

# **CD44 und variante Isoformen im murinen System**

---

Vom Fachbereich Biologie, Geo- und Umweltwissenschaften der  
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des  
Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
angenommene Dissertation

**Peter Engel**

Geboren am 21.02.1965 in Bremerhaven

Referent: PD Dr. Peter Jaros  
Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöllner  
Tag der Disputation: 08. 07. 2002

**„Ich möchte lieber eine einzige Ursache begreifen als der König von Persien sein“**

Demokrit von Abdera

meinen Eltern

# Inhalt

## I. Einleitung

<b>1. CD44 Struktur .....</b>	<b>1</b>
1.1 Genomische Organisation .....	1
1.2 CD44 Isoformen .....	2
1.3 Proteinstruktur .....	3
<b>2. Posttranslationale Modifikationen.....</b>	<b>3</b>
2.1 N-Glykosylierung.....	4
2.2 O-Glykosylierung.....	4
<b>3. Funktionen von CD44 .....</b>	<b>5</b>
<b>4. CD44 und seine Liganden.....</b>	<b>6</b>
4.1 Hyaluronsäure .....	6
4.2 Weitere ECM-Liganden .....	8
4.3 Osteopontin .....	9
4.4 Wachstumsfaktoren .....	9
<b>5. Interaktion mit intrazellulären Proteinen.....</b>	<b>10</b>
5.1 Zytoskelett assoziierte Proteine.....	10
5.2 Tyrosinkinasen .....	11
<b>6. CD44 und Metastasierung .....</b>	<b>12</b>
<b>7. Ziel der Arbeit .....</b>	<b>14</b>

## II. Material und Methoden .....

17

<b>1. Material und Bezugsquellen.....</b>	<b>17</b>
1.1 Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur .....	17
1.2 Cytokine .....	19
1.3 Enzyme.....	19
1.4 Plasmide .....	19
1.5 Oligonukleotide .....	19
1.6 Bakterienstämme .....	20
1.7 Peptide .....	20
1.8 Versuchstiere .....	20
1.9 Antikörper .....	21
1.10 Zelllinien und Kulturbedingungen .....	22
1.11 Peptide.....	23
<b>2. Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Zellkultur .....</b>	<b>24</b>
1.1 Einfrieren und Auftauen eukariontischer Zellen .....	24
1.2 Vitalfärbung zur Bestimmung der Lebendzellzahl .....	24
1.3 Präparation und Fraktionierung muriner Lymphozyten.....	24
1.4 Stimulierung und Proliferationsmessung muriner T- und B-Lymphozyten.....	25
1.5 Anreicherung von Peritonealmakrophagen.....	26
1.6 Langzeitknochenmarkkulturen.....	26
1.6.1 Ermittlung der Frequenz koloniebildender Zellen in murinen Knochenmark .....	27
1.7 Generierung dendritischer Zellen aus murinen Knochenmark .....	28
1.7.1 Beladung muriner dendritischer Zellen mit dem Peptid H1.....	28

1.8 Bestrahlung von Zellen .....	29
1.9 Transfektion von Zellen .....	29
<b>2.2 Monoklonale Antikörper .....</b>	<b>29</b>
2.1 Immunisierung von Versuchstieren .....	29
2.2 Zellfusion zur Herstellung von Hybridomen .....	30
2.3 Peptid-ELISA .....	30
2.4 Aufreinigung von Antikörpern .....	31
2.5 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein-G .....	31
2.6 Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte-Sepharose 4B .....	32
2.7 Biotinylierung von Antikörpern .....	32
<b>2.3 Handhabung und Identifizierung von Proteinen .....</b>	<b>32</b>
3.1 Protein-Konzentrationsbestimmung über UV-Extinktion (280/260 nm) .....	32
3.1.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	33
3.2 Kopplung von Petiden an KLH .....	33
3.3 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen .....	34
3.4 Membranpräparation .....	34
3.5 Immunpräzipitation .....	35
3.6 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese .....	35
3.7 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in SDS .....	36
Polycrylamidgelen .....	36
3.8 Immunoblot-Analyse von Proteinen .....	36
<b>2.4 Präparation und Modifikation von DNS und RNS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Herstellung kompetenter Bakterien (A. Nishimura; 1990) .....	37
4.2 Transformation kompetenter Bakterien .....	38
4.3 Isolierung von Plasmid-DNA .....	38
(modifiziert nach Birnboim und Doily, 1970) .....	38
4.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	38
4.5 Restriktionsverdau von DNA .....	39
4.6 Ligation von DNA-Fragmenten .....	39
4.7 Dephosphorylieren von DNA .....	39
4.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	39
4.9 Amplifikation von DNA (Polymerase-Kettenreaktion) .....	40
<b>2.5 Durchflusszytometrische Arbeiten .....</b>	<b>40</b>
5.1 Immunfluoreszenz .....	40
5.1.1 Intrazelluläre Immunfluoreszenz .....	41
5.1.2 Messung des Zellzyklus mittels Propidiumjodid .....	41

### **III. Ergebnisse .....** **42**

3.1 Expressionsmuster von CD44v3 auf murinen Zelllinien .....	3
3.2 Expression von CD44v3 auf hämatopoetischen Progenitorzellen und reifen hämatopoetischen Zellen .....	4
3.3 Einfluss der mAk PtS und Km81 auf die Entwicklung von Langzeitknochenmarkkulturen .....	6
3.4 Generierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark als Modell für antigenpräsentierende Zellen .....	7
3.5 Einfluss von CD44v3, auf die Regulation der LFA-1 Expression .....	9
4.1 Erstellung Reinigung und Kontrolle der Funktionalität eines CD44v3-Rezeptorglobulins .....	10
4.2 Untersuchung der Interaktion zwischen CD44 und LFA-1 .....	12

4.3 Immunpräzipitationen von LFA-1 und CD44 .....	13
4.4 Ligandensuche.....	15
4.5 Die Identifizierung von Osteopontin als spezifischen Liganden von CD44v10.....	16

## **VI. Diskussion..... 84**

Alternatives Spleißen als Grundlage funktioneller Vielfalt .....	85
Verteilung varianter CD44-Isoformen im murinen System.....	86
Einfluss verschiedener anti-CD44s/v-Antikörper auf murine hämatopoetische Zellen unterschiedlicher Reifestadien in vitro .....	87
LFA-1: Ein Steckbrief:.....	89
Variantenspezifische Liganden: Ihre Existenz und Verteilung im murinem System .....	90
Osteopontin: Vom CD44s zum v10 Liganden .....	92
Die Suche nach neuen Liganden .....	93
Die Verbindung zwischen LFA-1 und CD44vX ist indirekter Natur .....	93

## **Literatur.....98**

## **Anhang.....112**

Abkürzungen  
 Lebenslauf  
 Erklärung  
 Danksagung

# I. Einleitung

1980 beschrieb Robert Dalchau ein humanes Leukozyten-spezifisches Membran Glykoprotein (1). Das von Dalchous monoklonalem Antikörper F10-44-2 erkannte Protein sollte in den folgenden zehn Jahren eine Reihe von Namen bekommen, die eine Vielzahl von Funktionen widerspiegeln:

Phagozytotisches Glykoprotein (Pgp-1) (2), extrazellulärer Matrixrezeptor III (ECMR-III) (3), Hyaluronan Receptor-1 (Hutch-1) (4), Homing-Cell-Adhesion-Molecule (HCAM) (5), In(Lu)-related p80 (6) und schließlich Hermes- Antigen (7).

Jeder dieser Namen steht synonym für eines der variabelsten Zelloberflächenmoleküle überhaupt: **CD44**.

Die Liste CD44 exprimierender Zelltypen reicht von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten über Thymozyten, Fibroblasten, Epithelien und Erythrozyten (8,9,10) bis hin zu Gliazellen und glatten Muskelzellen (11).

Sein Molekulargewicht reicht von 37kd in der unglykosilierten Standardform bis hin zu 140-250 kd schweren Chondrotinsulfat-Seitenketten tragenden Varianten.(8,12,13).

Grundlage dieser Variabilität sind neben der Glycosilierung zehn verschiedene variante Exons, die, alternativ gespleißt und unterschiedlich kombiniert die Standardform des Moleküls ergänzen können. Inwieweit diese 10 Exons jedes für sich oder in Kombination die Funktionalität des gesamten Moleküls beeinflussen, ob sie z.B. spezifische Liganden binden oder die Bindung von Liganden der Standardform verändern, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Dieser Fragestellung mit besonderem Augenmerk auf die Varianten drei, sieben und zehn widmet sich diese Arbeit.

## 1. CD44 Struktur

### 1.1 Genomische Organisation

CD44 ist ein 80-250 kD schweres, Typ I (extrazellulärer N-Terminus) Transmembran-Glykoprotein (14). Das für CD44 kodierende Gen wurde in Maus, Mensch und Ratte identifiziert (15,16,17).

Das murine CD44 Gen besteht aus 21 Exons (18), während für das humane Homolog nur 20 Exons identifiziert wurden (19, 20).

Grundsätzlich lassen sich zwei Exongruppen unterscheiden. Abb.1 Exon 1-5 und 16-20 bilden gemeinsam die nahezu ubiquitär exprimierte Standardform von CD44, im Folgenden CD44s

genannt. Die zehn variablen Exone 6-15 werden mit V1-V10 bezeichnet und können an der Insertionsstelle zwischen Exon Nummer 5 und 16 alternativ gespleißt die CD44s ergänzen (21-24). Das humane Exon 6 (V1) enthält ein Stopkodon an Aminosäureposition 17 und wird somit nicht exprimiert (25).

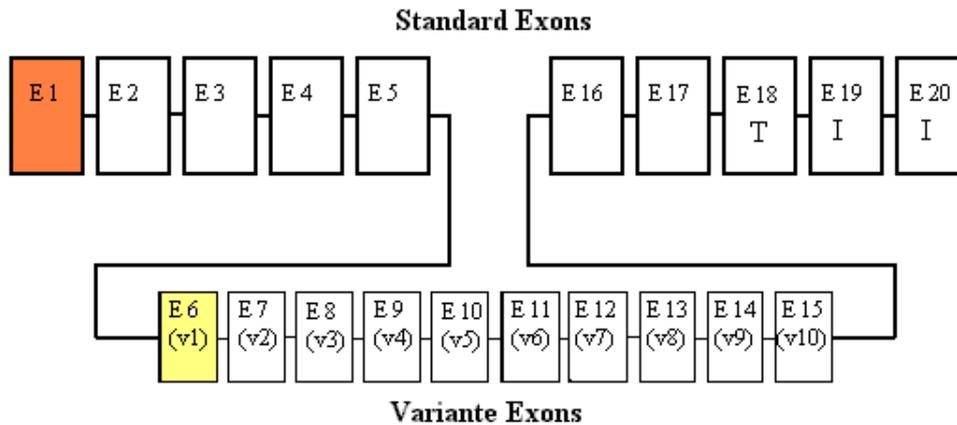


Abbildung 1 (nach Goodison et. al)

E1-E5 und E16-E20 bezeichnen die Standardexons; E6-E15 die variablen Exons  
 T = Transmembrandomäne; I = Intrazelluläre Domäne  
 Die Variante 6 wird aufgrund eines Stopcodons an AS-Position 17 im Menschen nicht exprimiert  
 Das Exon 1 fungiert als Leitpeptid

## 1.2 CD44 Isoformen

Die CD44 Standardform CD44s oder H ist wie beschrieben nahezu ubiquitär exprimiert, lediglich Herzmuskelzellen, tubuläre Epithelien der Niere Hepatozyten, Blutplättchen, Testis und Teile der Haut exprimieren kein CD44 (6).

Ganz anders die Situation die 10 varianten Exons betreffend. Von den theoretisch weit über 1000 Möglichkeiten, sind 45 beschrieben (26). Sie tragen Namen wie CD44M (für Meta-1), wenn die Exons 4-7 eingespleißt wurden oder CD44E für epitheliale Form, welche die Exons 8-10 enthält. Nur von einem einzigem varianten Exon v10 ist bekannt, dass es ohne eine weitere Variante in das Standardmolekül eingespleißt wird. CD44v10 wird auch GP116 oder CD44R2 genannt und wird von einer ganzen Reihe unterschiedlicher humaner Tumoren exprimiert (27-30). Für die epitheliale Form von CD44 ist beschrieben das sie keine Hyaluronsäure zu binden vermag (31). Werden die Variante 8, 9 und 10, welche CD44E bilden, um die Variante 3 ergänzt, haben wir es mit einem neuen Molekül mit gänzlich anderen Eigenschaften zu tun. CD44 v3,8-10 wurde auf Met-1 Zellen, welche von einem stark metastasierenden Brustkrebs stammen gefunden (32) Die Isoform bindet, wenn auch nur

schwach, Hyaluronan und den „*Vascular endothelial growth factor*“ VEGF, ist mit der Metalloprotease MMP9 (Gelatinase B) assoziiert und wichtig für die intrazelluläre Bindung Ankyrins (33,34). Im Folgenden wird immer dann auf variante Formen von CD44 eingegangen, wenn es sich um Isoform-spezifische Eigenschaften handelt oder wenn bestimmte Eigenschaften der Standardform durch Varianten beeinflusst werden.

### 1.3 Proteinstruktur

Die am weitesten verbreitete Isoform von humanem CD44, CD44s oder CD44H (für Hämatopoetisch) besteht aus 363 Aminosäuren, welche ein Proteinerückrad von 37 kD bilden. Das Protein besteht aus drei Regionen, einer 72 AS großen C-terminalen zytoplasmatischen Region, einer transmembranen Domäne von 21 AS und einem extrazellulären Teil von 248 AS. Während die Exons E2-E5 und E16 + E17 für die extrazelluläre Region kodieren, enthält Exon 18 die Informationen für die transmembrane Domäne und für einen kleinen Teil (3 AS) der zytoplasmatischen Region. Letztere wird von Exon 19 und 20 kodiert (35).

Die aminoterminalen 180 Aminosäuren zeigen eine große Homologie innerhalb der Säuger ( $\approx$  85%). Diese Region enthält sechs Cystein-Reste und N-Glykosilierungs-Konsensus-Sequenzen N1 - N5 (36). Die letzten 120 AS dieser Region zeigen eine große Ähnlichkeit zu Hyaluronsäure (HS) -bindenden Proteinen und werden Link Modul genannt (36, 37 Wolfe et al.; 1990).

Lösliche Formen von CD44 wurden in den Seren verschiedener Spezies und in Zellkulturmedium diverser Zelllinien gefunden. Man nimmt an, daß lösliches CD44 durch „*shedding*“ von membranständigem CD44 entsteht. Lösliches CD44 könnte als ein Antagonist zu membranständigem dessen Aufgaben regulieren helfen. So verlieren murine Mammakarzinomzellen, transfiziert man sie mit cDNA für lösliches CD44, ihre Fähigkeit zur Internalisation und Degradierung von HS und zur Metastasierung fast völlig (29,38).

