten mit Hyaluronsäure überprüft (Abb. 13). Dabei hatte das HA-bindende CD44HRg-Fusionsprotein dreimal besser an Hyaluronsäure gebunden als die nicht HA-bindenden CD44ERg- und CD44HR41ARg-Fusionsproteine, die nur sehr schwach an die beschichteten Platten gebunden hatten (Abb. 13). Dies war ein wichtiges Kontrollexperiment für die nachfolgenden Bindungsversuche an immobilisierte Hyaluronsäure, die Proliferationstests, wie auch für die Versuche zur HA-abhängigen Synthese von Wachstumsfaktoren.

Die Vorinkubation von MM-Zellen mit monoklonalen, gegen CD44 gerichteten Antikörpern, die mit der HA-Bindungsfunktion von CD44 interferieren (Levesque und Haynes, 1996; Weiss *et al.*, 1998), führte zu einer 60-70-prozentigen Inhibition der HA-Bindung von MM-Zellen. Diese Inhibition der HA-Bindung wurde sowohl für die Bindung an immobilisierte (Abb. 14) wie auch an lösliche Hyaluronsäure erzielt (Abb. 12). Im Gegensatz dazu konnten Antikörper gegen CD44v9 enthaltende Isoformen, gegen ICAM-1 und alle zur Verfügung stehenden RHAMM/IHABP-Antisera die HA-Bindung der MM-Zellen nicht beeinflussen (Abb. 14). Die Bindung exogener Hyaluronsäure durch Melanomzellen ist somit CD44-

abhängig. Dies reproduziert und erweitert Ergebnisse, die mit MM-Zellen und einigen monoklonalen CD44-Antikörpern für die Bindung an immobilisierte Hyaluronsäure erzielt worden sind (Van Muijen *et al.*, 1995). Die Hemmung der HA-Bindung von MM-Zellen durch die α CD44-Antikörper MEM85 und BU75 war niemals vollständig. Die Adhäsion von MM-Zellen an Hyaluronsäure über CD44 kann durch viele Motive des Moleküls beeinflusst werden (Bartolazzi *et al.*, 1996). Es ist wahrscheinlich, daß die verwendeten Antikörper durch Bindung an ein bestimmtes Epitop von CD44 nicht alle HA-Bindungsmotive des Proteins gleichzeitig blockieren können. Diese Vermutung wird durch Experimente unterstützt, die mit dem CD44-Antikörper BU75 in einem anderen Zusammenhang durchgeführt worden waren. Beim Nachweis des sezernierten solCD44sR150A/R154A-Proteins in Immunpräzipitationen und Western Blots detektierte der Antikörper sowohl nicht mutiertes lösliches CD44 wie auch lösliches solCD44sR41A. Lösliches solCD44sR150A/R154A konnte aufgrund der eingeführten Aminosäurenaustausche dagegen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Spezifität der Antikörperbindung an ein bestimmtes Epitop könnte HA-Bindung noch über andere Domänen von CD44 vermittelt werden.

Berichte, die ICAM-1 eine HA-bindende Funktion zugeschrieben hatten (McCourt *et al.*, 1994), sind vor kurzem in einem Artikel derselben Autoren berichtigt worden (McCourt und Gustafson, 1997). In der ersten Publikation war ICAM-1 als ein HA-bindendes Protein durch Bindung an eine HA-Sepharose-Matrix aus Endothelzellen der Leber isoliert worden (McCourt *et al.*, 1994). Die HA-Sepharose-Matrix war durch Bindung der Hyaluronsäure über einen Hexamethylen-Anker an Sepharose hergestellt worden (McCourt *et al.*, 1994). In dem neueren Artikel wurde nun berichtet, daß ICAM-1 auch direkt an diesen Hexamethylen-Anker binden kann, wofür keine Interaktion mit Hyaluronsäure notwendig ist (McCourt und Gustafson, 1997). Eine Funktion von ICAM-1 als HA-Rezeptor wird daher nicht mehr angenommen. Wir haben in keinem der HA-Bindungsversuche eine Beteiligung von ICAM-1 an der HA-Bindung von Melanomzellen finden können. Aufgrund der Überexpression des Moleküls in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms haben wir ICAM-1 dennoch in alle hier beschriebenen Versuche miteinbezogen.

4.1.4 Hyaluronsäure induziert eine Proliferationssteigerung von MM-Zellen

Welche Konsequenzen hat die Interaktion von zellulären Rezeptoren mit Hyaluronsäure für Melanomzellen? Die Antwort auf diese Frage wird vor allem in der Untersuchung von Migration und Proliferation gesucht. Melanomzellen sind von einer HA-reichen ECM umgeben, die sie durch endogene Hyaluronsäuresynthese noch zusätzlich anreichern (Goebeler *et al.*, 1996 und Abb. 11). Wechselwirkungen von membranständigem CD44 mit Hyaluronsäure beschleunigen die Migration von Melanomzellen (Thomas *et al.*, 1992). Eine CD44-abhängige, erhöhte Migration durch HA-beschichtete Filter wurde für stark metastasierende gegenüber schwach metastasierenden Melanomzellen beschrieben (Goebeler *et al.*, 1996).

In der Literatur finden sich einige Beispiele, wie die Proliferation von Zellen durch Zugabe von Hyaluronsäure stimuliert werden kann. So stimuliert Hyaluronsäure die Proliferation von Fibroblasten (Greco *et al.*, 1998). Hyaluronsäure hat eine kostimulatorische Wirkung auf die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen (Galandrini *et al.*, 1994). Eine von CD44 abhängige

Induktion der Proliferation durch Hyaluronsäure ist für menschliche Eosinophile (Hamann *et al.*, 1995) und Milzzellen der Maus (Rafi *et al.*, 1997) beschrieben worden. Der Verlust von CD44 durch eine zielgerichtete "Antisense"-Strategie führte in Keratinozyten zu einer Reduktion der HA-Bindungsfähigkeit, einer Blockierung der HA-Aufnahme und einer verminderten Proliferation der Keratinozyten. Die Hyaluronsäuresynthese der Keratinozyten blieb dagegen unverändert (Kaya *et al.*, 1997).

Die Bedeutung der HA-Bindung durch CD44 für das Tumorwachstum von Melanomzellen in Nacktmäusen wurde durch Überexpression von HA-bindendem CD44s und einer in der HA-Bindungsdomäne mutierten Form von CD44 in CD44-negativen Melanomzellen gezeigt (Bartolazzi *et al.*, 1994). Nach subkutaner Injektion war die Bildung eines Primärtumors durch Zellen beschleunigt, die CD44s exprimierten. Das Tumorwachstum von Zellen, die ein in der HA-Bindungsdomäne mutiertes CD44 exprimierten, wurde dagegen inhibiert (Bartolazzi *et al.*, 1994).

Eine durch Hyaluronsäure vermittelte Steigerung der Proliferation von Melanomzellen ist bislang nicht beschrieben worden. Mit dem *in vitro*-Proliferationssystem, das in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation von Melanomzellen durch Kultivierung mit Hyaluronsäure gezeigt werden (Abb. 15 und Abb. 28). Der durch Hyaluronsäure induzierte Proliferationsanstieg konnte durch den α CD44-Antikörper BU75 vollständig inhibiert werden (Abb. 15). Die Interaktion von Hyaluronsäure mit membranständigem CD44 der Melanomzellen führte zu einer Steigerung der Proliferation um 40-60% (Abb. 15 und Abb. 25). Dieser Anstieg *in vitro* könnte metastasierenden Melanomzellen *in vivo* einen wichtigen Selektionsvorteil verschaffen.

Eine wichtige Voraussetzung für diese und nachfolgend diskutierte Versuche war die Reinheit der verwendeten Hyaluronsäurepräparation. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Hahnenkamm-Hyaluronsäure verwendet, die unter Umständen mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen verunreinigt sein könnte. Um Auswirkungen solcher möglichen Kontaminationen zu vermeiden, haben wir die Hyaluronsäurepräparationen einer Hitzebehandlung unterzogen, um möglicherweise vorhandene Wachstumsfaktoren und Zytokine zu inaktivieren.