## 2. Posttranslationale Modifikationen

Die große Differenz zwischen den aus der Aminosäuresequenz zu berechnenden theoretischen 37kD und der im SDS-Gel auftretenden 75-90kD großen Standardform von CD44 weist auf starke posttranslationale Modifikationen hin (25).

## 2.1 N-Glykosilierung:

Die bereits erwähnten am aminoterminalen Ende lokalisierten N-Glykosilierungsstellen N1 – N5 scheinen ihre wichtigste Aufgabe in der Regulierung der Hyaluronsäure-Bindungsaktivität zu besitzen (39-41). Die Stärke der Glykosilierung CD44-positiver Zelllinien und normaler B-Zellen schwankt bezogen auf ihren HS-Bindungsstatus sehr.

Vergleicht man das Laufverhalten von CD44 HS-bindender, aktivierbarer und inaktiver Zellen im SDS-Gel vor und nach N-Glycanase Behandlung, so nimmt die N-Glykosilierung mit zunehmender Bindungsstärke ab (41-44). Die Verhinderung der Glykosilierung mittels Tunicamycin aktiviert die HS-Bindung einiger induzierbarer oder aktivierbarer Zelllinien (42,44). N1 und N5 scheint eine besondere Rolle bei der HS-Bindung zuzukommen. Zellen, welche mit einem mutierten murinen CD44 Konstrukt ohne N1 und N5 transfiziert werden, binden HS konstitutiv. Mit dem intakten CD44 transfiziert, entwickeln sie einen induzierbaren Phänotyp (45).

## 2.2 O-Glykosilierung

Der größte Teil möglicher O-Glykosilierungsstellen befindet sich im membranproximalen Teil des Moleküls. Im Gegensatz zur N-Glykosilierung liegen zur Beeinflussbarkeit der HS-Bindung durch O-Glykosilierung widersprüchliche Ergebnisse vor. Während Lesley (44) und Zheng (46) die HS-Bindung unbeeinflusst fanden, wies Dasgupta eine verstärkte HS-Bindung verschiedener Kolon-Karzinom-Zellen nach Inhibierung der O-Glykosilierung nach (47).

Keratin- und Chondrotinsulfat-Seitenketten bilden einen großen Teil O-glykosidischer Modifikationen. Für stark keratinisierte CD44 Kolon-Karzinomzellen wurde eine verminderte HS-Bindung und verstärkte Metastasierung festgestellt. Geringere Keratinisierung hat einen gegensätzlichen Effekt (48)

Chondrotin ist wichtig für die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin (40) und Kollagene. Die Bindung von Chondrotin ist für CD44s (50), aber insbesondere für die Varianten V8-V10 (14,18), beschrieben.

Die Migration von Melanomzellen auf Kollagensubstraten und von Endothelzellen auf Fibrin ist ebenfalls eine Funktion Chondrotinsulfat modifizierten CD44 (50-53).

Erst in diesem Jahr wurde eine spezielle Rolle von Aggrecan, einem Chondrotinsulfat-Seitenketten tragenden Proteoglycan entdeckt. Aggrecanbindung führt zu Oligomerisation von CD44 Molekülen, was zu einer Signaltransduktion via CD44 führen könnte (54)

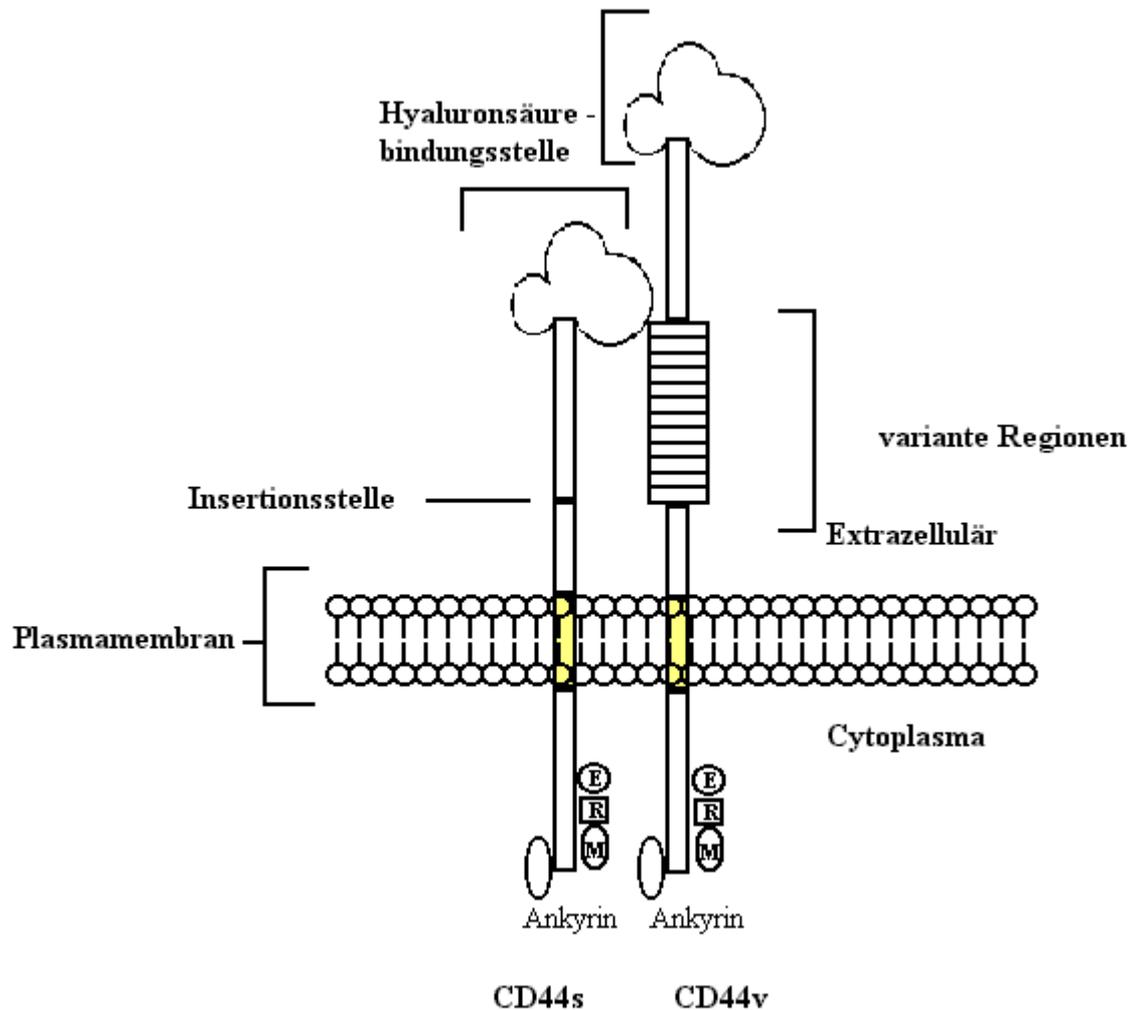


Abbildung 2

Die Standardisoform von CD44 bindet Hyaluronsäure mit der N-terminalen membrandistal gelegenen Hyaluronsäurebindungsstelle. Die Insertion von varianten Exons (v1 – v10) kann die Affinität der Bindung zu HS beeinflussen und die Bindung zusätzlicher Liganden erlauben. CD44 ist über **Ankyrin** und Moleküle der ERM-Familie (**Ezrin**, **Radexin**, **Moesin**) mit dem Zytoskelett verbunden.

### 3. Funktionen von CD44

Synonyme wie „*Homing-Cell-Adhesion-Molecule*“ (HCAM) 5 oder Extrazellulärer-Matrix-Rezeptor-III (ECMR III) 3 geben einen Hinweis auf die Vielfalt von Funktionen, die von CD44 erfüllt werden.

Die Bindung extrazellulärer Matrixproteine führt zu homotypischer Zell-Zell-Adhäsion (16). Bekanntestes Beispiel für eine CD44 vermittelte heterotypische Adhäsion ist die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen (55). Die Zunahme der Expression von CD44 auf antigen-aktivierten T-Lymphozyten und die hyaluronsäurevermittelte Bindung an vaskuläres Epithel führt zur Extravasation von inflammatorischen T-Zellen in Entzündungsherde der Maus und des Menschen (40,57,58).

Auf die besondere Rolle von Keratin- und Chondrotinsulfatseitenketten bei der Migration von Melanomzellen auf Kollagen und von Endothelzellen auf Fibrin (52-55) ist schon hingewiesen worden.

CD44-abhängige Signaltransduktion über Tyrosinkinase (56) als Folge von HS Bindung oder Kreuzvernetzung durch anti-CD44 Antikörper, ist ebenso beschrieben wie eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und eine damit verbundene Expression einer Reihe von Chemokinen (59,60).

Erst kürzlich wurde die Rolle von CD44 als kostimulatorisches Molekül und sein Anteil an der Aktinfilament-abhängigen Bildung von Oberflächenrezeptoreinheiten und der Reorganisation von s.g. „*Lipid-Rafts*“ beschrieben (61). Versuche mit der T-Helferzelllinie IP12-7 weisen CD44 als ein kostimulierendes Molekül aus. Die Kreuzvernetzung von CD44s durch den anti-CD44-mAk IM-7 auf diesen Zellen führte zu Adhäsion, Spreading und einer Umstrukturierung des Aktin-filament-Gerüsts. Diese CD44 abhängige Umstrukturierung führt zu einem Einwandern der Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> neben CD44 selbst in Glycolipid-reiche Microdomänen. Cytochalasin B und Nocodazol, welche Aktin bzw. die Mikrotubuli hemmen verhindern sowohl Spreading als auch die nachfolgenden Ereignisse. Mit einer dominant negativen Form der Rac GTPase transzfizierte IP12-7 Zellen zeigen ebenfalls kein IM-7 induzierbares Spreading, was für eine Beteiligung des Enzyms zu einem frühen Zeitpunkt der Signaltransduktionskaskade spricht (61)

Über die besondere Rolle von CD44 bei der Metastasierung verschiedenster Krebsformen soll später genauer eingegangen werden. Im Mittelpunkt der meisten Funktionen von CD44 steht seine Fähigkeit, Hyaluronsäure zu binden, was uns zum nächsten Abschnitt führt.

## 4. CD44 und seine Liganden

### 4.1 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist ein hochmolekulares Glykosaminoglykan bestehend aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin. Je nach Kettenlänge werden Molekulargewichte von bis zu 6000 kD erreicht. 1934 erstmals von Karl Meyer aus dem Glaskörper des Auges isoliert, wurde es lange für einen einfachen extrazellulären Raumfüller ohne besondere Aufgaben gehalten. Mit der Entdeckung HS-bindender Zelloberflächenrezeptoren wie CD44 oder HARC (*Hyaluronic Acid Receptor Complex*) änderte sich diese Einschätzung (62).

CD44 besitzt prinzipiell 3 Hyaluronsäurebindungsstellen. Das s.g. "Linkmodul" wird von Exon 2 kodiert (63), die beiden anderen von Exon 5 (64).

CD44 kann in Bezug auf die HS-Bindung in drei verschiedenen Aktivierungszuständen auftreten. Konstitutiv-aktiv (einige Tumorzelllinien), aktivierbar und nicht-aktivierbar (65,66). Das interessanteste dieser drei Stadien ist sicherlich das Aktivierbare. Von den unterschiedlichen Mechanismen der HS-Bindung und ihrer Regulierung wurde einer schon beschrieben und zwar der Einfluss der posttranslationalen Modifikation durch N-Glykosylierung (s. N-Glykosylierung). Ein weiteres Regulativ scheint die Größe des dargebotenen HS zu sein. Mindestens ein Hexasacharid ist notwendig, um von CD44 gebunden zu werden (67,68).

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit dem Mechanismus der Aktivierung der HS-Bindung von CD44. Anti-CD44 Antikörper mit einer multivalenten Bindungsstelle sind ebenso in der Lage, HS-Bindung zu stimulieren, wie anti-CD3 mAk oder der Phorbol-ester und PKC-Aktivatoren PMA (69-72).

Studien mit Jurkat-T-Zellen, welche mit humanem CD44 transfiziert wurden, haben einen entscheidenden Einfluss der zytoplasmatischen Domäne auf die HS-Bindung bestätigt.

Unbehandelte Transfektanten waren nicht in der Lage, HS zu binden. Kreuzvernetzung von CD3 oder die Behandlung mit PMA führen zu einer Reorganisation des Zytoskelettes und einer verstärkten Verbindung von CD44 und verschiedener Teile desselben (73-79). Die Wirkung von PMA lässt sich durch Behandlung der Zellen mit Taxol® (Abbau von Mikrotubuli), Colchicin (Wirkung ähnlich der von Taxol) und Cytochalasin D (Hemmung der Aktinpolymerisation) hemmen. Die durch anti-CD44 mAk ausgelöste HS-Bindung bleibt von Taxol und Colchicin, nicht aber von Cytochalasin D unbeeinflusst. Ein Hinweis darauf, dass reine Kreuzvernetzung des Moleküls nicht ausreicht, sondern eine Reorganisation des Aktinfilamentes erforderlich ist. Für PMA ist beschrieben, dass es zu einer kovalenten Dimerisierung von CD44 auf der Zelloberfläche führt (71), ein Vorgang, bei dem ein Cysteinrest der Transmembrandomäne von CD44 (cys286) eine entscheidende Rolle spielt, ebenso wie die Phosphorylierung von CD44 nach PMA-Behandlung (76,77). Eine Dimerisierung von CD44 wird auch durch die Kreuzvernetzung der Zeta-Kette von CD3 bewirkt und geht der HS-Bindung voraus (78). Die hier beschriebene Voraussetzung einer Dimerisierung von CD44 für die HS-Bindung bietet einen Erklärungsansatz für das Phänomen, dass sich für CD44 Rezeptorglobuline oftmals keine Bindung an Hyaluronsäure nachweisen lässt (79 und diese Arbeit). Die Tatsache, dass die HS-Bindung stark metastasierender Kolonkarzinom-Zellen reduziert ist (48), lässt einen Einfluss der CD44-Hyaluronsäure-Interaktion auf das Metastasierungspotential von Krebszellen vermuten. Jüngst wurde ein Szenario, bei dem verschiedene CD44 Isoformen durch unterschiedliche Konzentrationen von

HS moduliert werden und Tumorzellen schlussendlich in Apoptose treiben, von Robert Stern und Kollegen beschrieben (80). Zwei Brustkrebszelllinien namentlich MDA435 und MDA 231 sowie eine Karzinomzelllinie der Mundschleimhaut HSC3 wurden für 1h oder 20 h in Gegenwart oder Abwesenheit von Hyaluronidase kultiviert. Anschließend wurde mittels RT-PCR und immunhistologischen Methoden die Expression von CD44s und varianten Formen untersucht. Während eine 20 stündige Inkubation von MDA231 Zellen mit Hyaluronidase zu vollständigem Verlust der Expression von CD44-Standard und Varianten Isoformen führte, war die Standardform der beiden anderen Linien gegen die Hyaluronidase-Behandlung resistent. Als einzige variante Form wurde CD44v8-10 auf HSC3-Zellen nach Hyaluronidase Behandlung weiter exprimiert. Stern diskutiert die dauerhafte Anwesenheit von Hyaluronan auf der Zelloberfläche als Voraussetzung für die Stabilisierung instabiler CD44 mRNA. Die mRNA für CD44s und CD44v8-10 in HSC3 Zellen wäre demnach stabil. Die nachgewiesene Fähigkeit von Tumorzellen mit der Änderung ihres CD44 Expressionsmusters auf Signale ihrer Umwelt zu reagieren, erklärt die Schwierigkeiten, verschiedenen Tumorarten ein einheitliches CD44 Expressionsmuster zuzuweisen. Eine Aufklärung des genauen Mechanismus, welcher der Modulation der verschieden CD44-Isoformen durch Hyaluronidase zugrunde liegt, könnte Basis für einen neuen prognostischen Faktor für die Beurteilung der Entwicklung verschiedener Tumoren sein .