4.1.5 Bedeutung autokriner Wachstumsfaktoren und Zytokine für die Proliferation von Melanomzellen

Eine erhöhte Proliferation von Zellen kann mit einer erhöhten Sekretion autokrin und parakrin wirkender Wachstumsfaktoren verbunden sein. Metastatische Melanomzellen exprimieren verschiedene autokrin wirkende Zytokine und Wachstumsfaktoren (Shih *et al.*, 1993; Mattei *et al.*, 1994). Dazu gehören TGF- α , TGF- β , IL-1 α , IL-6, IL-8, PDGF-AB, Gro α und bFGF (Shih *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Kultivierung von Melanomzellen auf mit Hyaluronsäure beschichteten Platten zu einer dreifachen Induktion der Synthese von bFGF und einem zweifachen Anstieg der Produktion von TGF- β 1 führt (Abb. 16). Die Expression aller anderen untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren blieb unverändert (IL-8, PDGF-AB, Gro α) oder war nicht nachweisbar (IL-1 α und IL-6).

BFGF ist ein essentieller Wachstumsfaktor für Melanozyten der Haut. Metastatische Melanomzellen sind zu einer Eigensynthese dieses Wachstumsfaktors fähig. Die Blockierung von bFGF oder des bFGF-Rezeptors konnte in menschlichen Melanomzellen das Tumorstadium inhibieren (Wang und Becker, 1997). Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit Heparansulfat-modifizierter Isoformen von CD44, bFGF binden und an die hochaffinen FGF-Rezeptoren weiterleiten zu können (Bennet *et al.*, 1995a; Sherman *et al.*, 1998). Dies wurde bislang allerdings nur in CD44v3 enthaltenden Isoformen entdeckt, so daß eine solche Bindung in Melanomzellen eher unwahrscheinlich ist.

Die Überproduktion von TGF- β 1 wurde in einer Vielzahl von Neoplasien entdeckt, darunter auch beim malignen Melanom (Albino *et al.*, 1991; Rodeck *et al.*, 1994). Der Vorteil, den Tumorzellen durch die Expression von TGF- β 1 gewinnen könnten, liegt dabei vor allem in der Ausübung eines lokalen immunsuppressiven Effektes wie der Hemmung der Lymphozytenproliferation (Tada *et al.*, 1991).

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren nach Kultivierung von Melanomzellen auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix ist in mehreren Publikationen beschrieben worden. So führt die Kultivierung von MM-Zellen auf Fibronectin zu einer Aufregulation von IL-1 α , IL-6, IL-8 und TGF- β 2 (Lupetti *et al.*, 1996). Die Kultivierung einer primären Melanomzelllinie auf Matrigel, einer Mischung aus verschiedenen ECM-Substanzen, führte zu einer Proliferationssteigerung, die mit einer Resistenz gegenüber inhibitorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 α , TGF- β und TNF- α einherging (Kobayashi *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit beschriebene zusätzliche Synthese von bFGF und TGF- β 1 bei Inkubation von Melanomzellen auf Hyaluronsäure könnte für den Anstieg der Proliferation mitverantwortlich sein. Eine direkte Beteiligung von CD44 bei der Induktion dieser Wachstumsfaktoren konnte bislang nicht gezeigt werden. Der Mechanismus dieser Induktion könnte aber durchaus CD44-abhängig sein. Die Ergebnisse der HA-Bindungsexperimente (Abb. 14) und der Proliferationsversuche (Abb. 15) legen diesen Schluß zumindest nahe.

CD44, ICAM-1 und RHAMM/THABP werden in verschiedenen Entwicklungsstufen des malignen Melanoms stark überexprimiert. CD44 ist dabei der für die Bindung von Hyaluronsäure entscheidende Oberflächenrezeptor in Melanomzellen. Die Bindung von Hyaluronsäure an CD44 führt zu einer CD44-abhängigen, signifikanten Zunahme der Proliferation von MM-Zellen. Die Kultivierung von MM-Zellen auf Hyaluronsäure ist mit einer verstärkten Synthese der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β 1 verbunden, die über einen autokrinen oder parakrinen Wirkungsmodus die Proliferation von MM-Zellen anregen oder Melanomzellen einen Proliferationsvorteil *in vivo* gegenüber ihrer Umgebung verschaffen könnte.

4.2 Analyse von löslichem CD44s (solCD44s)

4.2.1 Der prognostische Wert von löslichem CD44 in verschiedenen Entwicklungsstadien des malignen Melanoms

Lösliche Adhäsionsmoleküle wie lösliches ICAM-1 (Becker *et al.*, 1991; Harning *et al.*, 1991; Seth *et al.*, 1991; Shijubo *et al.*, 1992), lösliches CD44s oder lösliche, variante CD44-Isoformen sind als prognostische Marker in verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben worden. Lösliches CD44 wurde als Indikator von Tumorlast und Metastasierungsgrad bei Patienten mit Magen- und Darmkrebs beschrieben (Guo *et al.*, 1994b). Erhöhte Serumwerte von löslichem solCD44v5 sowie löslichem solCD44v6, nicht aber von solCD44s-Konzentrationen, wurden in Brustkrebspatientinnen gefunden (Martin *et al.*, 1997). Bei einer Untersuchung von Serum von Patienten mit primärem malignen Melanom oder metastasierendem malignen Melanom wurden keine signifikanten Veränderungen der Werte für lösliches CD44s, CD44v5, CD44v6 sowie CD44v10 gemessen (Schaidler *et al.*, 1997). Ob lösliche CD44-Isoformen daher als prognostische Marker für das maligne Melanom verwendet werden können, ist eher fraglich.

4.2.2 Funktionelle Analyse von proteolytisch abgespaltenem löslichem CD44

Melanomzellen spalten *in vitro* durch Proteolyse CD44 von der Zelloberfläche ab (Abb. 17). Wir wollten sich daraus ergebende funktionelle Konsequenzen für die Proliferation von Melanomzellen untersuchen. Lösliches CD44 wurde dafür aus Kulturüberständen der Zelllinie MV3 aufgereinigt, um es in funktionellen Experimenten einsetzen zu können (Abb. 18). Als Kontrolle wurden in diesen Experimenten verschiedene CD44Rg-Fusionsproteine eingesetzt, die sich durch Unterschiede in der Hyaluronsäurebindung auszeichnen (Aruffo *et al.*, 1990; Peach *et al.*, 1993).

Das durch Proteolyse entstandene aufgereinigte CD44 wurde in der Folge in verschiedenen Experimenten getestet. Dies waren zunächst Versuche zur Überprüfung der HA-Bindungsfähigkeit des proteolytisch abgespaltenen CD44. In allen Experimenten, mit denen die HA-Bindung überprüft werden konnte, zeigte sich jedoch, daß das aufgereinigte CD44 keine Hyaluronsäure binden konnte (Abb. 19). Die Ursachen dafür können in vielen strukturellen Eigenschaften des löslichen CD44 liegen. Eine Mutation im CD44-Gen, die im translatierten Protein zu einer Mutation in der HA-Bindungsdomäne führen könnte, wäre eine Möglichkeit (Liao *et al.*, 1995). Mittels RT-PCR wurden cDNA-Sequenzen der Zelllinie MV3, die für die HA-Bindungsdomäne von CD44 kodieren, amplifiziert, kloniert und nachfolgend sequenziert, ohne in diesem Bereich auf Abweichungen zur publizierten Sequenz zu stoßen (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des löslichen CD44s in der Zelllinie 1F6, dessen Sequenz bekannt ist, machte einen Unterschied der Molekulargewichte von proteolytisch abgespaltenem löslichem CD44 der Zelllinie MV3 zum künstlich sezernierten löslichen CD44 der Zelllinie 1F6 von etwa fünf kDa deutlich (Abb. 26A). Dieser 5 kDa umfassende, C-terminale Bereich, der dem durch Proteolyse entstandenen, löslichen Protein gegenüber dem HA-bindenden, sezernierten fehlt, könnte eine entscheidende Bedeutung für die HA-Bindung besitzen. Identisch für lösliches CD44 ankonzentrierte Überstände konnten im einen Fall (sezerniertes, künstlich produziertes

solCD44s) die Adhäsion von MM-Zellen an Hyaluronsäure fast vollständig blockieren. Im anderen Fall konnte das proteolytisch abgespaltene, lösliche Protein wie auch die beiden in der HA-Bindungsdomäne von CD44 mutierten solCD44sR150A- und solCD44sR41A-Proteine die Zelladhäsion von MM-Zellen an Hyaluronsäure nicht beeinflussen (Abb. 27). Die Funktionalität des von 1F6 MM-Zellen sezernierten löslichen CD44 konnte zudem in Proliferationstests und nach Injektion der Zellen *in vivo* gezeigt werden. Dies wird weiter unten nochmals ausführlich diskutiert.