Zu der Überlegung, dass am Ende der Modulation von CD44-Varianten die Apoptose der betroffenen Zellen stehen könnte, veranlassen Stern weitere Ergebnisse.

1. Immundefiziente Mäuse reagieren mit einer Reduktion implantierter menschlicher Tumoren auf Hyaluronidase-Behandlung (80).

2. Die Abnahme der Expression von CD44v7-10 in humanen Brustkrebszellen führt zu Wachstumshemmung und Apoptose der betroffenen Zellen (81) (Formby, B 1999).

Die genaue Untersuchung des Einflusses von CD44s und seinen Varianten auf das Tumorstadium ist als Basis für neue Therapieansätze unerlässlich.

## **4.2 Weitere ECM-Liganden**

Fibronektin und Kollagene als CD44 Liganden und ihre speziellen Aufgaben im Lymphozyten „Homing“ und Migration wurden schon benannt (s. posttranslationale Modifikationen). Die Bindung an Fibronektin wird über Chondrotinsulfatseitenketten vermittelt, die an Exon 5 des Standardmoleküls und insbesondere an den Varianten V8 – V10 assoziieren (82). Auch Laminin bindet auf diese Weise an CD44 (6).

### 4.3 Osteopontin

Osteopontin (auch Eta-1 „*early T-Lymphocyte activation 1*“) ist ein weiterer Ligand für CD44 (83– 84 und diese Arbeit). Osteopontin wird konstitutiv von Osteoklasten und Epithelzellen exprimiert. Eine Hochregulation findet während inflammatorischer Prozesse in mononukleären Zellen des Immunsystems statt. Osteopontin wirkt als Chemoattraktant auf murine und humane T-Zellen und Makrophagen und scheint außerdem über eine Stimulierung der IL-12 und Inhibierung der IL-10 Produktion entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer zellvermittelten Immunantwort (Typ 1) zu nehmen (85). Osteopontin verfügt über eine Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) Bindungsstelle für Integrine (84). Bisher wurde Osteopontin RGD-unabhängig als Ligand für CD44s und speziell für die Variantenkombination 6-10 beschrieben (85,86), eine solche Bindung allerdings auch energisch bestritten (87). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Bindung von Osteopontin an CD44v10, nicht jedoch für eine Bindung an CD44v3 oder CD44s.

### 4.4 Wachstumsfaktoren

Die Fähigkeit verschiedener CD44-Varianten zur Bindung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren ist für eine Vielzahl der von CD44 wahrgenommenen Aufgaben verantwortlich. Die Tatsache, dass ein antiCD44v6 mAk in der Lage ist, Tumorwachstum *in vivo* zu unterdrücken (88) und die Aktivierung von T- und B-Zellen zu beeinflussen (89), scheint mit seiner Fähigkeit, die Bindung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 8 (FGF8) zu unterbinden, in Zusammenhang zu stehen (90). Auch für den Makrophagen-Inhibitorischen-Faktor 1 beta (MIP-1beta) wurde eine Bindung an CD44 nachgewiesen. In diesem Fall sind es Keratinsulfat (s. Posttranslationale Modifikationen) modifizierte Isoformen von CD44, die vorzugsweise von Epithelzellen exprimiert werden. Sie sind, so glaubt man, für die Präsentation des Zytokins an T-Zellen zuständig, um so deren Extravasation einzuleiten (91). Eine besondere Rolle bei der Bindung von Wachstumsfaktoren spielt die CD44 Variante 3. V3 kann über ein Ser-Gly-X-Ser Motif eine Heparansulfat-Seitenkette binden (92) Diverse Proteine, unter ihnen verschiedene Wachstumsfaktoren, stellen aufgrund ihres Vermögens, an Heparansulfat zu binden, potentielle CD44v3-Liganden dar. Für den basalen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (b-FGF), den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und den Heparin-bindenden-epidermalen Wachstumsfaktor ist eine Bindung an CD44v3 bereits nachgewiesen worden (94,92).

Tabelle 1 (modifiziert nach S.Tumova et. al (93))

Proteingruppe	Ligand
Wachstumsfaktoren und Zytokine	FGF-1
	FGF-2
	HGF
	HB-EGF
	Interferon- $\gamma$
	Interleukin-8
	PDGF-AA
Virale Proteine	Platelet factor 4
	Glycoprotein C
Enzyme	Lipoprotein Lipase
Protease Inhibitoren	Anthithrombin III
Extrazelluläre Matrix Proteine	Laminin
	Fibronectin

## 5. Interaktion mit intrazellulären Proteinen.

### 5.1 Zytoskelett assoziierte Proteine

Wichtige intrazelluläre Bindungspartner von CD44 sind Ankyrin und die Mitglieder der ERM-Familie EZRIN, Radixin, und Moesin (95).

Das Zytoskelett-Protein Ankyrin wurde erstmals als kreuzvernetzendes Molekül des Bande-3-Proteins in Erythrozyten identifiziert (96). Ankyrin scheint eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion zu übernehmen (97)

Eine Ankyrin-Bindungsstelle zwischen AS 306 und 3020 bei der Maus sowie AS 304 und 318 im Menschen ist identifiziert worden (98,99). Die Bindung von Ankyrin an CD44 wird über die Palmitinilierung von CD44 gesteigert (100) und durch Bindung des Proteins 4.1 an CD44 verhindert (101).

Die Folgen einer Ankyrin-CD44-Interaktion sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch beobachtet worden, dass die Bindung einer CD44v3,8-10 Variante an Ankyrin in einer metastasierenden Brustkrebszelllinie mit Kolo-kalisation mit einem aktiven Metalloprotease-Komplex in Pseudopodien einhergeht (102). Auch eine positive Wirkung auf die Hyaluronsäure-Bindungsaktivität von Met-1-Zellen (einer von einem stark metastasierenden Brustkrebs stammenden Zelllinie) wurde beschrieben (103).

Die Bindungsstelle für die ERM-Proteine liegt nahe der Zytoplasmamembran und ist ebenfalls identifiziert (95). Die ERM Proteine und Ankyrin stellen die Verbindung von verschiedenen Oberflächenproteinen mit dem Aktinfilament-Gerüst der Zelle her. Das könnte auch eine Erklärung für den Einfluss auf die HS-Bindungsaktivität CD44 exprimierender Zellen sein (s. CD44 und seine Liganden, Hyaluronsäure).

Erst kürzlich ist die Bedeutung eines weiteren cytoskelletassozierten Proteins in den Focus der CD44-Forschung gerückt, MERLIN.

Merlin steht für **M**oesin-**E**zrin-**R**adexin-**L**ike Protein und wird von dem NF2 gen codiert, welches auf dem Humanen Chromosom 22 zu finden ist. Die N-Terminale Region von Merlin weist eine 65%ige Homologie zu den ERM-Proteinen auf. Merlin wirkt Wachstumshemmend und eine Mutation des NF2 gens führt bei den schwannschen Zellen des Nervensystems zu Hyperplasien und „Schwannomas“. Helen Morrison beschrieb zu Beginn dieses Jahres einen Komplex aus Merlin, den ERM-Proteinen und CD44 als einen „molekularen Schalter“ zur Kontrolle des Zellwachstums. Befinden sich die Zellen in der Logarithmischen Wachstumsphase, so liegt Merlin phosphoryliert und in einem Komplex mit dem ebenfalls phosphorylierten ERM-Proteinen an den cytoplasmatischen Teil von CD44 gebunden vor. Die Bindung von CD44 an seinen Liganden Hyaluronan führt zur schnellen Dephosphorylierung von Merlin der Freisetzung der ERM-Proteine aus dem Komplex und schließlich zur Inhibition des Zellwachstums. Nach erfolgreicher Identifikation des verantwortlichen Signaltransduktionsweges, könnte CD44/Merlin zu neuen vielversprechenden Ansätzen in der Tumorthherapie führen (104/105)

## 5.2 Tyrosinkinase

Eine weitere Interaktion wurde für CD44 und der Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> in humanen T-Lymphozyten nachgewiesen, was zu einer Phosphorylierung von ZAP-70 in Lymphozyten als Folge von CD44 Kreuzvernetzung führen könnte (106). CD44 vermittelte Proteinkinaseaktivität wurde für Glycosphingolipid-reiche Plasmamembran-microdomänen (lipid-Raft's) nachgewiesen. Immunpräzipitationsversuche zeigten eine Assoziation von CD44 und den Src-Tyrosin-Kinasen Lck und Fyn in diesen Membranfraktionen geringer Dichte. (107) Die Formen von CD44, welche die Variante enthalten stellen die Verbindung zu einer weiteren Tyrosin-Kinase her, c-Met.

Die Heparansulfat-Seitenkette von v3 bindet wie beschrieben (s.Tab.1) neben anderen Wachstumsfaktoren auch den **H**epatocyte **G**rowth **F**actor HGF, den Hauptrezeptor von c-Met. Namalwa Burkitt-Lymphom-Zellen wurden 1999 von Steven Pals und Mitarbeitern

entweder mit C-Met allein oder in Kombination mit CD44s oder CD44v3 transfiziert. CD44v3 führte zu einer HGF-abhängigen Phosphorylierung von c-Met und der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. Sowohl Heparinase Behandlung der Zellen als auch die Verwendung von HGF-Mutanten mit herabgesetzter c-Met Affinität führten zu einer starken Verringerung des Effektes.(108)

Als vorläufig letztes Mitglied wurde L-Selektin in die Familie der CD44 Liganden aufgenommen. Charles J.Dimitroff und Kollegen entdeckten eine posttranslational modifizierte Isoform auf CD34-positiven humanen hämatopoetischen Stammzellen (109)

## 6. CD44 und Metastasierung

Anti CD44v6 Antikörper sind wie beschrieben (3.4 Wachstumsfaktoren) in der Lage, Tumorwachstum in vivo zu unterdrücken (88).

Mit cDNA für lösliches CD44 transfizierte Mammakarzinomzellen metastasieren weniger stark (38), und lösliches CD44-Rezeptorglobulin vermag die Metastasierung im murinen System zu unterdrücken (110). Eine CD44-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie metastasiert nach Transfektion mit dem Gen für CD44 (111). Ein Zusammenhang zwischen CD44 und dem Metastasierungspotential von Tumorzellen ist offensichtlich.

Versuche mit CD44 transfizierten XXX-Zellen in Nacktmäuse ergaben interessante Resultate. Nur die Transfektanten waren nach subkutaner Applikation in der Lage zu metastasieren und nur die in der Lunge nachgewiesenen Mikrometastasen zeigten eine Expression von CD44. Die am Applikationsort verbliebenen Zellen exprimierten kein CD44, so dass eine Inhibition der Expression angenommen werden muss (112 Kogerman et. Al 1997).

Die Transfektion von Zellen mit verschiedenen Onkogenen ist ebenfalls in der Lage die CD44 Expression zu beeinflussen. Mit H-ras oder K-ras transformierte Zellen wiesen im Vergleich zur Ausgangszelllinie eine stark erhöhte CD44 Expression auf. Sie banden auch verstärkt Hyaluronsäure, mit der Folge einer positiven Selektion von Tumorzellen mit erhöhtem Metastasierungspotential (113 Kogerman et.al 1996).

Die Wirkungen von CD44 HS-Interaktionen auf die Tumorentwicklung sind vielfältig und sollen am Beispiel der Mikrometastasierung eines Brustkrebses in die Lunge erläutert werden:

Die Bindung einer malignen Brustkrebszelle über CD44s an mesothelialen Zellen der Pleura erfolgt über Hyaluronsäure. Die Bindung von CD44 an seinen Rezeptor führt zu einer Reorganisation der Mikrotubuly innerhalb der Zelle, sie wird „mobil“. Dem ersten Schritt der Anheftung folgt die Migration durch die pleurale Membran. Mit diesem zweiten Schritt einher geht die Internalisierung des CD44-HS-Komplexes und seines Verdaus in Lysosomen, wo durch Hydrolasen kleine Hyaluronan-Fragmente entstehen, hauptsächlich Tetra- und Hexasacharide und ein geringerer Anteil größerer Oligosacharide. Letztere wirken als Chemoattraktant für andere Tumorzellen. Ihre Konzentration auf der apikalen Seite der mesothelialen Zellen ist signifikant höher als auf der basalen Oberfläche. Tumorzellen migrieren entlang des niedermolaren HS-Gradienten in die Lunge (114-116) Eine weitere entscheidende Folge von HS Internalisierung und Degradierung ist die angiogenetische Wirkung ihrer Oligosacharide. Das Einwandern von Blutgefäßen sichert dem Tumor dauerhaftes Wachstum (117). Die beschriebenen Wirkungen sind sämtlich mit der Standardform von CD44 zu erklären. Die Tatsache, dass die Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 sowie HGF ebenfalls Angiogenese bewirken, führt uns zum Einfluss von Varianten wie V3, deren Insertion die Bindung dieser Wachstumsfaktoren ermöglichen.

Immer häufiger wird das Auftreten respektive Ausbleiben von Varianten auf Tumorgewebe als prognostischer Faktor gesehen. CD44v5 Expression ist z.B. als früher Marker für kolorektale Karzinome genannt worden (118). Für die Variante CD44v6 beschrieb (119) einen negativen Einfluss auf das Überleben von Kolorektalkarzinom Patienten, ein Zusammenhang der von Koretz et.al (1996) nicht bestätigt wurde(120). Gotley et. al fand 1996 (121) mittels RT-PCR und monoklonalen mAk keine der CD44 Varianten mit Progression des Kolonkarzinoms assoziiert und stellte eine Verbindung zwischen den Tumorstadien des Kolonkarzinomes und der CD44 Expression wieder in Frage. Studien über einen Zusammenhang von CD44v5 und CD44v6 und Mammakarzinomen führten ebenfalls zu gegensätzlichen Ergebnissen. Bei einer Untersuchung von 130 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom 12 mit lokalen Rezidiven und 18 mit Lymphknotenmetastasen konnte eine Korrelation zwischen der CD44v5/6 Expression und einer kürzeren Überlebensdauer der Patientinnen nachgewiesen werden (122)

Tempfer und Mitarbeiter zeigten 1996 bei 115 Patientinnen, dass die Expression von CD44 v5, v6 und v7/8 im Tumor mit einer schlechten Prognose einhergeht(123). In einer anderen Studie mit 227 Patientinnen wurde kein Zusammenhang zwischen CD44v-Expressionen und der Überlebensdauer der Patientinnen gefunden. Es konnte jedoch eine Korrelation zwischen CD44v-Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors beobachtet werden (124).