Über strukturelle Unterschiede der beiden Proteine kann im Rahmen dieser Diskussion nur gemutmaßt werden. Unterschiedliche Glykosylierungsmuster von CD44 oder Fehler in der Synthese von Oligosaccharidketten (Skelton *et al.*, 1998) innerhalb der beiden Zelllinien MV3 und 1F6 kommen dafür nicht in Betracht, da MV3 Zellen CD44-abhängig sowohl sehr gut an immobilisierte Hyaluronsäure wie auch an lösliche HA-FITC gebunden hatten (Abb. 19 und Abb. 12A). Die fehlende HA-Bindungsfähigkeit des proteolytisch abgespaltenen löslichen CD44 der MV3 Zelllinie muß daher in seiner Struktur begründet liegen. Eine regulierte Dimerisierung von CD44s, für die die cytoplasmatische Domäne mitverantwortlich ist, führt zu einer erhöhten HA-Bindungsfähigkeit von Zellen (Perschl *et al.*, 1995). Für die variante Isoform CD44v4-v7 konnte eine Steigerung der HA-Bindung nach Oligomerisierung in einer Pankreas-Karzinomzelllinie gezeigt werden, wobei diese unabhängig von der cytoplasmatischen Domäne des Proteins war (Sleeman *et al.*, 1996a). Der Verlust der HA-Bindungsfähigkeit von löslichem CD44 der Zelllinie MV3 könnte darin begründet liegen, daß das Molekül keine Dimere mehr bilden kann. Die Störung der Hyaluronsäurebindung durch das sezernierte lösliche CD44 der Transfektanten (Abb. 27) läßt sich dann nur schwer erklären, es sei denn, die membranproximalen 5 kDa, die die sezernierte Form von CD44 gegenüber der abgespaltenen Form größer ist, hätten eine Bedeutung für die Dimerisierung von CD44.

CD44s enthält vier Serin-Glyzin-Dipeptide in seinem membranproximalen Teil. Diese Sequenzmotive stellen potentielle Bereiche für die Bindung von Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG) dar (Mann *et al.*, 1990). In einer Studie wurden alle vier dieser Stellen mutiert und die Auswirkungen dieser Mutationen auf die HA-Bindungsfähigkeit des Proteins nach Transfektion in die humane Melanomzelllinie MC untersucht (Bartolazzi *et al.*, 1996). Ein Größenvergleich der mutierten Proteine zeigte dabei keine Unterschiede, die Hinweise auf die Anheftung langer GAG-Seitenketten hätten geben können (Bartolazzi *et al.*, 1996). Die Mutation dieser vier Serin-Glyzin-Dipeptidsequenzen resultierte dennoch in einer Reduktion der HA-Bindung um 50-60% (Bartolazzi *et al.*, 1996). Die Möglichkeit, daß das proteolytisch von der Zelllinie MV3 abgespaltene lösliche CD44 diese membran nahen HA-Bindungsmotive nicht mehr besitzt, ist sehr wahrscheinlich. Dies könnte die Experimente erklären, in denen das aus Kulturüberständen aufgereinigte CD44 keine Hyaluronsäure gebunden hatte. Mit der Abspaltung von CD44 von der Zellmembran könnten schließlich auch Konformationsänderungen des Moleküls verbunden sein, die die HA-Bindung unmöglich machen.

Auch die Art und Weise der Aufreinigung des löslichen Proteins sollte nicht unerwähnt bleiben. Obwohl proteolytisch abgespaltenes lösliches CD44 nach der Aufreinigung sowohl in CD44-ELISA-Messungen wie auch in Western Blots eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 18), ist nicht auszuschließen, daß das Protein durch die Aufreinigung strukturell verändert worden ist. Für die Ergebnisse, die mit identisch ankonzentrierten Überständen in HA-Bindungsversuchen erzielt wurden (Abb. 27), kann dieses Argument allerdings nicht angeführt werden.

4.2.3 CD44 als kostimulatorisches Molekül

Mit einem uns zur Verfügung stehenden Zellsystem, mit dem die Aktivierung von CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten durch Antigen präsentierende dendritische Zellen untersucht werden kann, versuchte ich eine Funktion von löslichem CD44 auf die Aktivierung von T-Lymphozyten nachzuweisen. Antikörper gegen panCD44, das CD44v6- bzw. das CD44v9-Epitop haben einen stimulierenden Einfluß auf die Reifung von dendritischen Zellen zu potenten Antigen präsentierenden Zellen und die Aktivierung von T-Lymphozyten (Haegel-Kronenberger *et al.*, 1998).

In den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten wurde zunächst die Wirkung von CD44 auf die Reaktion von reifen dendritischen Zellen mit frisch aufgereinigten CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten untersucht. Dabei konnte die Proliferation von T-Lymphozyten durch Zugabe des CD44-Antikörpers MEM85 effizient blockiert werden, während Antikörper gegen ICAM-1, CD44v9- oder CD44v6-Epitope keinen Effekt auf die Aktivierung von T-Zellen zeigten (Abb. 20). Diese Daten reproduzieren Ergebnisse, bei denen ein CD44-Antikörper in der Lage war, die T-Zellaktivierung zu inhibieren (Rothman *et al.*, 1991). Untersuchungen, die einen Einfluß des CD44v6-Epitops auf die B- und T-Zellaktivierung *in vivo* gezeigt hatten (Arch *et al.*, 1992), konnten mit dem hier verwendeten, gegen das CD44v6-Epitop gerichteten, Antikörper FW11.9 nicht beobachtet werden (Abb. 20). Durch die Art der Durchführung des Experimentes konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden, auf welche der beiden benutzten Zellpopulation die eingesetzten Antikörper wirkten.

Für die Expansion eines CD4⁺-T-Zellklons wurde eine von B7-CD28 unabhängige kostimulatorische Wirkung von CD44s nach Ligation des ebenfalls kostimulatorischen Moleküls CD40 mit seinem Liganden CD40L gefunden (Guo *et al.*, 1996). In dieser Publikation war ein lösliches CD44Ig-Fusionsprotein nicht in der Lage, die kostimulatorische Wirkung von CD44s zu beeinflussen, während ein α CD44-Antikörper die Kostimulation unterdrückte und die T-Zellproliferation inhibierte (Guo *et al.*, 1996). In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten, die den Einfluß von löslichem CD44 auf die Aktivierung von T-Lymphozyten untersuchten, konnte mit löslichen CD44Rg-Fusionsproteinen oder löslichem CD44 aus Kulturüberständen der Zelllinie MV3 kein Effekt erzielt werden (Abb. 21). Ein CD152-Ig-Fusionsprotein (CTLA-4-Ig), das als Kontrolle eingesetzt wurde, hatte eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation der T-Lymphozyten. Hier wurde das kostimulatorische Signal der Antigen präsentierenden dendritischen Zellen über B7-Moleküle blockiert (Abb. 21). Diese Experimente deuten darauf hin, daß die Proliferation von T-Lymphozyten durch lösliches CD44 nicht beeinflusst wird.

4.2.4 Analyse von 1F6 Transfektanten, die konstitutiv lösliches CD44 sezernieren

Um die Wechselwirkungen von membranständigem und löslichem CD44 in einem definierten Zellsystem analysieren zu können, wurde die CD44-positive 1F6 Melanomzelllinie (Abb. 9), bei der kein proteolytisches Abspalten von CD44 nachgewiesen werden konnte (Abb. 17 und Abb. 24), stabil mit cDNAs transfiziert, die für lösliches CD44 kodieren (Abb. 22). Durch die konstitutive Produktion eines sezernierten, löslichen Proteins erhofften wir Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltransfektanten und der Wildtyp-Zelllinie bezüglich Proliferation, Adhäsion an Hyaluronsäure und Tumorwachstum *in vivo* beobachten zu können. Die durch

Transfektion mit löslichen CD44-cDNAs erhaltenen Zellklone wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das sezernierte lösliche CD44 zu produzieren (Abb. 23 und Abb. 24). Die Transfektion von cDNAs, die für die drei löslichen CD44-Formen solCD44s, solCD44sR41A und solCD44sR150A/R154A kodierte, führte in allen drei Fällen zur Sezernierung von 75 kDa großen Proteinen ins Kulturmedium (Abb. 24).