Eine erhöhte CD44v7,8 Expression steht mit der Entwicklung von Zervix-Karzinomen in Verbindung. Diese Variante lässt sich im gesunden Plattenepithel der Zervix uteri nur in geringen Mengen bzw. nicht detektieren. Im Verlauf der Zervixkarzinogenese nimmt ihre Expression jedoch zu und korreliert mit kürzerem Überleben der Patienten (125). Das Auftreten von CD44v9 wiederum korreliert mit der Entwicklung eines „Magen-Karzinoms“. Auf die besondere Rolle von CD44v6 die Metastasierung von Tumorzellen betreffend ist bereits hingewiesen worden (88), CD44 v6 ist außerdem kennzeichnend für ein aggressives Non.Hodgkin Lymphom (126,127).

CD44 V10 wird mit Brustkrebs in Verbindung gebracht. CD44s exprimierende Brustkrebszellen (HBL100) wurden mit CD44v10 transfiziert. Die Dimerisation von CD44s kam in diesen Zellen nicht zustande was, eine verminderte Bindung an Hyaluronsäure zur Folge hatte. Zudem produzierten die Transfektanten deutlich größere Mengen an angiogenitisch wirkenden Wachstumsfaktoren wie Basalen Fibroblasten Wachstumsfaktor (b FGF) und Interleukin 8 (129)

Die Hochregulation von V10 könnte somit ein entscheidender erster Schritt auf dem Wege zu metastasierenden Brustkrebszellen sein.

Auch der Variante 3 kommt aufgrund ihrer speziellen posttranslationalen Modifikation eine besondere Bedeutung bei der Metastasierung zu.

So scheint CD44v3 ebenso wie CD44v10 mit besonders malignen Brustkrebsformen assoziiert zu sein (119,120).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Dass es sich bei CD44 um ein Molekül von großer Variabilität mit einer Vielfalt von Aufgaben handelt, ist auf den vergangenen Seiten eindringlich dargestellt worden.

So augenfällig der Zusammenhang zwischen diesen beiden Tatsachen auch scheint, so wenig bestimmte er in den vergangenen Jahren die Forschung.

Nachdem das Interesse für die verschiedenen Varianten Anfang der 90er Jahre mit Hinblick auf die Metastasierung maligner Zellen einen Höhepunkt erreicht hatte (14,15,21,88,89), führten sie anschließend nur mehr als Marker für verschiedene Tumoren in teils widersprüchlichen Veröffentlichungen (120, 121,128 u.v.m.) ein Schattendasein.

Wichtige Veröffentlichungen, die Funktionalität von CD44 betreffend, behandelten fast ausschließlich die Rolle der Standardform von CD44 (40, 41, 61,105).

Ziel dieser Arbeit ist es, den Anteil der Varianten an den unterschiedlichen Aufgaben von CD44 auszuloten. Sind sie nichts weiter als Katalysatoren, die den Effekt der Standardform durch ihre Anwesenheit verstärken, zum Beispiel dadurch, dass sie die N-terminale Hyaluronanbindungsstelle ein Stück weit über die zelleigene Glycokalix hinausheben um eine Bindung an den Hauptliganden zu erleichtern. Oder besitzen sie voneinander unterscheidbare eigene Aufgaben.

Eine Möglichkeit der Herangehensweise an dieses Problem ist es, die Verteilung Standard und Varianten von CD44 auf verschiedenen Zelltypen und den Einfluss einer Stimulation dieser Zellen auf deren Expression zu untersuchen. Auch etwaige stimulatorische oder kostimulatorische Eigenschaften von anti-Varianten und anti-Standard Antikörpern auf die verschiedenen Zelltypen sind von Interesse. Hierzu bedarf es mAk gegen die verschiedenen Varianten und des Standards von CD44. Kommerzielle Antikörper gegen die murine Standardform (IM-7 und KM81) sowie ein mAk gegen die murine Variante 10 liegen bereits vor (K926, Mark Rösel). Die Variante 3 gilt wegen ihrer besonderen posttranslationalen Modifikationen (92,94) als vielversprechendes Forschungsobjekt. Ein neu generierter anti-V3-Antikörper (diese Arbeit) sowie Transfektanten, welche CD44 mit jeweils einer einzigen Variante exprimieren (diese Arbeit), sollen einen solchen Vergleich ermöglichen.

Das Vorliegen variantenspezifischer Liganden wäre ebenfalls ein starkes Indiz für eine variantenspezifische Funktion. Fusionsproteine aus dem extrazellulären Anteil von CD44 und der  $\kappa$ -leichten-Kette murinen IgG's, welche entweder einzig den Standardanteil von CD44 oder zusätzlich die varianten Bereiche 3 (diese Arbeit) oder 10 enthalten, sollen die Suche nach solchen Liganden ermöglichen.

## II. Material und Methoden

### 1. Material und Bezugsquellen

Soweit nicht anders angegeben, haben alle Substanzen den Reinheitsgrad „zur Analyse“

#### 1.1 Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

<b>7-AAD (7-Aminoactinomycin D)</b>	Molecular Probes
<b>Acrylamid / bisacrylamid Mix (30 % T, 2,67 % C)</b>	Roth
<b>Ammoniumpersulfat</b>	Sigma
<b>Bromphenolblau</b>	Merck
<b>CNBr-aktivierte Sepharose</b>	Sigma
<b>Concanavalin A</b>	Calbiochem
<b>2-Desoxyglucose</b>	Sigma
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Merck
<b>Ethanol</b>	Riedel de Haen
<b>Ethylendinitrotetraacetiacid (EDTA)</b>	Sigma
<b>Filme</b>	Kodak
<b>Fötale Kälberserum (FKS)</b>	Sigma
<b>Formaldehyd 37 %</b>	Merck
<b>Fycol-Hypaque</b>	Pharmacia
<b>Glycerol</b>	Roth
<b>Glycin</b>	Roth
<b>Hefeextrakt</b>	Gibco BRL
<b>HEPES</b>	Sigma
<b>Iscov's Medium</b>	Sigma
<b>Isopropanol</b>	Riedel de Haen
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma
<b>Membranen</b>	
- PVDF	
- Nitrozellulose	
<b>Methanol</b>	Riedel de Haen
<b>3 MM Whatmanpapier</b>	Whatman
<b>Molekulargewichtsmarker</b>	Amersham Buchler

- full range; rainbow marker©

<b>Mowiol (4-88)</b>	Calbiochem
<b>Nonidet P40 (NP-40)</b>	Sigma
<b>Nylonwolle</b>	Polysciences Europe
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma
<b>Penecillin-Streptomycin</b>	Gibco
- Penecillin (104 E / ml) / Streptomycin (10 mg / ml)	
<b>Peptone 140</b>	Gibco BRL
<b>Plastikware</b>	Greiner
<b>Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)</b>	
- 2,76 mM KCL, 140 mM NaCL, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 265osm, pH 7,4	
<b>Phorbolmyristacetat (PMA)</b>	Sigma
<b>Polyvinylidene-difluorid (PVDF)-Membrahn</b>	Millipore
<b>Propidiumjodid</b>	Sigma
<b>Protease Inhibitor</b>	Boehringer Mannheim
- Complete <sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail tablets	
<b>Protein A Sepharose</b>	Pharmacia
<b>Protein G Sepharose</b>	Pharmacia
<b>Ribonuclease A</b>	Pharmacia
<b>RPMI-1640</b>	Sigma
<b>Trypanblau</b>	Serva
<b>[<sup>3</sup>H]-Thymidin</b>	Amersham Buchler
- 0,74-1,1 TBq / mM (20-30 Ci / mM) 37 MBq / ml (1 mCi / ml)	
<b>TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin)</b>	Sigma
<b>Triton X-100</b>	Sigma
<b>Tween 20</b>	Serva

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „Zur Analyse“ und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), oder Sigma (München) bezogen.

## 1.2 Zytokine

<b>GM-CSF</b>	Strathmann Biotech
<b>IL-2</b>	Strathmann Biotech
<b>IL-4</b>	Strathmann Biotech
<b>IL-7</b>	Strathmann Biotech
<b>Erythropoietin</b>	Sigma

## 1.3 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen; Amersham Buchler (Braunschweig), Boehringer & Mannheim), Pharmacia (Freiburg) Promega (Madison, WI, USA) Stewhelin (Basel, Schweiz) bezogen.

## 1.4 Plasmide

<b>pcDNA3</b>	Invitrogen CA, USA
- Eukariotischer Expressionsvektor	
<b>pMV-7</b>	Kirschmeier et al., 1988
- Retroviraler Expressionsvektor	
<b>pT7T3</b>	U.Günthert, Basel Institut of Immunology,
- Prokariotischer expressionsvektor	Basel, Schweiz ; nicht publiziert
<b>pHT4</b>	Traunecker et al., 1988
- Eukariotischer Expressionsvektor zur Herstellung der CD44-Rezeptorglobuline	

## 1.5 Oligonukleotide

Die Notation erfolgt gemäß der Konvention von 5' nach 3'. Die Positionen beziehen sich auf die von Nottenburg et. Al., (1989) veröffentlichte murine CD44s-Sequenz mit der kompletten Varianten Region v1-10. Mit Position 1 wird der Translationsstart angegeben.

V3s (pos.920-943)

5'-CG GAG TCA AAT ACC AAC CCA ACA G-3'

## 1.6 Bakterienstämme

Die E.coli-Stämme **DH5 $\alpha$** , **XL-1blue** und **K803** wurden für die Replikation der Plasmide verwendet

## 1.7 Peptide

Das **Peptid HA 317-329**, die C-terminale Region der HA1 Domäne des humanen Influenza Virus A/PR/34/8 (H1N1) sowie das **Peptid v3** (varianter Anteil von CD44-v3) wurden von Dr. R. Pipkorn (DKFZ-Heidelberg) mit dem automatischen Syntheseapparat (ABI 433) nach Fmoc Verfahren hergestellt.

Aminosäuresequenz HA 317-329 : **VTGLRNIPSIQSR**

Aminosäuresequenz v3: **EDETDTYPSFSGC**

## 1.8 Versuchstiere

**BALB/c** Mäuse wurden aus der eigenen Zucht im "Zentralen Tierlabor" des DKFZ bezogen. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Verhältnissen (SPF) gehalten und im Alter von 8-10 Wochen für tierexperimentelle Arbeiten verwendet.

**BDX-Ratten** wurden bezogen, von den Charles River Laboratories Germany, Sulzfeld

Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor, einer Einrichtung des DKFZ gehalten und im Alter von 8-10 Wochen für Immunisierungen verwendet.

## 1.9 Antikörper

### Primäre Detektionsantikörper

Antikörper / Klon	Spezies / Isotyp	Quelle / Referenz
Anti-Maus- <b>CD3</b> (145-2C11)	Hamster	ATCC CRL 1975
Anti-Maus- <b>CD4</b> (YTA3.3.1)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	ECACC 89040603
Anti-Maus- <b>CD8</b> (YTS169.4.2.1)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	ECACC 87072284
Anti-Maus- <b>CD11a</b> (M17/5.2)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	ATCC TIB-237
Anti-Maus- <b>CD11b</b> (YBM6.1.10)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	ECACC 89040601
Anti-Maus- <b>CD25</b> -biot. (7D4))	Ratte / IgM	Southern Biotechnology
Anti-Maus- <b>CD28</b> -biot. 37.51	Hamster / IgG	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD31</b> (MEC 13.3)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD43</b> (S7)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD45</b> R (14.8)	Ratte / IgG <sub>1</sub>	ATCC TIB 164
Anti-Maus- <b>CD54</b> (YN1/1.7.4)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	ATCC CRL-1878
Anti-Maus- <b>CD61</b> (2C9.G2)	Hamster / IgG	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD80</b> (1G10)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Southern Biotechnology
Anti-Maus- <b>CD86</b> (GL1)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Southern Biotechnology
Anti-Maus- <b>CD95</b> (MFL3)	Hamster / IgG	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD95L</b> (Jo2)	Hamster / IgG	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD102</b> (3C4)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>CD117</b> (2B8)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	Southern Biotechnology
Anti-Maus- <b>CD154</b> (MR1)	Hamster / IgG	Southern Biotechnology
Anti-Maus- <b>κlight-chain</b> (187.1)	Ratte / IgG <sub>1</sub>	ATCC HB-58
Anti-Maus- <b>CD44s</b> (IM7)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	ATCC TIB 235
Anti-Maus- <b>CD44s</b> (KM81)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	ATCC TIB 241
Anti-Maus- <b>CD44v10</b> (K926)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	M. Roesel, DKFZ-Heidelberg
Anti-Maus- <b>CD44v3</b> (PtS)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Diese Arbeit
Anti-Maus- <b>IL-2</b> (JES6-1A12)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>IL-2</b> -biot. (JES6-5H4)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>IL-4</b> -biot. (BVD4-1D11)	Ratte / IgG <sub>2b</sub>	BIOSOURCE
Anti-Maus- <b>IL-10</b> -biot. (SXC-1)	Ratte / IgM	Pharmingen
Anti-Maus- <b>IL-12</b> -biot. (C17.8)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus- <b>IFNγ</b> -biot. (XMG1.2)	Ratte / IgG <sub>1</sub>	Pharmingen

Anti-Maus-GM-CSF-biot.(MP1-22E9)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	Pharmingen
Anti-Maus-Sca-1 (E13 161-7)	Ratte / IgG <sub>2a</sub>	ATCC HB-215

### Sekundärreagenzien

<b>Ziege-anti-Ratte IgG (H+L), FITC-konjugiert</b>	Southern Biotechnology
<b>Ziege-anti-Ratte IgG (H+L), PE konjugiert</b>	Dianova
<b>Ziege-anti-Ratte IgG<sub>2a</sub> FITC konjugiert</b>	Bethyl Laboratories, Inc.
<b>Ziege-anti-Ratte IgG<sub>2b</sub> FITC-konjugiert</b>	Bethyl Laboratories, Inc.
<b>Anti-Hamster IgG, FITC-konjugiert</b>	Southern Biotechnology
- Gegen Maus- und Ratten-IgG Absorbiert	
<b>Schaf-Anti-Ratte IgG Meerrettichperoxidase konjugiert</b>	Amersham Buchler
<b>Schaf-Anti-Ratte IgG Alkalische-Phosphatase- konjugiert</b>	Amersham Buchler
<b>Streptavidin Meerrettichperoxidase konjugiert</b>	Amersham Buchler
<b>Streptavidin Alkalische-Phosphatase konjugiert</b>	Sigma

## 1.10 Zelllinien und Kulturbedingungen

### **Ag8 (P3X63Ag8.653, ECACC 8511401)**

Murines Myelom, das keine Immunglobuline synthetisiert.