Einige der Transfektanten wurden danach funktionell charakterisiert. In HA-Bindungsexperimenten an immobilisierte Hyaluronsäure zeigten alle Transfektanten eine Zelladhäsion, die der HA-Bindung der Wildtyp-Zelllinie vergleichbar war (Abb. 25). Die Versuchsdurchführung war allerdings nicht geeignet, den Einfluß von löslichem CD44 auf die Adhärenz von Zellen an Hyaluronsäure zu zeigen. Die 45 Minuten dauernde, bei 4°C durchgeführte Inkubation kann die Auswirkungen eines noch zu sezernierenden Genproduktes nur schwer beweisen. Kompetitionsmechanismen von löslichem mit membranständigem CD44 können unter diesen Bedingungen kaum in Gang gesetzt werden. Dieses Experiment zeigte allerdings ganz deutlich, daß Vorinkubation der Zellklone mit einem gegen CD44 gerichteten Antikörper die von membranständigem CD44 abhängige Adhäsion an Hyaluronsäure bei allen untersuchten Transfektanten sehr effizient blockierte (Abb. 25). In vergleichbaren Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe konnte die HA-Bindungsfähigkeit einer CD44-positiven Mamma-Karzinomzelllinie der Maus allerdings durch Expression eines sezernierten CD44v6-v10- oder eines löslichen CD44v8-v10-Proteins um bis zu 70% verringert werden (Yu *et al.*, 1997). Die Expression eines in der HA-Bindungsdomäne mutierten solCD44v6-v10R43A-Proteins zeigte dagegen keinen Effekt auf die Bindungsfähigkeit der Zellen (Yu *et al.*, 1997).

Um dennoch die Auswirkungen der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten, löslichen Formen von CD44 auf die Bindung immobilisierter Hyaluronsäure durch Zellen untersuchen zu können, wurden zunächst konditionierte Kulturüberstände der proteolytisch CD44 abspaltenden Zelllinie MV3, von löslichem CD44 sezernierenden Transfektanten und von der 1F6 Wildtyp-Zelllinie ankonzentriert (Abb. 26). Durch Vorinkubation von HA-beschichteten Platten mit einem CD44HRg-Fusionsprotein konnte die Adhäsion von MV3 an Hyaluronsäure inhibiert werden (Abb. 19A). Durch Vorinkubation der Platten mit ankonzentriertem löslichem CD44 wurden Bindungsstellen der Hyaluronsäure für membranständiges CD44 blockiert, was zu einer vollständigen Inhibition der Zelladhäsion führte (Abb. 27). Proteolytisch abgespaltenes lösliches CD44 der MM-Zelllinie MV3 konnte die Bindung von MM-Zellen an Hyaluronsäure nicht kompetieren (Abb. 27). Die in der HA-Bindungsdomäne mutierten löslichen CD44-Formen solCD44sR150A sowie solCD44sR41A interferierten ebenfalls nicht mit der HA-Bindung der Zellen (Abb. 27). Damit konnte eine kompetitive Wirkung von sezerniertem löslichem CD44 mit membranständigem CD44 bezüglich der Bindung von Hyaluronsäure gezeigt werden.

Wir haben daraufhin die HA-induzierte Steigerung der Proliferation in lösliches CD44 sezernierenden Transfektanten untersucht (Abb. 28). Die HA-induzierte und CD44-abhängige Steigerung der Proliferation war in früheren Versuchen durch einen monoklonalen Antikörper gegen membranständiges CD44 vollständig blockierbar gewesen (Abb. 15). Unsere Annahme war, daß die konstitutive Sezernierung von HA-bindendem löslichem CD44 kompetitive Effekte mit membranständigem CD44 zur Folge haben könnte. Dies könnte wiederum die HA-abhängige Proliferation beeinflussen. Tatsächlich wurde die HA-induzierte Proliferationssteigerung der Wildtyp-Zelllinie 1F6 und die der Kontrolltransfektanten um 40-

60% in den löslichen CD44 sezernierenden Transfektanten nicht beobachtet (Abb. 28). Die Proliferation aller analysierten solCD44s-Transfektanten war sogar geringer als die bei den einzelnen Zelllinien beobachtete Grundproliferation. Dies kann mehrere mögliche Ursachen haben. Unter Umständen ist lösliches CD44 neben der Konkurrenz mit membranständigem CD44 um HA-Bindungsstellen noch zusätzlich in der Lage, mit HA-abhängigen Funktionen der Zellen zu interferieren. Lösliches CD44 könnte so z.B. mit einem weiteren Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure konkurrieren, wozu monoklonale Antikörper gegen CD44 nicht fähig sind.

4.2.5 Konkurrenz von löslichem CD44 mit membranständigem CD44 inhibiert das Tumorstadium von MM-Zellen *in vivo*

Die beobachteten Effekte von konstitutiv sezerniertem löslichem CD44 auf die HA-Bindung und die Proliferation löslichen CD44 sezernierender Zellen *in vitro* sollten durch subkutane Injektion von Melanomzellen in Nacktmäuse auf ihre *in vivo*-Relevanz überprüft werden (Abb. 29).

In der Literatur gibt es einige Beispiele, bei denen Interaktionen von Hyaluronsäure mit membranständigem und löslichem CD44 in Zusammenhang mit Tumorstadium und Metastasierung untersucht worden sind (Sy *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1994; Bartolazzi *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997; Zawadzki *et al.*, 1998). Dabei konnte in einigen Untersuchungen das Tumorstadium von Zellen durch exogene Zugabe von CD44HRg-Fusionsproteinen blockiert werden (Sy *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1994). In einem Melanommodell wurden in die CD44-negative humane Melanomzelllinie MC verschiedene membranständige Formen von CD44 stabil transfiziert. Die Tumorbildung der CD44s exprimierenden Zelllinie war nach subkutaner Injektion in SCID-Mäuse dabei am größten, während das Tumorstadium von CD44v8-v10 exprimierenden Transfektanten inhibiert war. Die Tumorbildung durch CD44s exprimierende Transfektanten konnte mit einem humanen CD44sRg-, nicht aber mit einem, in der HA-Bindungsdomäne mutierten, humanen CD44sR41ARg-Fusionsprotein blockiert werden. Bei den CD44v8-v10 exprimierenden Transfektanten wurde ein proteolytisches Abspalten von CD44 beobachtet. Mit diesem "Shedden" von CD44v8-v10 wurde das geringere primäre Tumorstadium dieser Transfektante begründet. Ein Konkurrenzmechanismus von löslichem CD44 und membranständigem CD44 wurde hier schon angedeutet. Durch die exogene Zugabe von Fusionsproteinen war der Wirkungsort allerdings noch nicht genau lokalisierbar (Bartolazzi *et al.*, 1994).

In einer weiteren Studie wurde dies durch Transfektion von cDNA-Konstrukten in die murine Mamma-Karzinomzelllinie TA3/St aufgeklärt, die zur Expression von löslichen, varianten CD44-Isoformen führte (Yu *et al.*, 1997). In diesem Metastasenmodell zeigten Transfektanten, die lösliches CD44v6-v10 oder lösliches CD44v8-v10 exprimierten, nach intravenöser Injektion in syngene A/jax-Mäuse keine Anzeichen von Metastasen. Eine Vielzahl von Metastasen wurde jedoch nach Injektion von TA3 Zellen in Tieren beobachtet, die entweder mit dem Kontrollplasmid transfiziert waren, lösliches ICAM-1 oder in der HA-Bindungsdomäne mutiertes lösliches CD44v6-v10R43A exprimierten. Die HA-Bindungskapazität der solCD44v6-v10- wie auch der solCD44v8-v10-Transfektantenzellen war gegenüber der Parentalzelllinie und den Kontrolltransfektanten verringert. Durch die verminderte HA-Bindung der Zellen wurden in Zielorganen wie der Lunge Apoptosemechanismen in Gang gesetzt, die die Bildung von Metastasen verhinderten (Yu *et al.*, 1997). In einem weiteren Metastasierungsmodell mit der murinen Melanomzelllinie

B16F10 konnte die Metastasierung von Zellen in C57BL/6-Mäusen sowohl mit Antikörpern gegen CD44s und CD44v10 wie auch mit einem CD44sRg- und einem CD44v10Rg-Fusionsprotein blockiert werden (Zawadzki *et al.*, 1998).