Die Zelllinie wurde in RPMI-1640, 10 % FKS, 2mM L-Glutamin kultiviert.

### **Ag8-CD44 Rezeptorglobulin Standard (Ag8-CD44-Rgs)**

Transfizierte Ag8 Zellen, welche CD44-Rgs produzieren (V. Zawadski, DKFZ Heidelberg)

Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

### **Ag8-CD44 Rezeptorglobulin V10 (Ag8-CD44-Rg10)**

Transfizierte Ag8 Zellen, welche CD44-Rg10 produzieren (V.Zawadski, DKFZ Heidelberg).

Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

### **Ag8-CD44 Rezeptorglobulin V3 (Ag8-CD44-Rg3)**

Transfizierte Ag8 Zellen, welche CD44-Rg3 produzieren (diese Arbeit)

Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

### **IM7 (ATCC TIB 235)**

mAk IM7-(Ratten-IgG<sub>2b</sub>)-produzierende Hybridomzelllinie

Die Zellen werden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

**IP12-7**

Murine CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie, spezifisch für das Influenza-Virus-Hämagglutinin (HA317-329)  
Freundlicherweise von Dr. E. Rajnavolgyi (L. Eotvos University, God, Hungary)  
Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

**J774A.1** (ECACC 91051511)

Murine (BALB/c) Makrophagenzelllinie  
Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

**K926**

mAk K926-(Ratten-IgG<sub>2a</sub>)-produzierende Hybridomzelllinie (M. Rösel, DKFZ Heidelberg)  
Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

**KM81** (ATCC TIB 241)

mAk KM81-(Ratte-IgG<sub>2a</sub>)-produzierende Hybridomzelllinie.

**L929** (ECACC 85011425)

Murine Zelllinie deren Zellkulturüberstand GM-CSF und andere Wachstumsfaktoren enthält

**MS-5**

Murine Stromazelllinie, welche aus einer bestrahlten „Dexter“-Langzeitknochenmarkkultur etabliert wurde (Itoh et al., 1989).

Die Zellen wurden in Iscove's Medium, 10 % Pferdeserum kultiviert

**S17**

Murine Stromazelllinie, welche aus einer mit Mycophenolsäure behandelte „Dexter“-Langzeitknochenmarkkultur etabliert wurde (Collins und Dorshkind, 1987)

Die Zellen wurden in Iscove's Medium, 10 % FKS kultiviert.

**SAT** (Stockholmer-Ascites-Tumor, Tumorbank des DKFZ)

Murine Adenokarzinom-Zelllinie. Der Primärtumor stammt aus der Brustdrüse.

Die Zellen wurden in RPMI-1640, 10 % FKS kultiviert.

**WEHI 3B** (ECACC 86013003)

Murines Myelomozytom welches große Mengen IL-3 produziert.

Die Zellen wurden in Iscove's Medium, 10 % FKS kultiviert

**187.1** (ATCC HB-58)

mAK 187.1-(Ratten IgG<sub>1</sub>)-produzierende Hybridomzelllinie

Die Zellen wurden in DEMEM, 10 % FKS, 2 g L-Glucose / L kultiviert

**1.11 Peptide**

Das **Peptid HA 317-329**, die C-terminale Region der HA1 Domäne des humanen Influenzavirus A/PR/34/8 (H1N1) sowie das **Peptid v3** (varianter Anteil von CD44-v3) wurden von Dr.R. Pipkorn (DKFZ-Heidelberg) mit dem automatischen Syntheseapparat (ABI 433) nach Fmoc Verfahren hergestellt.

Aminosäuresequenz HA 317-329 : **VTGLRNIPSIQSR**

Aminosäuresequenz v3: **EDETDTYPSFSGC**

## 2. Methoden

### 2.1 Zellkultur

Eukaryontische Zellen werden, soweit nicht anders beschrieben, in Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, GREINER) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 92 % inkubiert.

Alle 2-3 Tage erfolgt ein kompletter Austausch des entsprechenden Mediums (Material 1.9).

Suspensionszellen werden im Verhältnis 1: 3 – 1: 10 passagiert. Adhärenente Zellen werden mit Trypsin (0,25 % (w/v) Trypsin in PBS) abgelöst und zur Inaktivierung der Enzymaktivität in Medium 10% FKS aufgenommen. Die pellettierten Zellen (450 x g, 4°C, 5 min) werden anschließend in Medium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis passagiert.

#### 1.1 Einfrieren und Auftauen eukariontischer Zellen

Die Zellen werden pellettiert (450 x g, 4°C, 5min), (trypsinierte adhärenente Zellen werden einmal in PBS gewaschen) und der Überstand wird vollkommen abgesaugt.

Die Zellen werden in 1ml gekühlten Einfriermedium (Kulturmedium, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Eine –80 °C Gefriertruhe eignet sich zur mittelfristigen- (mehrere Monate), die Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff zur Langzeitkonservierung ( mehrere Jahre ).

Kryokonservierte Zellen werden zügig im Wasserbad (37°C) aufgetaut, um anschließend schrittweise mit Kulturmedium (1ml/min) auf 10 ml verdünnt zu werden. Mit der langsamen Verdünnung des DMSO wird ein osmotischer Schock vermieden. Die Zellen werden sedimentiert (450 x g, 4°C, 5min) und nach einem weiteren Waschschrift (10ml Kulturmedium) ausgesäht.

#### 1.2 Vitalfärbung zur Bestimmung der Lebendzellzahl

Zellsuspension und Trypanblau (0,4 % in 0,9 % NaCl) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Tote Zellen färben sich an, während lebende aufgrund ihrer intakten Membran ungefärbt bleiben. Die Zelldichte der Suspension wird durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### 1.3 Präparation und Fraktionierung muriner Lymphozyten

Die Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet. Thymus, Milz, und Lymphknoten werden steril entnommen und in PBS 2 % FKS in Zentrifugenröhrchen (15 ml, GREINER) aufgenommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension werden die Organe mittels eines

sterilen Einwegspritzenkolbens durch ein Gazestückchen gedrückt und die so erhaltenen Zellen 3 x in PBS 2 % FKS gewaschen (für die Präparation von Knochenmark siehe 2.1.3 Langzeitknochenmarkkulturen).

Erythrozyten werden durch eine Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll-Hypaque entfernt oder lysiert (Lysepuffer; 9 Teile 0,16 M NH<sub>4</sub>Cl + 1 Teil 0,17 M Tris, pH 7).

Zur Entfernung von Monozyten werden die Zellen 2h bei 37°C in RPMI-1640, 10% FKS, inkubiert. Monozyten und Makrophagen adhäreren innerhalb dieser Zeit an die Plastikoberfläche, Lymphozyten nicht.

B-Lymphozyten werden durch „Panning“ auf einer mit Anti-Maus-IgM (10µg / ml) beschichteten Plastikpetrischale gewonnen. Hierzu werden die Zellen für 1h bei 37°C auf den beschichteten Petrischalen inkubiert, nicht adhärente Zellen werden anschließend vorsichtig mit RPMI-1640 abgewaschen, anschließend können gebundene B-Lymphozyten durch starkes Spülen mittels einer Pasteurpipette gewonnen werden.

T-Zellen werden über eine Nylonwattesäule angereichert.

Dazu wird eine 50 ml Spritze mit 2 g in RPMI-1640 eingeweichter Nylonwatte (POLYSCIENCES INC.) gefüllt. Die Säule wird mit 25 ml RPMI-1640, 10% FKS äquilibriert und der Säulenauslauf mit einer Kanüle Nr. 18 (BECTON DICKENSON) reduziert. Auf die Säule werden bis zu  $1 \times 10^7$  Lymphozyten aufgetragen, für 30 min bei RT inkubiert. Monozyten und B-Lymphozyten adhäreren an Nylonwolle, T-Lymphozyten hingegen nicht. Durch die folgende Elution mit 50 ml RPMI-1640 10 % FKS bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min wird daher eine angereicherte T-Lymphozytenpopulation (85 % - 95 %) gewonnen.

#### **1.4 Stimulierung und Proliferationsmessung muriner T- und B-Lymphozyten**

Wie unter 2.2 beschrieben angereicherte T-Lymphozyten (1,5 – 2 x 10<sup>5</sup> Zellen / Napf einer 96-Loch Platte in 200µl RPMI-1640, 10 % FKS,) werden mit immobilisierten Anti-Maus-CD3 (1-10 µg/ml), dem Lektin ConA (7,5 µg/ml), oder aus BALB/c Knochenmark generierten dendritischen Zellen (Verhältnis T-Zellen / Dendriten 100 : 1) für einen Zeitraum von 3 Tagen stimuliert. Am Morgen des dritten Tages wird für 8 h [<sup>3</sup>H]-Thymidin (74 x 10<sup>3</sup>Bq/ Loch ≈ 10 mCi /ml) zu den Zellen gegeben. Der [<sup>3</sup>H]-Thymidin Einbau wird nach Ablauf dieser Zeit am Szintillationszähler (β-Plater, LKB Wallac 1205, PHARMACIA, FREIBURG) gemessen. Hierzu werden die Zellen mittels eines Erntegerätes (TOMTEC;

Harvester 96) auf Filtermatten ( $\beta$ -Plater Filtermatten, WALLAC, PHARMARCIA, FREIBURG) aufgebracht und im  $\beta$ -Plater (Fenster 1, 5-320  $\mu\text{eV}$ ) gemessen.

Zur Stimulation von B-Lymphozyten wird LPS (25 $\mu\text{g}$  / ml) eingesetzt, Die Messung der proliferativen Aktivität erfolgt wie oben für T-Zellen beschrieben.

Zur Gewinnung größerer Mengen aktivierter T- oder B-Zellen wird die aus der Milz einer BALB/c-Maus gewonnene Einzelzellsuspension (2.2) in 40 ml des jeweiligen Stimulationsmediums aufgenommen und für 72h kultiviert.

### **1.5 Anreicherung von Peritonealmakrophagen**

BALB/c Mäusen wird zur Anreicherung nicht aktivierter Makrophagen Pepton intraperitoneal injiziert (75 mg in 300 $\mu\text{l}$  PBS / Tier). Am vierten Tag nach der Injektion werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Bauchdecke vorsichtig vom Fell befreit und mit einer Kanüle Nr. 20 (Microlance; BECTON DICKENSON) 4ml PBS/EDTA (Konzentration) injiziert. Nach 10 min. wird das die Zellen enthaltende PBS/EDTA mittels einer 5ml Spritze mit einer Kanüle Nr. 1 (Microlance; BECTON DICKENSON) aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem anschließenden Waschgang in PBS 2 % FKS können die Zellen weiter kultiviert oder für eine Immunfluoreszenz vorbereitet werden.

Injiziert man statt Pepton, LPS (100 $\mu\text{g}$  in 300 $\mu\text{l}$  / Tier) oder Con A (100  $\mu\text{g}$  in 300 ml /Tier) so erhält man aktivierte Peritonealmakrophagen.

### **1.6 Langzeitknochenmarkkulturen**

4-6 Wochen alte BALB/c Mäuse werden durch cervikale Dislokation getötet. Die Röhrenknochen Femur und Tibia werden steril präpariert. Das Knochenmark wird mittels einer Kanüle Nr. 20 (Microlance; BECTON DICKENSON)) mit PBS 2 % FKS ausgespült und durch Baumwollgaze gedrückt. Die so erlangte Einzelzellsuspension wird 2 mal mit je 10 ml PBS 2 % FKS gewaschen und anschließend für eine Immunfluoreszenz oder Langzeitkulturen verwendet.

#### **Langzeitknochenmarkkulturen nach Dexter (130)**

2 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml werden in 8 ml Medium nach Dexter (Iscov's Medium, 5 x 10<sup>-6</sup> M  $\beta$ -Mercaptoethanol , 5 x 10<sup>-5</sup> M Hydrocortison und 20 % Pferdeserum) in einer 50 ml Kulturflasche aufgenommen und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 92 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Wöchentlich wird 50 % des Kulturmediums ersetzt.

**Langzeitknochenmarkkulturen nach Whittlock-Witte (131)**

1 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml werden in 8 ml Medium modifiziert nach Whittlock-Witte ( RPMI-1640, 5 % FKS und 2 % 5fach konz. S17 Kulturüberstand) in einer 50 ml Kulturflasche aufgenommen. Wöchentlich werden 50 % des Kulturmediums ersetzt

**1.6.1 Ermittlung der Frequenz koloniebildender Zellen in murinem Knochenmark**

Die Zellen aus Tibia und Femur von BALB/c Mäusen werden wie beschrieben (1.4) vereinzelt. Unter dem Einfluß verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren lassen sich die Vorläufer der verschiedenen Zelllinien des Blutes definiert zur Teilung anregen. In semisolidem Agar (0,33 % ) ausplattiert, wachsen von je einer einzelnen Vorläuferzelle stammende Kolonien, welche sich unter dem Binokular auszählen lassen. Aus dem Verhältnis Kolonien / ausplattierter Gesamtzellzahl lässt sich der prozentuale Anteil der verschiedenen Vorläufer berechnen.

**C-KBE**

Iscove`s Medium  
20 % Pferdeserum  
15 % WEHI 3B Überstand (IL3-Quelle)  
5 % L929 (M-CSF Quelle)

**GM-KBE (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-bildende-Einheit)**

Iscove`s Medium  
10 % Pferdeserum  
20 % WEHI 3B Überstand

**M-KBE (Makrophagen)**

Iscove`s Medium  
20 % Pferdeserum  
20 % L929 Überstand

**B-KBE (B-Zellen)**

Iscove`s Medium  
20 % FKS  
10 % 5-fach konzentrierter S17-Überstand  
0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
e-KBE (Erythrozyten)

Iscove`s Medium  
10 % FKS  
20 % WEHI 3B Überstand  
10 % BSA (10 % in PBS)  
5 U Epo (Erythropoetin; SIGMA)

## **1.7 Generierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark**

Modifiziert nach Talmor-M (132)

Knochenmarkszellen von BALB/c Mäusen werden wie beschrieben (2.1.3 Langzeitknochenmarkkulturen) präpariert.