In diesem in dieser Arbeit beschriebenen Tumormodell für das humane Melanom wurde in die 1F6 MM-Zelllinie, die CD44-positiv ist und bezüglich Adhäsion und Proliferation eine starke Abhängigkeit von Wechselwirkungen von membranständigem CD44 mit Hyaluronsäure zeigt, zielgerichtet die Genexpression von sezernierbarem löslichen CD44 induziert. Verschiedene, lösliches CD44 exprimierende Transfektanten, verschiedene Kontrolltransfektanten sowie die beiden MM-Zelllinien 1F6 und MV3 wurden subkutan in MF1-Nacktmäuse injiziert. Während die Kontrolltransfektanten und die 1F6 Parentalzelllinie schnell wachsende Tumore in Nacktmäusen bildeten, war das Tumorwachstum der löslichen CD44 exprimierenden Transfektanten fast vollständig inhibiert (Abb. 29). Zum Vergleich wurden Zellen der MM-Zelllinie MV3 in Nacktmäuse injiziert. Diese bildeten wie die 1F6 Parentalzelllinie und die Kontrolltransfektanten von 1F6 schnell wachsende Tumore (Abb. 29). Durch Kompetitionsvorgänge von sezerniertem, HA-bindendem CD44 mit membranständigem CD44 der Transfektanten war auch *in vivo* eine starke Wachstumshemmung der Melanomzellen nachweisbar. Nicht HA-bindendes, proteolytisch abgespaltenes CD44 der Zelllinie MV3 kann mit membranständigem CD44 offensichtlich nicht um Bindungsstellen der Hyaluronsäure konkurrieren. In der Konsequenz führt dies zu schnell wachsenden Tumoren der Zelllinie MV3. Dieses Modell der anti-proliferativen Wirkung von löslichem, von Zellen sezerniertem CD44 ist hier zum ersten Mal durch eine gezielte Veränderung der Genexpression einer humanen Melanomzelllinie in einem Tumormodell *in vivo* gezeigt worden.

Durch Konkurrenz von sezerniertem CD44 mit membranständigem CD44, die in direkter Konsequenz eine Störung der HA-abhängigen Funktionen von membranständigem CD44 zur Folge hat, ist somit die Proliferation von Melanomzellen *in vitro* wie *in vivo* signifikant inhibierbar.

5 Abkürzungen

α	anti
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BMN	Benigner melanozytärer Nävus
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
CD	"Cluster of Differentiation"
cDNA	"complementary" DNA
Ci	Curie
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	"counts per minute"
CTP	Cytidintriphosphat
d	deoxyribo-
ddNTP	dideoxy-Nukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E260	Extinktion bei 260 nm
ECL	"Enhanced Chemiluminescence"
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
ERK	"Extracellular signal-regulated kinase"
<i>et al.</i>	und andere
FAB	Formamid-Ladepuffer
f. c.	"final concentration" (Endkonzentration)
FACS	"Fluorescence Activated Cell Sorting"
FCS	Fötale Kälberserum
FDP	Formamid-Denaturierungspuffer
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FPH	Formamid Prehybridization/Hybridization Buffer
g	Gramm
g	goat (Ziege)
g	relative Beschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HRP	horse radish peroxidase
hu	human (Mensch)
Ig	Immunoglobulin

Abkürzungen

IL	Interleukin
kb	Kilobase (1000 Basenpaare)
kDa	Kilo Dalton (1000 Dalton)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	murin (Maus)
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MGM	Melanocyte Growth Medium
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Malignes Melanom
MMM	Metastasierendes malignes Melanom
MOPS	Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	"messenger"-RNA
N	normal (Konzentration ionisierbarer Gruppen)
NaOAc	Natrium-Acetat
NEAA	Non Essential Amino Acids
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	"open reading frame"
p	plasmid
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PMM	Primäres malignes Melanom
rab	rabbit (Kaninchen)
rat	rat (Ratte)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rpm	"rotations per minute"
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
S	Svedberg-Einheit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
solCD44	lösliches CD44
SSC	Standard Saline Citrat
T	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uridin
UDP	Uridindiphosphat
ü. N.	über Nacht
U/ul	Enzymeinheiten pro Mikroliter
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
z.B	zum Beispiel

6 Literatur

Albino, A.P., Davis, B.M. und Nanus, D.M. (1991) Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res*, **51**, 4815-4820.

Altomonte, M., Colizzi, F., Esposito, G. und Maio, M. (1992) Circulating intercellular adhesion molecule 1 as a marker of disease progression in cutaneous melanoma. *N Engl J Med*, **327**, 959.

Altomonte, M., Gloghini, A., Bertola, G., Gasparollo, A., Carbone, A., Ferrone, S. und Maio, M. (1993) Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res*, **53**, 3343-3348.

Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. und Zöller, M. (1992) Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science*, **257**, 682-685.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. und Seed, B. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**, 1303-1313.

Assmann, V., Marshall, J.F., Fieber, C., Hofmann, M. und Hart, I.R. (1998) The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci*, **111**, 1685-1694.

Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. und Stamenkovic, I. (1994) Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med*, **180**, 53-66.

Bartolazzi, A., Jackson, D., Bennett, K., Aruffo, A., Dickinson, R., Shields, J., Whittle, N. und Stamenkovic, I. (1995) Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants. *J Cell Sci*, **108**, 1723-1733.

Bartolazzi, A., Nocks, A., Aruffo, A., Spring, F. und Stamenkovic, I. (1996) Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol*, **132**, 1199-1208.

Bazil, V. und Strominger, J.L. (1994) Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol*, **152**, 1314-1322.

Bazil, V. (1995) Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules. *Immunol Today*, **16**, 135-140.

Becker, J.C., Dummer, R., Hartmann, A.A., Burg, G. und Schmidt, R.E. (1991) Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor- α . Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, **147**, 4398-4401.

Becker, J.C., Termeer, C., Schmidt, R.E. und Bröcker, E.B. (1993) Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J Immunol*, **151**, 7224-7232.

Bennett, K.L., Jackson, D.G., Simon, J.C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G. und Aruffo, A. (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., Modrell, B., Greenfield, B., Bartolazzi, A., Stamenkovic, I., Peach, R., Jackson, D.G., Spring, F. und Aruffo, A. (1995b) Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons. *J Cell Biol*, **131**, 1623-1633.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T. und van der Bruggen, P. (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, **2**, 167-175.
- Boon, T. (1992) Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Adv Cancer Res*, **58**, 177-210.
- Boon, T., Gajewski, T.F. und Coulie, P.G. (1995) From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol Today*, **16**, 334-336.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. und Boon, T. (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **178**, 489-495.
- Brown, T.A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E. und Carter, W.G. (1991) Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol*, **113**, 207-221.
- Burgoon, M.P., Hazan, R.B., Phillips, G.R., Crossin, K.L., Edelman, G.M. und Cunningham, B.A. (1995) Functional analysis of posttranslational cleavage products of the neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM. *J Cell Biol*, **130**, 733-744.
- Camp, R.L., Kraus, T.A. und Pure, E. (1991a) Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J Cell Biol*, **115**, 1283-1292.
- Camp, R.L., Kraus, T.A., Birkeland, M.L. und Pure, E. (1991b) High levels of CD44 expression distinguish virgin from antigen-primed B cells. *J Exp Med*, **173**, 763-766.
- Camp, R.L., Scheynius, A., Johansson, C. und Pure, E. (1993) CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J Exp Med*, **178**, 497-507.
- Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A. und St. Pierre, Y. (1998) Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol*, **161**, 6398-6405.
- Chen, Y.T., Stockert, E., Tsang, S., Coplan, K.A. und Old, L.J. (1995a) Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8125-8129.
- Chen, A., Engel, P. und Tedder, T.F. (1995b) Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Med*, **182**, 519-530.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P. und et al. (1994) A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **180**, 35-42.