$2 \times 10^6$  Zellen / ml werden in DC-Medium (RPMI-1640, 10% FKS, 8ng / ml r-mGM-CSF, 2ng / ml r-mIL-4) aufgenommen und in 50 ml Kulturflaschen (8ml / Flasche) inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 92 % Luftfeuchtigkeit). Nach 48h werden die unreifen Dendriten als leicht adhärenente Zellhaufen sichtbar. Die durch das r-mGM-CSF im Übermaß proliferierenden Granulozyten werden durch vorsichtiges Spülen mit einer 5ml Pipette zusammen mit sämtlichem Medium entfernt und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Pellettieren der Granulozyten wird die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt und die Zellen für weitere 2 Tage inkubiert. Am vierten Tag werden die inzwischen großen Dendritischen-Zellhaufen durch starkes Spülen mittels einer Pasteurpipette von den adhärenenten Stromazellen und Makrophagen getrennt und für weitere 6 Tage kultiviert. Am 6. Kulturtag wird wiederum 50 % des Mediums durch neues ersetzt.

Die am 10 Tag adulten Dendriten können zur Stimulation von T-Lymphozyten (da sie mit ausreichend „Fremdprotein“ aus dem FKS beladen sind) oder für die Immunfluoreszenz verwendet werden. Bei einem großen Anteil Granulozyten am 4. Tag der Kultur eine 1 g Sedimentation durchzuführen.

Nichtadhärenente Zellen abspülen und pellettieren (450 x g, 4 °C, 5min) Zellen in 2 ml RPMI-1640 resuspendieren und in einem 15ml Röhrchen auf 8ml RPMI-1640 / 50 % FKS für 2h, RT, stehen lassen. Die Zellhaufen unreifer dendritischer Zellen sedimentieren rascher als die leichteren Granulozyten. Nach 2 h sind die oberen 10 ml vorsichtig abzupipettieren. Die restlichen 2ml enthalten angereicherte dendritische Zellen, welche wie angegeben weiterkultiviert werden.

### **1.7.1 Beladung muriner dendritischer Zellen mit dem Peptid H1**

Die wie beschrieben (2.4) kultivierten Dendriten werden von Tag 5 - 6 der Kultur in serumfreien DC-Medium (siehe 2.4) gehalten und anschließend für 24h mit 10µg H1 in DC-Medium, 2% FKS beladen. Die so beladenen dendritischen Zellen können mit 50 Gr. bestrahlt (s.II.1.8) und im Verhältnis 1:100 zur Stimulation H1 restringierter IP12-7 (siehe Material 1.9. Zelllinien und Kulturbedingungen) eingesetzt werden (2.2 Stimulierung und Proliferationsmessung muriner T- und B-Lymphozyten)

## 1.8 Bestrahlung von Zellen

Zur Bestrahlung von Zellen wird eine <sup>137</sup>Cäsium-Quelle (Gammacell 1000, ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED) verwendet. Tumorzellen werden mit 300 Gray (entspricht 30 000 Rad), Zellen des Immunsystems mit 20 Gray bestrahlt.

## 1.9 Transfektion von Zellen

Für die transiente oder dauerhafte Transfektion von Zellen wird ein Elektroporationsgerät (EUROGENTEC; Easyject) verwendet.

Hierzu werden  $5 \times 10^6$  Zellen in 500µl RPMI-1640 aufgenommen, zusammen mit 5–15µg der zu transfizierenden DNA in eine Elektroporationsküvette überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Transfektion von Ag8-Zellen (s. Material) mit dem Fusionsprotein Rg3 bzw. CD44v3 wird bei einer Spannung von 250 V und einer Kapazität von 1050 µF durchgeführt. Die elektroporierten Zellen werden auf drei 10cm-Petrischalen verteilt und für 24h in RPMI-1640, 10 FKS, PS inkubiert. Anschließend wird das Medium zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen supplementiert (500 µg G418 für CD44V3 Transfektanten; 125 µg Xanthine, 5 mg Mycophenolsäure für Rg3-Transfektanten). Erfolgreich transfizierte Zellen wachsen als leicht adhärenente Zellhaufen am Boden der Petrischalen und lassen sich mittels einer Pipette mit feiner Spitze (Cristal Tips; FIN) zwecks Klonierung abimpfen.

## 2.2 Monoklonale Antikörper

### 2.1 Immunisierung von Versuchstieren

Das an KLH gekoppelte Peptid CD44v3 (200mg / Immunisierung) wird im Verhältnis 1:2 mit Kompletten Freund's-Adjuvans (tote Mycobakterien in Mineralöl) auf Eis vermischt, bis die entstehende ÖL-in-Wasser Emulsion eine weiße Farbe und hohe Viskosität erreicht hat. Das Gemisch wird dem Tier an 3 Stellen subkutan (100µl / Injektionsstelle bei Mäusen, Ratten und Kaninchen ) injiziert. Im Abstand von jeweils 4 Wochen folgen zwei weitere Injektionen (Boost) von Peptid, diesmal jedoch in inkompletten Freund'schen Adjuvans (reines Mineralöl). 10 Tage nach der 2. Injektion wird der anti-CD44v3 Serumtiter im Peptid-ELISA (s.2.6) bestimmt. Bei ausreichend hohen Titer erhält das Tier an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion von jeweils 200mg gekoppelten Peptid in PBS (200µl bei Mäusen, bis zu 500µl bei Ratten) . Am Tag nach der dritten Injektion wird das Tier durch zervikale Dislokation getötet und die Milz zur Gewinnung von B-Zellen für die Fusion zu

Hybridomen entnommen. Kaninchen werden von Tierpflegern durch Genickbruch betäubt und durch Eröffnung der großen Halsgefäße entblutet.

## 2.2 Zellfusion zur Herstellung von Hybridomen

Köhler, Millstein (1975)

Alle verwendeten Lösungen besitzen Raumtemperatur.

Die Milz und der Thymus (Feederzellen) einer immunisierten Ratte werden steril entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt (s.2.2). Zur Entfernung der Erythrozyten wird eine Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll-Hypaque (SIGMA) durchgeführt (25 min, 250g, 20°C, ohne Bremse). Die gewonnenen mononukleären Zellen (MNZ) werden ebenso wie die für die Verschmelzung benötigten Ag8-Zellen (s. Zelllinien und Kulturbedingungen), 1 x in PBS 2 % FKS gewaschen und anschließend gezählt. MNZ und Ag8 werden im Verhältnis 3:1 in PBS 2 % FKS vermischt und pelletiert (250 x g, 20 °C, 5 min). Nach vorsichtigem Dekantieren des PBS 2% FKS wird das gemischte Zellpellet durch leichtes Klopfen gelockert und in 1,5 ml, tropfenweise zugegebenem PEG (1500; SIGMA), aufgenommen. Das Zell-PEG Gemisch wird auf ein Endvolumen von 45 ml mit PBS verdünnt, wobei die ersten 10 ml sehr langsam zugegeben werden. Anschließend wird zentrifugiert (250 x g, 20 °C, 5 min) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird noch 5 min bei RT belassen, bevor es in 10 ml HAT-Medium (RPMI-1640, 15 % FKS, 0,2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1Fläschchen HAT-supplement; SIGMA/ 500ml) resuspendiert wird. Die frisch verschmolzenen Zellen werden zusammen mit den Thymuszellen als Feeder ( $5 \times 10^4$  Thymozyten / Loch) auf 20 96-Loch-Platten in HAT-Medium ausplattiert. Die Zellen werden wöchentlich durch Austausch von 50% des Mediums gefüttert und, um eine Vermehrung von nicht fusionierten Zellen auszuschließen, für mindestens 4 Wochen in HAT-Medium kultiviert.

## 2.3 Peptid-ELISA

(modifiziert nach Engvall, Perlman, 1971; 134)

Zur Identifizierung von B-Zell-Klonen, die einen gegen CD44v3 gerichteten Antikörper sezernieren, oder des Serumtiters immunisierter Tiere, werden 96-Loch-ELISA Platten (MaxiSorp; Nunc) mit V3-Peptid (10 $\mu$ g / ml) in Bicarbonatpuffer (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>, 3,1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,5) 50 $\mu$ l / Loch bei 4°C über Nacht beschichtet. Anschließend werden mit 1 % RSA in PBS (200 $\mu$ l /Loch, 4°C, über Nacht) freie Bindungsstellen der Plastikoberfläche abgeblockt. Pro Vertiefung werden 50 $\mu$ l des zu testenden Kulturüberstandes oder Serum eines immunisierten Tieres (1:50, 1:100, 1:200 und 1.500 in Bicarbonatpuffer) 1h

bei 37°C inkubiert. Während anschließend mit alkalischer-Phosphatase gekoppelten Anti-Ratte-IgG inkubiert wird (1h, 37°C), wird eine Phosphatase-Substrattablette (SIGMA; Sigma 104 Phosphatase-Substrat-Tabletten ; p-Nitrophenyl Phosphat Dinatrium, 5 mg/ Tablette) in 5ml Diethanolaminpuffer (Diethanolamin 0,1 M, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O und 0,02 % NaN<sub>3</sub> pH 9,8) gelöst. 50µl Substratlösung pro Vertiefung werden für 1h bei RT inkubiert. Die Absorption von Licht der Wellenlänge 405 nm bei einem Referenzfilter von 650 nm wird nach 15, 30, 45 und 60 min in einem ELISA-Plattenphotometer (Anthos Reader 2001, ANTHOS MICROSYTEME GmbH) gemessen. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird jeweils dreimal mit PBS / 0,05 % Tween 20 gewaschen.

## 2.4 Aufreinigung von Antikörpern

Hybridomüberstände werden über Protein-G Sepharose 4B-Säule aufgereinigt. Hierzu wird 1l Kulturüberstand zunächst abzentrifugiert und filtriert (450 x g, 4°C, 5min; Membranfilter 0,2µm, SATORIUS) und anschließend über Nacht bei 4°C und einer Fließgeschwindigkeit von 1ml / min auf eine mit 20mM Phosphatpuffer äquilibrierte Protein-G-Säule geleitet. Die Säule wird mittels einer FPLC-Einheit (PHARMACIA) eluiert. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 20 mM Phosphatpuffer von der Säule gewaschen. Gebundene Antikörper werden mit einem 0,1 M Glycinpuffer pH 3,3 eluiert und in Fraktionen von 2ml, welche photometrisch auf ihren Proteingehalt untersucht werden, gesammelt. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum eingengt (Kollodiumhülsen mit einer Trenngrenze von 12400 Dalton; Vakuumkonzentrationseinheit beides ; SATORIUS)) Nach Dialyse gegen PBS wird die Konzentration des mAK bestimmt (2.7) und Abschließend sterilfiltriert.

## 2.5 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein-G

(Nach Simanis und Lane 1985; 135)

Zur kovalenten Kopplung von Antikörpern an Protein-G-Sepharose werden je 3mg mAK pro ml Säulenmaterial in Kopplungspuffer (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M in 0,5 M NaCl , pH 8,5) im Verhältnis Säulenmaterial zu mAK 1 : 3 für eine Stunde im Überkopfschüttler bei RT rotiert. Anschließend wird zweimal in Boratpuffer (0,2 M Natriumborat, pH9 ) gewaschen (5min, 3000 x g, RT). Das resultierende Pellet wird im 10-fachen Volumen Boratpuffer aufgenommen und ein Aliquot von 10 µl für spätere Kontrolle der Kopplungseffizienz entnommen. Dimethylpimelimidate (lyophilisiert) wird bis zu einer Endkonzentration von

20mM in den Ansatz gegeben, für 30 min bei RT über Kopf rotiert und nach Ablauf dieser Zeit ein weiteres Aliquot von 10 µl entnommen.

Um die Reaktion zu stoppen, wird einmal mit 0,2 M Ethanolamin, pH8 gewaschen und anschließend für weitere 2 Stunden bei RT im gleichen Puffer geschüttelt. Nach einem letzten Waschschrift in Ethanolaminpuffer wird das Säulenmaterial in PBS 0,01 % merthiolate aufgenommen.

Zur Kontrolle der Kopplungseffizienz werden je 1 und 9 µl der vor und nach der Kopplung entnommenen Aliquots in Lämmly Puffer aufgeköcht und in einem 10 %igen SDS Gel mit anschließender Coomassie-brilliant-blau Färbung ausgewertet. Der Anteil schwerer Ketten (55,000 mW) sollte vor Kopplung hoch, nach Kopplung gering sein.

## **2.6 Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte-Sepharose 4B**

1g lyophilisierte CNBr-Aktivierte-Sepharose 4B (PHARMACIA) wird mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen (ergibt Ca 3,5 ml Gel). Das Gelmateriale wird mit 10 mg in Kopplungspuffer (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M in 0,5 M NaCl , pH 8,5) äquilibrierten Antikörper, im Verhältnis Gel / Antikörperlösung 1:2 über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wird das Gel abzentrifugiert (1000 x g, 4°C, 10 min) der Überstand verworfen und freie Bindungsstellen mit Glycin (0,2 M, pH 8) blockiert (über Nacht bei 4°C). Anschließend wird alternierend je dreimal mit Kopplungs- und Acetat Puffer (0,1 M KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> in 0,5 M NaCl, pH4) gewaschen. Abschließend wird die Säule mit Phosphatpuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,2) äquilibriert.

## **2.7 Biotinylierung von Antikörpern**

Der zu biotinylierende Antikörper wird auf eine Konzentration von 1mg / ml eingestellt und in Bicarbonatpuffer (0,1 M, PH 8,4) äquilibriert. Zu jedem ml Antikörperlösung werden 75µl einer frisch angesetzten Stammlösung von Biotin-N-succinimid-Ester in DMSO (1mg / ml) pipettiert und das Gemisch für 4h bei RT rotiert. Anschließend wird zwei Tage bei täglichen Pufferwechsel gegen PBS dialysiert und die Antikörperkonzentration erneut bestimmt.

## 2.3 Handhabung und Identifizierung von Proteinen

### 3.1 Protein-Konzentrationsbestimmung über UV-Extinktion (280/260 nm)

Voraussetzung für diese Methode sind klare Lösungen, da Trübungen in dem verwendeten Wellenlängenbereich zu fehlerhaften Extinktionswerten führen können.

Die Methode basiert auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Da für die Messung stark verdünnte Lösungen verwendet werden, benötigt man nur wenig Material (100µl bei entsprechender Küvette). Ammoniumsulfat und andere Salze stören die Bestimmung nicht. Triton-X-100 besitzt eine hohe Eigenextinktion bei 280 nm, so dass durch dieses Detergenz gelöste Proteine auf diesem Wege nicht bestimmt werden können.

Die Störung durch Nukleotide kann durch Messung der Extinktion bei 260 nm eliminiert werden.

Zur Errechnung der Proteinkonzentration wird die Formel von Warburg und Cristian verwendet

$$C \text{ Protein (mg/ml)} = 1,55 \times E_{280} - 0,67 \times E_{260}$$

#### 3.1.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

10 mg Coomassie Blau G 250 werden in 50 ml 95 % (v/v) Ethanol und 100 ml 85 % (w7v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gelöst, mit Bidest H<sub>2</sub>O auf 1000ml aufgefüllt und filtriert. Die Lösung wird in einer braunen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

Aus einer 10 mg/ml Stammlösung RSA in H<sub>2</sub>O werden durch Verdünnung Protein-Standardlösungen (0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1mg/ml) hergestellt.