- Culty, M., Nguyen, H.A. und Underhill, C.B. (1992) The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*, **116**, 1055-1062.
- Da Cruz, L., Rakoczy, P., Perricaudet, M. und Constable, I.J. (1996) Dynamics of gene transfer to retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **37**, 2447-2454.
- Dall, P., Heider, K.H., Hekele, A., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., Ponta, H. und Herrlich, P. (1994) Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res*, **54**, 3337-3341.
- Darrow, T.L., Slingluff, C.L., Jr. und Seigler, H.F. (1989) The role of HLA class I antigens in recognition of melanoma cells by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. Evidence for shared tumor antigens. *J Immunol*, **142**, 3329-3335.
- De Belder, A.N. und Wik, K.O. (1975) Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydr Res*, **44**, 251-257.
- De Grendele, H.C., Estess, P. und Siegelman, M.H. (1997a) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, **278**, 672-675.
- De Grendele, H.C., Kosfischer, M., Estess, P. und Siegelman, M.H. (1997b) CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol*, **159**, 2549-2553.
- Diamond, M.S. und Springer, T.A. (1994) The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol*, **4**, 506-517.
- Dietrich, A., Tanczos, E., Vanscheidt, W., Schöpf, E. und Simon, J.C. (1997) High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur J Cancer*, **33**, 926-930.
- Doerge, K.J., Sasaki, M., Kimura, T. und Yamada, Y. (1991) Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem*, **266**, 894-902.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Edward, M. (1995) Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression. *Curr Opin Oncol*, **7**, 185-191.
- Entwistle, J., Zhang, S., Yang, B., Wong, C., Li, Q., Hall, C.L., A, J., Mowat, M., Greenberg, A.H. und Turley, E.A. (1995) Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene*, **163**, 233-238.
- Faassen, A.E., Schrager, J.A., Klein, D.J., Oegema, T.R., Couchman, J.R. und McCarthy, J.B. (1992) A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol*, **116**, 521-531.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Fichtner, I., Dehmel, A., Naundorf, H. und Finke, L.H. (1997) Expression of CD44 standard and isoforms in human breast cancer xenografts and shedding of soluble forms into serum of nude mice. *Anticancer Res*, **17**, 3633-3645.

- Fidler, I.J. (1996) Critical determinants of melanoma metastasis. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **1**, 203-208.
- Fieber, C., Plug, R., Sleeman, J., Dall, P., Ponta, H. und Hofmann, M. (1999) Characterisation of the murine gene encoding the intracellular hyaluronan receptor IHABP (RHAMM). *Gene*, **226**, 41-50.
- Friedl, P., Maaser, K., Klein, C.E., Niggemann, B., Krohne, G. und Zanker, K.S. (1997) Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrins and CD44. *Cancer Res*, **57**, 2061-2070.
- Galandrini, R., Galluzzo, E., Albi, N., Grossi, C.E. und Velardi, A. (1994) Hyaluronate is costimulatory for human T cell effector functions and binds to CD44 on activated T cells. *J Immunol*, **153**, 21-31.
- Gehlsen, K.R., Davis, G.E. und Sriramarao, P. (1992) Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin Exp Metastasis*, **10**, 111-120.
- Goebeler, M., Kaufmann, D., Bröcker, E.B. und Klein, C.E. (1996) Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J Cell Sci*, **109**, 1957-1964.
- Goetinck, P.F., Stirpe, N.S., Tsonis, P.A. und Carlone, D. (1987) The tandemly repeated sequences of cartilage link protein contain the sites for interaction with hyaluronic acid. *J Cell Biol*, **105**, 2403-2408.
- Goldstein, L.A., Zhou, D.F., Picker, L.J., Minty, C.N., Bargatze, R.F., Ding, J.F. und Butcher, E.C. (1989) A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell*, **56**, 1063-1072.
- Gough, J.A. und Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol*, **166**, 1-19.
- Greco, R.M., Iocono, J.A. und Ehrlich, H.P. (1998) Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J Cell Physiol*, **177**, 465-473.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. und Herrlich, P. (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, **65**, 13-24.
- Guo, Y.J., Lin, S.C., Wang, J.H., Bigby, M. und Sy, M.S. (1994a) Palmitoylation of CD44 interferes with CD3-mediated signaling in human T lymphocytes. *Int Immunol*, **6**, 213-221.
- Guo, Y.J., Liu, G., Wang, X., Jin, D., Wu, M., Ma, J. und Sy, M.S. (1994b) Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res*, **54**, 422-426.
- Guo, Y., Wu, Y., Shinde, S., Sy, M.S., Aruffo, A. und Liu, Y. (1996) Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J Exp Med*, **184**, 955-961.
- Gustafson, S., Bjorkman, T., Forsberg, N., Lind, T., Wikstrom, T. und Lidholt, K. (1995) Accessible hyaluronan receptors identical to ICAM-1 in mouse mast-cell tumours. *Glycoconj J*, **12**, 350-355.

- Haegel-Kronenberger, H., De la Salle, H., Bohbot, A., Oberling, F., Cazenave, J.P. und Hanau, D. (1998) Adhesive and/or signaling functions of CD44 isoforms in human dendritic cells. *J Immunol*, **161**, 3902-3911.
- Hall, C.L., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, L.A., Wang, C., Curpen, G.D., Savani, R.C. und et al. (1995) Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*, **82**, 19-26.
- Hamann, K.J., Dowling, T.L., Neeley, S.P., Grant, J.A. und Leff, A.R. (1995) Hyaluronic acid enhances cell proliferation during eosinopoiesis through the CD44 surface antigen. *J Immunol*, **154**, 4073-4080.
- Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H.P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D.M. und Turley, E.A. (1992) Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol*, **117**, 1343-1350.
- Harning, R., Mainolfi, E., Bystry, J.C., Henn, M., Merluzzi, V.J. und Rothlein, R. (1991) Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma. *Cancer Res*, **51**, 5003-5005.
- Heider, K.H., Hofmann, M., Hors, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S.T. (1993) A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol*, **120**, 227-233.
- Herlyn, M. (1990) Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 101-112.
- Herlyn, M. und Malkowicz, S.B. (1991) Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab Invest*, **65**, 262-271.
- Herrlich, P., Sleeman, J., Wainwright, D., König, H., Sherman, L., Hilberg, F. und Ponta, H. (1998) How tumor cells make use of CD44. *Cell Adhes Commun*, **6**, 141-147.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P. und Günthert, U. (1991) CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res*, **51**, 5292-5297.
- Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Göttlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H. und Herrlich, P. (1998a) Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J Cell Sci*, **111**, 1673-1684.
- Hofmann, M., Assmann, V., Fieber, C., Sleeman, J.P., Moll, J., Ponta, H., Hart, I.R. und Herrlich, P. (1998b) Problems with RHAMM: a new link between surface adhesion and oncogenesis? *Cell*, **95**, 591-592; discussion 592-593.
- Humphries, M.J., Olden, K. und Yamada, K.M. (1986) A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, **233**, 467-470.
- Jackson, D.G., Bell, J.I., Dickinson, R., Timans, J., Shields, J. und Whittle, N. (1995) Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J Cell Biol*, **128**, 673-685.
- Jalkanen, S., Wu, N., Bargatze, R.F. und Butcher, E.C. (1987) Human lymphocyte and lymphoma homing receptors. *Annu Rev Med*, **38**, 467-476.

- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. und Butcher, E.C. (1988) Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol*, **141**, 1615-1623.
- Jalkanen, S. und Jalkanen, M. (1992) Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*, **116**, 817-825.
- Joensuu, H., Klemi, P.J., Toikkanen, S. und Jalkanen, S. (1993) Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol*, **143**, 867-874.
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Hupke, U., Holzmann, B. und Riethmuller, G. (1988) The melanoma progression-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule, ICAM-1. *Immunobiology*, **178**, 275-284.
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwable, W. und Riethmuller, G. (1989) De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 641-644.
- Jonjic, N., Martin-Padura, I., Pollicino, T., Bernasconi, S., Jilek, P., Bigotti, A., Mortarini, R., Anichini, A., Parmiani, G., Colotta, F. und *et al.* (1992) Regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human malignant melanoma. *Am J Pathol*, **141**, 1323-1330.
- Kageshita, T., Yoshii, A., Kimura, T., Kuriya, N., Ono, T., Tsujisaki, M., Imai, K. und Ferrone, S. (1993) Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res*, **53**, 4927-4932.
- Katoh, S., McCarthy, J.B. und Kincade, P.W. (1994) Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J Immunol*, **153**, 3440-3449.
- Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., Shimozaoto, T. und Kincade, P.W. (1995) Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J Exp Med*, **182**, 419-429.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J.R., Adema, G.J., Miki, T. und Rosenberg, S.A. (1994) Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6458-6462.
- Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J.L., Vassalli, P. und Stamenkovic, I. (1997) Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev*, **11**, 996-1007.
- Kerbel, R.S., Kobayashi, H., Graham, C.H. und Lu, C. (1996) Analysis and significance of the malignant 'eclipse' during the progression of primary cutaneous human melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **1**, 183-187.
- Knudson, W., Biswas, C., Li, X.Q., Nemecek, R.E. und Toole, B.P. (1989) The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. *Ciba Found Symp*, **143**, 150-169.
- Kobayashi, H., Man, S., MacDougall, J.R., Graham, C.H., Lu, C. und Kerbel, R.S. (1994) Variant sublines of early-stage human melanomas selected for tumorigenicity in nude mice express a multicytokine-resistant phenotype. *Am J Pathol*, **144**, 776-786.