Jeweils 1ml Bradfordlösung wird mit 10µl Probe bzw. Eichlösung in einem Eppendorfhütchen vermischt. Nach 15 bei RT werden die Extinktionen bei 590 und 450 gegen Bidest H<sub>2</sub>O gemessen. Die Proteinkonzentration muss über den Quotienten  $E_{590}/E_{450}$  mittels der über die Standardlösung ermittelten Eichkurve bestimmt werden.

### 3.2 Kopplung von Petiden an KLH

Das aufgrund seiner Größe und Konformität nur wenig immunogene Peptid CD44v3, wurde an Keyhole limpet hemocyanin (KLH; Calbiochem) gekoppelt, bevor es zur Immunisierung von Ratten und Kaninchen eingesetzt wurde. Der m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid-Ester MBS verbindet Schwefel- mit Aminogruppen. Das zu koppelnde Peptid muss daher eine

C-terminale freie SH-Gruppe aufweisen, weshalb CD44v3 mit einem zusätzlichen Cystein synthetisiert wurde.

5 mg KLH werden in Phosphatpuffer (0.5ml, 0,01 M, pH7) gelöst und über Nacht bei 4°C gegen 4 l desselben Puffers dialysiert. 70µl einer frisch angesetzten Stammlösung von m-maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid-Ester-Dimethylformamide (MBS/DMF) 2mg/200µl (0,05 m Phosphatpuffer pH 6,0) werden zusammen mit dem dialysierten KLH für 30min bei RT im Überkopf-Rührer durchmischt. Das KLH/MBS-Gemisch wird auf einer mit Phosphatpuffer (10ml, 0.05 M, pH 6) äquilibrierten Nap-5-Säule (Sephadex G25) aufgetragen und mit ca. 2ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6 eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen von ca. 100µl aufgefangen und die Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm im Photometer gemessen. Der erste Peak zeigt freies MBS an, der zweite, MBS/KLH, ist durch eine starke Trübung leicht zu erkennen. Der pH der vereinigten MBS/KLH Fraktionen wird mit 0,1M NaOH bzw HCL auf 7,2 eingestellt. 5mg Peptid werden in PBS gelöst (sollte das Peptid in PBS unlöslich sein, bietet 6 M Guanidin-HCL/0,01M Phosphat-Puffer, pH 7 eine Alternative) und zusammen mit dem KLH/MBS für 3h, RT, pH 7,3 gerührt, um anschließend ausgiebig gegen destilliertes Wasser dialysiert zu werden.

### 3.3 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

2 x 10<sup>7</sup> lebende Zellen (Trypan-Blau-Ausschluß) werden viermal in PBS-Ca<sup>++</sup> / Mg<sup>++</sup> gewaschen, in 2 ml 0,2 mg / ml Biotin-X-NHS (CALBIOCHEM) in PBS-Ca<sup>++</sup> / Mg<sup>++</sup> resuspendiert und 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler rotiert. Adhärenente Zellen werden in der Kulturflasche belassen und für 1 h auf einer Wippe für 1h bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml 25 mM L-Lysin in PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> gestoppt.

### 3.4 Membranpräparation

Suspensionszellen werden nach zweimaligem Waschen in PBS in 2ml eiskaltem dentergensfreien Lysepuffer (30 %iges PBS, 5mM EDTA, 0,2 % Natriumazid, 10mM Iodacetamid, Complete Proteasehemmer 1Tablette / 10 ml, 100µg /ml PMSF) pro 250 ml Zellkulturflasche, aufgenommen. Adhärenente Zellen werden direkt in eiskalten Lysepuffer 3ml/ 250 ml Kulturflasche geschabt und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wird das Zellgemisch 5 x in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im heißen Wasser (°C60 wieder aufgetaut. Diese Behandlung führt zur schonenden Lyse der Zellen . Das Lysat wird für 5 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und für weitere 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. Auf diese Weise werden unvollständig lysierte Zellen und

Zellkerne aus dem Lysat entfernt. Der Überstand der 2000 x g Zentrifugation wird für 1 Stunde bei 4°C und 100000 x g in einer Ultrazentrifuge (BECKMANN;L5-65) zentrifugiert. Die pelletierten Membranen können direkt in Lämmly-Puffer oder einem detergentenhaltigem Lysepuffer aufgenommen und entsprechend weiterverarbeitet werden.

### 3.5 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von Tumorzelllinien werden  $2 \times 10^6$  Zellen dreimal mit 10ml eiskalten PBS gewaschen (450 x g, 5 min, 4°C), der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in 0,5 ml Lysepuffer aufgenommen. Adhärente Zellen werden ebenfalls dreimal gewaschen und anschließend direkt in der Kulturschale mit 2ml Lysepuffer lysiert, mit einem Zellschaber in ein 15 ml Röhrchen überführt und 1h bei 4°C rotiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach Addition von 10 % (v/v) Protein-G-Sepharose (in PBS 0,1 % NaN<sub>3</sub>; CALBIOCHEM) wird 2 h – über Nacht bei 4°C rotiert und anschließend zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wird zusammen mit 1 – 5 µg des präzipitierenden Antikörpers bei 4°C rotiert. Nach 1h wird der Antikörper durch erneute Zugabe von 10 % (v/v) Protein-G-Sepharose präzipitiert und zentrifugiert (12000 x g, 10min, 4°C). Das Pellet wird dreimal in 1ml Lysepuffer gewaschen, bevor es mit Hilfe einer Kanüle Nr 20 (Microlance, BEKTON DICKINSON) und einer Wasserstrahlpumpe trockengesaugt wird.

#### Lysepuffer

50 mM Tris-HCL ph 8,0  
150 mM NaCl  
0,02 % NaN<sub>3</sub>  
100 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)\*  
1Complete<sup>®</sup> Tablette / 10 ml Puffer  
1 % NP-40

### 3.6 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese

Proteine werden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Laemmly, 1970; 136) analysiert. Hierzu werden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert, um in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt zu werden. Die Elektrophorese erfolgte in einer BioRad Minigel Apparatur. Es wurden Trenngele mit Acrylamid Konzentrationen von 6 – 10% verwendet. Das Sammelgel enthält 6 % Acrylamid. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proteine in Probenpuffer aufgenommen und zwecks Denaturierung für 5 min auf 95 °C erhitzt.

<b>Sammelgel</b>	1,4 ml	H <sub>2</sub> O
	0,33ml	30 % Acrylamid-Mix
	0,25ml	1.0M Tris (pH6,8)
	0,02ml	10 % SDS
	0,02ml	10 % Ammonium persulfat
	0,002ml	TEMED

<b>Trenngel</b>	% Acrylamid	6	8	12
	H <sub>2</sub> O	2,6 ml	2,3 ml	1,6 ml
	30 % Acrylamid-Mix	1,0 ml	1,3 ml	2,0 ml
	1,5 M Tris (pH8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
	10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,06 ml
	10 % Ammonium-persulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
	TEMED	0,004 ml	0,003 ml	0,002 ml

<b>Laemmli (Probenpuffer)</b>		reduzierend	nicht reduzierend
	Tris-HCL, pH 6,8	62,5 mM	62,5 mM
	Glycerin	20 % (v/v)	20 % (v/v)
	SDS	2 % (v/v)	2 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	

<b>SDS-Laufpuffer</b>	25 mM Tris-base
	192 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS

### 3.7 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in SDS Polycrylamidgelen

In SDS-Polycrylamidgelen aufgetrennte Proteine werden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wird das Gel für 15 min in Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250, 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure, 0,5 ml pro cm<sup>2</sup> Gelfläche) eingelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wird für 30 min in Entfärber 1 (H<sub>2</sub>O, EtOH und Eisessig anteilig (v/v) 5:5:1) und schließlich bis zum deutlichen Sichtbarwerden der Banden in Entfärber 2 (wie 1, anteilig 9:1:1) gewaschen. Abschließend wird das Gel in einem Geltdrockner (BIO RAD; Gel dryer 583) im Vakuum getrocknet.

### 3.8 Immunoblot-Analyse von Proteinen

Die SDS-electrophoretisch aufgetrennten Proteine werden in einer Nasstransferzelle (Trans-Blot; BioRad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Transfer werden das Gel, Transferschwämmchen und 3MM Papier in Transferpuffer äquilibriert. Eine Methanol aktivierte PVDF-Membran wird unter Vermeidung von Luftblasen auf das Gel aufgebracht, welches zwischen je einem Schwämmchen und einer Lage 3MM Papier in die Transferzelle eingespannt wird. Der Transfer erfolgt über Nacht (30 V, 300 mA Limmit).

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgt für 1h in TBS / 5 % fettfreies Milchpulver. Anschließend wird für eine weitere Stunde mit dem Primärantikörper (2 –10 µg/ml in TBS/0,05 Tween 20, 1 % Milchpulver) inkubiert. Nicht oder unspezifisch gebundener Antikörper wird durch viermaliges waschen der Membran in Waschpuffer (0,5 ml / M2 Membranfläche) entfernt. Eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich-peroxidase gekoppelten Sekundärreagenz (Zweitantikörper oder Streptavidin) schließt sich an. Abschließend wird viermal gewaschen und die noch feuchte Membran für 1min mit ECL-Reagenz (AMERSHAM; ECL-kit) inkubiert, anschließend zwischen 3MM-Papier getrocknet und für eine Zeit zwischen 30 sec. und mehreren min. einem Röntgenfilm (KODAK;) exponiert.

<b>Transfer Puffer</b>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
------------------------	---

<b>Waschpuffer</b>	0,1 M Tris-HCL, PH7,4 150 mM NaCl 0,05 % (v/v)Tween 20
--------------------	--

## 2.4 Präparation und Modifikation von DNS und RNS

### 4.1 Herstellung kompetenter Bakterien (137)

Um kompetente Bakterien zu erhalten, wird 50ml Medium A (LB-Medium supplementiert mit 10mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 % Glucose) mit 0,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen Über-Nacht-Kultur inokuliert. Die Bakterien werden im Schüttelinkubator bei 37°C und 150 UpM bis zu einer OD von 0,3 - 0,4 bei einer Wellenlänge von 600nm inkubiert. Die Bakterien-suspension wird zentrifugiert (1500 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. Es wird mit 5 ml ebenfalls eiskaltem Medium B (36 % Glycerin, 12 % PEG (MW 7500), 12 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) aufgefüllt und in Portionen von 100µl aliquotiert.

Die Aliquots sollten in Trockeneis/Methanol oder flüssigen Stickstoff schnell eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

**LB-Medium**

Per Liter:

10 g Pepton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
1ml 1M NaOH

**4.2 Transformation kompetenter Bakterien**

100  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA (500ng oder weniger ungespaltene Plasmid-DNA; 10 $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz für 90 sec auf  $42^{\circ}\text{C}$  erwärmt und wieder auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium wird für 1h bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttelinkubator inkubiert. Im Falle einer Transformation mit ungespaltenem Plasmid werden 50 ml des Ansatzes auf einer Selektions-Agarplatte (1,5 % (W/v) Bacto-Agar in LB-Medium; 100 $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) ausplattiert. Wird legierte Plasmid-DNA für die Transformation verwendet, so werden die Bakterien zunächst sedimentiert (4000 x g, 5 min  $4^{\circ}\text{C}$ ), 900  $\mu\text{l}$  des Überstandes verworfen und das gesamte Pellet in den restlichen 100 $\mu\text{l}$  resuspendiert und ausplattiert.

**4.3 Isolierung von Plasmid-DNA** (modifiziert nach Birnboim und Doily, 1970; 138)

Ampicillinresistente Bakterien werden von der Agarplatte mit einer Platinöse in ein Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium ( mit 100 $\mu\text{g}$  b/ml Ampicillin) überführt und 6 – 20 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. 1,5 ml Bakteriensuspension werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß sedimentiert (11000 x g,  $5^{\circ}\text{C}$ , 5min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}$  RNase frisch zugeben) resuspendiert. Ist das Bakterienpellet vollständig gelöst, wird 300  $\mu\text{l}$  Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 300  $\mu\text{l}$  Puffer 3 (2,55 M Kaliumacetat pH4,8) werden ausgefallene chromosomale Bakterien-DNA und unlösliche Zellwand-bestandteile abzentrifugiert (11000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min.) Der Überstand wird mit in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (11000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 2min). Plasmid-DNA und bakterielle RNA (wässrige Phase) werden in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 660 $\mu\text{l}$  Isopropanol gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wird bei 11000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$  30 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die pelletierte

Plasmid-DNA mit 700  $\mu$ l eiskaltem Ethanol gewaschen (11000 x g, 4°C, 3 min.), getrocknet und in 30 ml TEA-Puffer oder Aqua-dest aufgenommen.

#### **4.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird die Absorption von UV-Licht der Wellenlängen 260 und 280 nm durch eine Nukleinsäurelösung gegen das jeweilige Lösungsmittel in einem Spektralphotometer gemessen. Eine  $A_{260}$ -Einheit entspricht dabei 50  $\mu$ g / ml DNA, 40  $\mu$ g / ml RNA oder 20  $\mu$ g / ml einer Einzelstrang-Oligonukleotidlösung. Das Verhältnis der Absorptionen 260 / 280 gibt Aufschluss über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Ein Quotient von 1,8 entspricht reiner DNA, einer von 2,0 reiner RNA.

#### **4.5 Restriktionsverdau von DNA**

Eine Enzymeinheit definiert sich als die Menge Enzym, welche 1  $\mu$ g Lamda-DNA in einer Stunde vollständig verdaut.

Die Spaltungen werden in vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen in 20  $\mu$ l Gesamtvolumen durchgeführt. In der Regel werden 2 $\mu$ g DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. In Abhängigkeit von der Aktivität des jeweiligen Enzyms und der Reinheit der zu spaltenden DNA werden 3 – 5 Enzymeinheiten pro  $\mu$ g DNA zum Reaktionsansatz gegeben und dieser 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNA weiter modifiziert oder in einem Agarrosegel geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **4.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation erfolgt bei 16°C über Nacht. Pro Ansatz werden ca. 200 ng Plasmid-DNA mit einem zwei bis dreifachen Überschuss an einzufügender DNA und 2 Units T-4-Ligase (SIGMA) in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l inkubiert.

#### **4.7 Dephosphorylieren von DNA**

Um eine intramolekulare Ligation von Plasmid-Vektoren zu vermeiden, werden deren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu werden 20 $\mu$ l einer DNA-Restriktions-Reaktion oder 20 $\mu$ l restriktionsgespaltener „geglätteter“ DNA mit 2,4 $\mu$ l zehnfach konzentrierten Phosphatase-Puffer (0,5 M Tris-HCL pH 9,3 , 10 mM MgCL<sub>2</sub>, 1 mM ZnCL<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin) und 1,6  $\mu$ l alkalischer Phosphatase versetzt und 1h bei 37°C inkubiert.