- Koopman, G., Heider, K.H., Horst, E., Adolf, G.R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S.T. (1993) Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med*, **177**, 897-904.
- Lackner, C., Moser, R., Bauernhofer, T., Wilders-Truschig, M., Samonigg, H., Berghold, A. und Zatloukal, K. (1998) Soluble CD44 v5 and v6 in serum of patients with breast cancer. Correlation with expression of CD44 v5 and v6 variants in primary tumors and location of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, **47**, 29-40.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laurent, T.C. und Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan. *Faseb J*, **6**, 2397-2404.
- Leca, G., Mansur, S.E. und Bensussan, A. (1995) Expression of VCAM-1 (CD106) by a subset of TCR gamma delta-bearing lymphocyte clones. Involvement of a metalloprotease in the specific hydrolytic release of the soluble isoform. *J Immunol*, **154**, 1069-1077.
- Lee, T.H., Wisniewski, H.G. und Vilcek, J. (1992) A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol*, **116**, 545-557.
- Lehmann, J.M., Riethmüller, G. und Johnson, J.P. (1989) MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9891-9895.
- Lehrach, H., Frischauf, A.M., Hanahan, D., Wozney, J., Fuller, F., Crkvenjakov, R., Boedtker, H. und Doty, P. (1978) Construction and characterization of a 2.5-kilobase procollagen clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5417-5421.
- Lesley, J., Schulte, R. und Hyman, R. (1990) Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp Cell Res*, **187**, 224-233.
- Lesley, J., He, Q., Miyake, K., Hamann, A., Hyman, R. und Kincade, P.W. (1992) Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med*, **175**, 257-266.
- Lesley, J., Hyman, R. und Kincade, P.W. (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*, **54**, 271-335.
- Lesley, J., Howes, N., Perschl, A. und Hyman, R. (1994) Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J Exp Med*, **180**, 383-387.
- Lesley, J., English, N., Perschl, A., Gregoroff, J. und Hyman, R. (1995) Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med*, **182**, 431-437.
- Levesque, M.C. und Haynes, B.F. (1996) In vitro culture of human peripheral blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant CD44 isoform expression. *J Immunol*, **156**, 1557-1565.
- Liao, H.X., Lee, D.M., Levesque, M.C. und Haynes, B.F. (1995) N-terminal and central regions of the human CD44 extracellular domain participate in cell surface hyaluronan binding. *J Immunol*, **155**, 3938-3945.

- Liu, D. und Sy, M.S. (1997) Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J Immunol*, **159**, 2702-2711.
- Lokeshwar, V.B. und Bourguignon, L.Y. (1991) Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem*, **266**, 17983-17989.
- Lokeshwar, V.B., Fregien, N. und Bourguignon, L.Y. (1994) Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol*, **126**, 1099-1109.
- Lu, C., Vickers, M.F. und Kerbel, R.S. (1992) Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9215-9219.
- Lu, C., Rak, J.W., Kobayashi, H. und Kerbel, R.S. (1993) Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res*, **53**, 2708-2711.
- Lupetti, R., Mortarini, R., Panceri, P., Sensi, M. und Anichini, A. (1996) Interaction with fibronectin regulates cytokine gene expression in human melanoma cells. *Int J Cancer*, **66**, 110-116.
- MacDougall, J. und Kerbel, R.S. (1993) Responsiveness of normal/dysplastic melanocytes and melanoma cells from different lesional stages of disease progression to the growth inhibitory effects of TGF- β . *Mol Cell Diff*, **1**, 21-40.
- Mackay, C.R., Terpe, H.J., Stauder, R., Marston, W.L., Stark, H. und Günthert, U. (1994) Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol*, **124**, 71-82.
- Maiti, A., Maki, G. und Johnson, P. (1998) TNF- α induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science*, **282**, 941-943.
- Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Ginther Luce, G.E., Dustin, M.L., Springer, T.A., Clark, E.A., Mannoni, P. und Shaw, S. (1988) ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T und myeloid cells. *Nature*, **331**, 86-88.
- Mann, D.M., Yamaguchi, Y., Bourdon, M.A. und Ruoslahti, E. (1990) Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **265**, 5317-5323.
- Manten-Horst, E., Danen, E.H., Smit, L., Snoek, M., Le Poole, I.C., Van Muijen, G.N., Pals, S.T. und Ruitter, D.J. (1995) Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int J Cancer*, **64**, 182-188.
- Martin, S., Jansen, F., Bokelmann, J. und Kolb, H. (1997) Soluble CD44 splice variants in metastasizing human breast cancer. *Int J Cancer*, **74**, 443-445.
- Mattei, S., Colombo, M.P., Melani, C., Silvani, A., Parmiani, G. und Herlyn, M. (1994) Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer*, **56**, 853-857.
- Mayer, B., Jauch, K.W., Günthert, U., Figdor, C.G., Schildberg, F.W., Funke, I. und Johnson, J.P. (1993) De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet*, **342**, 1019-1022.

- McCourt, P.A., Ek, B., Forsberg, N. und Gustafson, S. (1994) Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem*, **269**, 30081-30084.
- McCourt, P.A. und Gustafson, S. (1997) On the adsorption of hyaluronan and ICAM-1 to modified hydrophobic resins. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1179-1189.
- McKee, C.M., Penno, M.B., Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C. und Noble, P.W. (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, **98**, 2403-2413.
- Miyake, K., Medina, K.L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T. und Kincade, P.W. (1990a) Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med*, **171**, 477-488.
- Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J. und Kincade, P.W. (1990b) Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med*, **172**, 69-75.
- Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A. und Cheresch, D.A. (1994) Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8856-8860.
- Naor, D., Sionov, R.V. und Ish-Shalom, D. (1997) CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, **71**, 241-319.
- Naujokas, M.F., Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M. und Miller, J. (1993) The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell*, **74**, 257-268.
- Noble, P.W., Lake, F.R., Henson, P.M. und Riches, D.W. (1993) Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest*, **91**, 2368-2377.
- Peach, R.J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I. und Aruffo, A. (1993) Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol*, **122**, 257-264.
- Peck, D. und Isacke, C.M. (1996) CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol*, **6**, 884-890.
- Peck, D. und Isacke, C.M. (1998) Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *J Cell Sci*, **111**, 1595-1601.
- Penno, M.B., August, J.T., Baylin, S.B., Mabry, M., Linnoila, R.I., Lee, V.S., Croteau, D., Yang, X.L. und Rosada, C. (1994) Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res*, **54**, 1381-1387.
- Perschl, A., Lesley, J., English, N., Trowbridge, I. und Hyman, R. (1995) Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding. *Eur J Immunol*, **25**, 495-501.
- Potts, A.J., Croall, D.E. und Hemler, M.E. (1994) Proteolytic cleavage of the integrin $\beta 4$ subunit. *Exp Cell Res*, **212**, 2-9.
- Preece, G., Murphy, G. und Ager, A. (1996) Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J Biol Chem*, **271**, 11634-11640.

- Puré, E., Camp, R.L., Peritt, D., Panettieri, R.A., Jr., Lazaar, A.L. und Nayak, S. (1995) Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J Exp Med*, **181**, 55-62.
- Rafi, A., Nagarkatti, M. und Nagarkatti, P.S. (1997) Hyaluronate-CD44 interactions can induce murine B-cell activation. *Blood*, **89**, 2901-2908.
- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E. und Rosenberg, S.A. (1996) A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, **183**, 1185-1192.
- Rodeck, U., Bossler, A., Graeven, U., Fox, F.E., Nowell, P.C., Knabbe, C. und Kari, C. (1994) Transforming growth factor β production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res*, **54**, 575-581.
- Rothman, B.L., Blue, M.L., Kelley, K.A., Wunderlich, D., Mierz, D.V. und Aune, T.M. (1991) Human T cell activation by OKT3 is inhibited by a monoclonal antibody to CD44. *J Immunol*, **147**, 2493-2499.
- Rünger, T.M., Klein, C.E., Becker, J.C. und Bröcker, E.B. (1994) The role of genetic instability, adhesion, cell motility, and immune escape mechanisms in melanoma progression. *Curr Opin Oncol*, **6**, 188-196.
- Samuel, S.K., Hurta, R.A., Spearman, M.A., Wright, J.A., Turley, E.A. und Greenberg, A.H. (1993) TGF- β 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol*, **123**, 749-758.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schaider, H., Rech-Weichselbraun, I., Richtig, E., Seidl, H., Soyer, H.P., Smolle, J. und Kerl, H. (1997) Circulating adhesion molecules as prognostic factors for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, **36**, 209-213.
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U. und Bell, J.I. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 12160-12164.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S. und Zöllner, M. (1993) Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med*, **177**, 443-455.
- Seth, R., Raymond, F.D. und Makgoba, M.W. (1991) Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet*, **338**, 83-84.
- Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H. und Herrlich, P. (1998) A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev*, **12**, 1058-1071.
- Shih, I.M. und Herlyn, M. (1993) Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol*, **100**, 196S-203S.
- Shijubo, N., Imai, K., Aoki, S., Hirasawa, M., Sugawara, H., Koba, H., Tsujisaki, M., Sugiyama, T., Hinoda, Y., Yachi, A. und et al. (1992) Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigen in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*, **89**, 58-62.

- Simon, J.C., Heider, K.H., Dietrich, A., Wuttig, C., Schöpf, E., Adolf, G.R., Ponta, H. und Herrlich, P. (1996) Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer*, **32A**, 1394-1400.
- Skelton, T.P., Zeng, C., Nocks, A. und Stamenkovic, I. (1998) Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol*, **140**, 431-446.
- Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P. und Ponta, H. (1996a) Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol*, **135**, 1139-1150.
- Sleeman, J.P., Arming, S., Moll, J.F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L.S., Kreil, G., Ponta, H. und Herrlich, P. (1996b) Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, **56**, 3134-3141.
- Sleeman, J.P., Kondo, K., Moll, J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1997) Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J Biol Chem*, **272**, 31837-31844.
- Sleeman, J.P., Rahmsdorf, U., Steffen, A., Ponta, H. und Herrlich, P. (1998) CD44 variant exon v5 encodes a tyrosine that is sulphated. *Eur J Biochem*, **255**, 74-80.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J.M. und Seed, B. (1989) A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*, **56**, 1057-1062.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M. und Seed, B. (1991) The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J*, **10**, 343-348.
- Sy, M.S., Guo, Y.J. und Stamenkovic, I. (1991) Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med*, **174**, 859-866.
- Sy, M.S., Guo, Y.J. und Stamenkovic, I. (1992) Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med*, **176**, 623-627.
- Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X.F., Shimizu, J., Fujiwara, H. und Hamaoka, T. (1991) Transforming growth factor- β -induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*, **146**, 1077-1082.
- Taher, T.E., Smit, L., Griffioen, A.W., Schilder-Tol, E.J., Borst, J. und Pals, S.T. (1996) Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem*, **271**, 2863-2867.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. und Shaw, S. (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature*, **361**, 79-82.
- Tedder, T.F. (1991) Cell-surface receptor shedding: a means of regulating function. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **5**, 305-306.

- Teder, P., Bergh, J. und Heldin, P. (1995) Functional hyaluronan receptors are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines. *Cancer Res*, **55**, 3908-3914.
- Thomas, L., Byers, H.R., Vink, J. und Stamenkovic, I. (1992) CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol*, **118**, 971-977.
- Topalian, S.L., Solomon, D. und Rosenberg, S.A. (1989) Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol*, **142**, 3714-3725.
- Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K. und Miyasaka, M. (1995) A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem*, **270**, 7437-7444.
- Turley, E.A., Moore, D. und Hayden, L.J. (1987) Characterization of hyaluronate binding proteins isolated from 3T3 and murine sarcoma virus transformed 3T3 cells. *Biochemistry*, **26**, 2997-3005.
- Turley, E.A., Brassel, P. und Moore, D. (1990) A hyaluronan-binding protein shows a partial and temporally regulated codistribution with actin on locomoting chick heart fibroblasts. *Exp Cell Res*, **187**, 243-249.
- Turley, E.A., Austen, L., Vandeligt, K. und Clary, C. (1991) Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol*, **112**, 1041-1047.
- Uff, C.R., Neame, S.J. und Isacke, C.M. (1995) Hyaluronan binding by CD44 is regulated by a phosphorylation-independent mechanism. *Eur J Immunol*, **25**, 1883-1887.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. und Boon, T. (1995) A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med*, **182**, 689-698.
- Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. und Boon, T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643-1647.
- Van Muijen, G.N., Danen, E.H., Veerkamp, J.H., Ruiters, D.J., Lesley, J. und van den Heuvel, L.P. (1995) Glycoconjugate profile and CD44 expression in human melanoma cell lines with different metastatic capacity. *Int J Cancer*, **61**, 241-248.
- Wagner, G. und Wyss, D.F. (1994) Cell surface adhesion receptors. *Curr Opin Struct Biol*, **4**, 841-851.
- Wang, R.F., Robbins, P.F., Kawakami, Y., Kang, X.Q. und Rosenberg, S.A. (1995) Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, **181**, 799-804.
- Wang, C., Entwistle, J., Hou, G., Li, Q. und Turley, E.A. (1996) The characterization of a human RHAMM cDNA: conservation of the hyaluronan-binding domains. *Gene*, **174**, 299-306.
- Wang, Y. und Becker, D. (1997) Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med*, **3**, 887-893.

- Watanabe, K. und Yamaguchi, Y. (1996) Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J Biol Chem*, **271**, 22945-22948.
- Wayner, E.A. und Carter, W.G. (1987) Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique α and common β subunits. *J Cell Biol*, **105**, 1873-1884.
- Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J. und Cantor, H. (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, **271**, 509-512.
- Weiss, J.M., Sleeman, J., Renkl, A.C., Dittmar, H., Termeer, C.C., Taxis, S., Howells, N., Hofmann, M., Köhler, G., Schöpf, E., Ponta, H., Herrlich, P. und Simon, J.C. (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., Renkl, A.C., Ahrens, T., Moll, J., Mai, B.H., Denfeld, R.W., Schöpf, E., Ponta, H., Herrlich, P. und Simon, J.C. (1998) Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronate-avidity by human monocytes. *J Invest Dermatol*, **111**, 227-232.
- West, D.C. und Kumar, S. (1989) The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res*, **183**, 179-196.
- Wielenga, V.J., Heider, K.H., Offerhaus, G.J., Adolf, G.R., van den Berg, F.M., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S.T. (1993) Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, **53**, 4754-4756.
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H. und Beach, D. (1995) A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, **269**, 1281-1284.
- Yang, B., Yang, B.L., Savani, R.C. und Turley, E.A. (1994) Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *Embo J*, **13**, 286-296.
- Yu, Q. und Toole, B.P. (1996) A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J Biol Chem*, **271**, 20603-20607.
- Yu, Q., Toole, B.P. und Stamenkovic, I. (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.
- Zawadzki, V., Perschl, A., Rosel, M., Hekele, A. und Zöller, M. (1998) Blockade of metastasis formation by CD44-receptor globulin. *Int J Cancer*, **75**, 919-924.
- Zeimet, A.G., Widschwendter, M., Uhl-Steidl, M., Müller-Holzner, E., Daxenbichler, G., Marth, C. und Dapunt, O. (1997) High serum levels of soluble CD44 variant isoform v5 are associated with favourable clinical outcome in ovarian cancer. *Br J Cancer*, **76**, 1646-1651.
- Zhang, L., Underhill, C.B. und Chen, L. (1995) Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res*, **55**, 428-433.
- Zimmermann, D.R. und Ruoslahti, E. (1989) Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *Embo J*, **8**, 2975-2981.