## 4.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Entsprechend der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden 0,5 - 2 %ige Agarosegele verwendet. Agarose wird in entsprechender Konzentration (w/v) in TAE-Puffer (20 mM Tris-HCL, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromidlösung versetzt. Die auf etwa 60°C abgekühlte Gellösung wird in eine Flachbett-Gelapparatur gegossen und ein Taschenformer in das noch flüssige Gel eingesetzt. Die zu analysierenden Proben werden mit 1/10 Vol. Gel-Ladepuffer (25 % Ficoll Typ 400, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und durch Unterschichten mit einer Hammiltonspritze in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 80 mA in TAE-Puffer. Die ihrer Größe nach aufgetrennten DNA-Fragmente werden im UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert.

## 4.9 Amplifikation von DNA (Polymerase-Kettenreaktion)

5ng Plasmid-DNA oder 1µl einer Erstrang-cDNA-Synthese werden in Gegenwart von 25 mM Glycin-KOH pH 9,3 , 50 mM KCL; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,2 mM dNTP's, jeweils 50pmol der beiden Amplifikationsprimer und 0,5 E thermostabiler DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen (Anzahl der Segmente, Denaturierung-Hybridisierung-Synthese oder nur Denaturierung-Synthese) die Dauer der einzelnen Segmente, die Temperatur im Hybridisierungssegment und die Anzahl der Zyklen , richten sich jeweils nach der Länge und der Abundanz des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sowie der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub> für „melting temperature“) der Amplifikationsprimer und sind empirisch zu ermitteln. Typischerweise denaturiert man 10 s bei 94°C, hybridisiert 10s bei einer Temperatur, die 3–3 °C unter der errechneten Schmelztemperatur liegt.

## 2.5 Durchflusszytometrische Arbeiten

### 5.1 Immunfluoreszenz

Alle Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C.

Für die Immunfluoreszenz werden direkt mit einem Fluorochrom (FITC, PE, Oregon green) markierte, biotinierte und unmarkierte Erstantikörper verwendet. Zur Untersuchung der Verteilung von Oberflächenantigenen markierte Zellen werden mit einem EPICS-XL Gerät (COULTER) oder einem FACS-CALIBUR (BECTON DICKINSON) analysiert.

Hierzu werden  $5 \times 10^5$  Zellen / Probe in einem Loch einer 96-Loch-Platte in 50  $\mu\text{l}$  des gewählten Estantikörpers in FACS-PUFFER (PBS 2 % FKS) in zuvor austitrierter Konzentration für 30 min inkubiert. Anschließend wird dreimal mit FACS-Puffer (200  $\mu\text{l}$  /Loch) gewaschen. Bei unmarkierten oder biotinilierten Erstantikörpern erfolgt eine zweite Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörpern bzw. Streptavidin, der weitere 3 Waschgänge mit FACS-Puffer folgen. Für den Ausschluss toter Zellen im Durchflusszytometer wird 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, 1 $\mu\text{g}$  / ml FACS-Puffer) zu den Zellen gegeben. 7-AAD ist nicht in der Lage, die intakte Zellmembran lebender Zellen zu durchdringen und ermöglicht so den Ausschluss toter Zellen bei der Analyse mit den oben genannten Geräten. Doppelfluoreszenzen werden, wenn möglich, zeitgleich mit direkt-markierten bzw. sukzessive mit unmarkierten Erst- und isotypspezifischen Zweitantikörpern durchgeführt.

### **5.1.1 Intrazelluläre Immunfluoreszenz**

Alle Inkubationen erfolgen auf Eis.

Für die Markierung intrazellulärer Antigene werden die zu markierenden Zellen ( $1 \times 10^6$  / Probe) fixiert ( 2 % Formalinlösung in PBS, 30 min ,4°C) und anschließend dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Es folgt die Permeabilisierung der Zellen ( 1 % Tween 20 in PBS, 30min). An viermaliges Waschen mit FACS-Puffer schließt sich eine unter (5.1) beschriebene Immunfluoreszenz an.

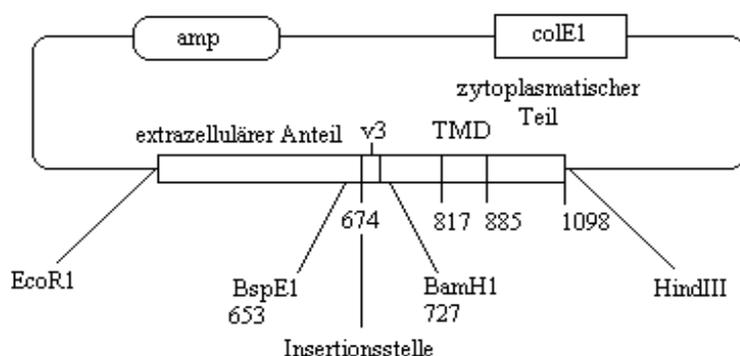
### **5.1.2 Messung des Zellzyklus mittels Propidiumjodid**

Zur Messung des Zellzyklus werden  $2 \times 10^6$  Zellen pro Probe in einer 96-Loch-Rundbodenplatte pellettiert (450 x g, 5 min, 4°C). Zwecks Fixierung und Permeabilisierung in einem Arbeitsgang werden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem 70 %igen Ethanol resuspendiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wird für 30 min bei RT mit 100 $\mu\text{l}$  Färbelösung (PBS, DNase freie RNase 200  $\mu\text{g}$  / ml; 5  $\mu\text{g}$  PI / ml) inkubiert. Die gefärbten Zellen werden in einem FACS-Calibur analysiert. G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>-Phase lassen sich anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität identifizieren. Die Färbung kann mit der vorangegangenen Färbung eines Oberflächenantigens (mit Fluoreszeinisothiocyanat) kombiniert und als Doppelfluoreszenz analysiert werden.

### III. Ergebnisse

Am Beginn der Arbeit stand die Herstellung eines anti-murines-CD44v3 Antikörpers. Zu diesem Zweck wurde ein synthetisches 12AS langes Peptid murinen V3's (Peptidsynthese des DKFZ, Dr. R. Pippkorn) zur Immunogenitätssteigerung an KLH gekoppelt. BDX-Ratten wurden über 3 Monate mit dem Peptid-KLH-Gemisch immunisiert. Die Milzzellen der Tiere, in deren Serum ein entsprechend hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte, wurden nach der Methode von Köhler und Milstein fusioniert, in Mikrotiterplatten ausgesät und in HAT-Medium selektioniert. Bei der zweiten Fusion wurde in 923 von 960 belegten Näpfen Wachstum von Fusionszellen beobachtet. Die Testung der Überstände im Peptid-ELISA auf V3-bindende Antikörper ergab 47 positive Überstände. Jedoch nur in 7 dieser Überstände fanden sich Antikörper, die ein natives v3-Epitop auf der CD44V1-10 positiven Zelllinie KLN erkannten. Die Zellen, welche den Antikörper mit der höchsten Affinität sezernierten, das heißt diejenigen, welche KLN-Zellen in der Durchflusszytometrie mit der höchsten Intensität (Meanfluoreszenz) markierten, wurden kloniert und expandiert.

Um die Spezifität des neuen Antikörpers (PtS) sicherzustellen, wurde die v3 negative Ag8-Linie mit murinem CD44v3 transfiziert werden. Hierzu wurde die murine v-3cDNS mittels RT-PCR aus dem bereits vorhandenen prokariotischen Vector pT7T3-CD44v1-10 amplifiziert und anschließend in einen nur für den Standardteil klonierenden pT7T3 CD44s Kassettenvektor inkliniert. Die erfolgreiche Ligation wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen BspEI, welches an Position 653 und BamHI, welches an Position 727 der cDNS für CD44-Standard schneidet, überprüft (Nummerierung nach Nottenburg et al., 1989, wobei Position 1 den Translationsstart angibt. 139). Bei erfolgreicher Ligation der v3-Sequenz ergibt sich statt des 84 Basenpaar großen Standardstückes, ein 210 Basenpaar großes Fragment. Die beiden Fragmente lassen sich anhand des Größenunterschiedes im Agarosegel unterscheiden.



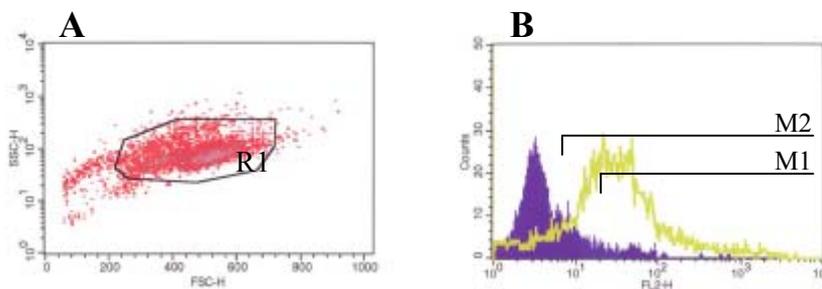
#### Vektor pT7T3 CD44v3

Abkürzungen :

amp,  $\beta$ -Lactamasegen;  
ColEI, Ursprungsort der  
Replikation des Plasmids

Abbildung 1

Aufgrund der ungewöhnlich vielfältigen „multiple Cloning Side“ von pT7T3 ließ sich das Konstrukt CD44v3 in eine Vielzahl von Vektoren umklonieren. Für die Transfektion und Expression in eukariotischen Zellen wurde das Konstrukt über Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII in den Vektor pMV-7 einkloniert, der das bakterielle Transposon Tn5 $neo^r$  zur Selektion stabiler Transfektanten in Gegenwart des Neomycin-Analogons Geneticin<sup>®</sup>-Sulfat (G418) besitzt. Mit pMV7CD44v3 transfizierte Ag8-Zellen wurden über G418 selektioniert und kloniert. Mittels einer Immunfluoreszenzanalyse nicht transfizierter und v3-transfizierter Ag8 Zellen konnte die Spezifität des mAk PtS 33 für CD44v3 nachgewiesen werden (**Abbildung 2**).



**Durchflußzytometrie:** **A:** Dot-Plot von Ag8-Zellen; **B:** „Overlay“ von PtS gefärbten Ag8-Zellen, untransfiziert (Fläche) und pMV7CD44v3 transfiziert (Linie)

### Abbildung 2

Anhand der in Abbildung 2B dargestellten Überlagerung der Färbung untransfizierter (Fläche) und CD44v3-transfizierter Zellen (Linie) mit PtS soll eine grundsätzliche Erklärung zur Analyse durchflußzytometrischer Messungen erfolgen.

Der mit M1 gekennzeichnete Marker schließt 2,8 % der untransfizierten, und 64,3 % der transfizierten Zellen ein. Für den Marker M2 sind es 19,6 % untransfizierter und 88,5 % CD44v3-transfizierter Zellen. Da, verglichen mit den untransfizierten Kontrollzellen, sich alle transfizierten Zellen sich auf der X-Achse nach rechts bewegen, sind sie zu 100% positiv. Die X-Achsenwerte beschreiben die s.g. durchschnittliche Fluoreszenzintensität. Je größer die Anzahl eines bestimmten Proteins auf, oder bei intrazellulärer Immunfluoreszenz, in der Zelle, umso größer ist die Zahl bindender Antikörper und der an sie gebundenen Fluorochrommoleküle. Wären z.B. CD44v3 Moleküle in zehnfacher Konzentration auf der Zelle vorhanden, würden 10 x mehr Antikörper an die Zelle binden. Die Folge wäre eine Steigerung in der Fluoreszenzintensität um durchschnittlich zwei 10er-Potenzen statt um eine. Bewegt sich die gesamte Zellpopulation nach rechts, ist sie zu 100% positiv, wobei es für die Prozentangabe keine Rolle spielt, wie weit sich die Zellen nach rechts bewegen, das heißt

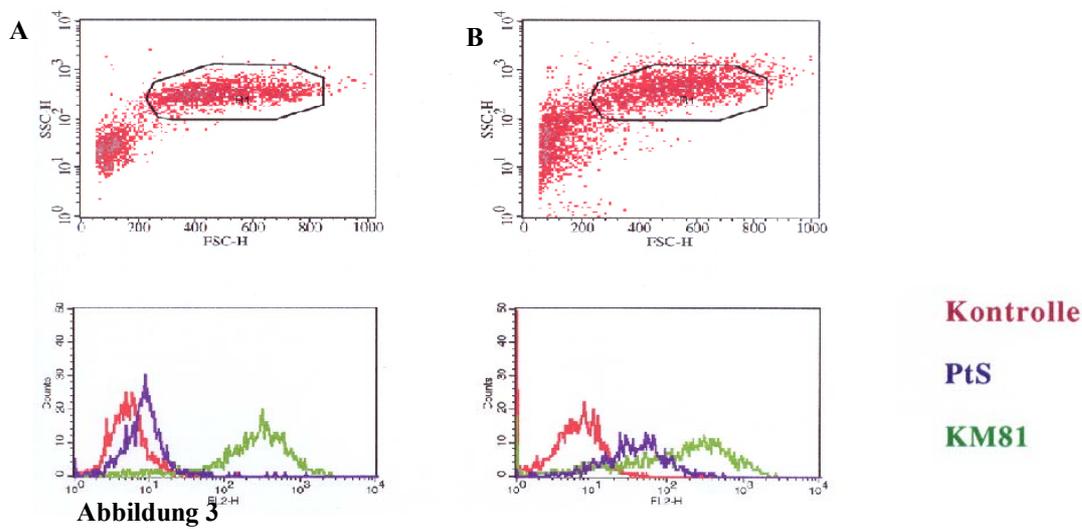
wie stark positiv sie sind. Eine zu 30% positive Zelllinie wäre ein Paradoxon, da es sich bei einer Linie in der Regel um einen Klon identischer Zellen handelt. Sie müssen also positiv für einen Marker sein oder negativ. Zur einfacheren Auswertung werden in jedem Fall einer durchflusszytometrischen Messung nur die % positiven Zellen angegeben. Wird eine Zelllinie mit 30% positiven Zellen für PtS und 70 % positiver Zellen für KM81 angezeigt, verbirgt sich hinter dieser Angabe ein großer Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität einer ansonsten zu 100 % von beiden mAk erkannten Zelllinie. In Fällen, in denen mit mehreren mAk ein vollständiger aber unterschiedlich starker „Schift“ auf der X-Achse erfolgt, wird die mittlere Fluoreszenzintensität als notwendige Zusatzinformation angegeben.

Entsprechend der Zielvorgabe meiner Dissertationsarbeit, der funktionellen Charakterisierung von CD44v3 auf hämatopoetischen Zellen, erfolgte nun eine detaillierte Erfassung des Expressionsprofils, der ein Screening muriner Zelllinien vorgeschaltet wurde.

### 3.1 Expressionsmuster von CD44v3 auf murinen Zelllinien

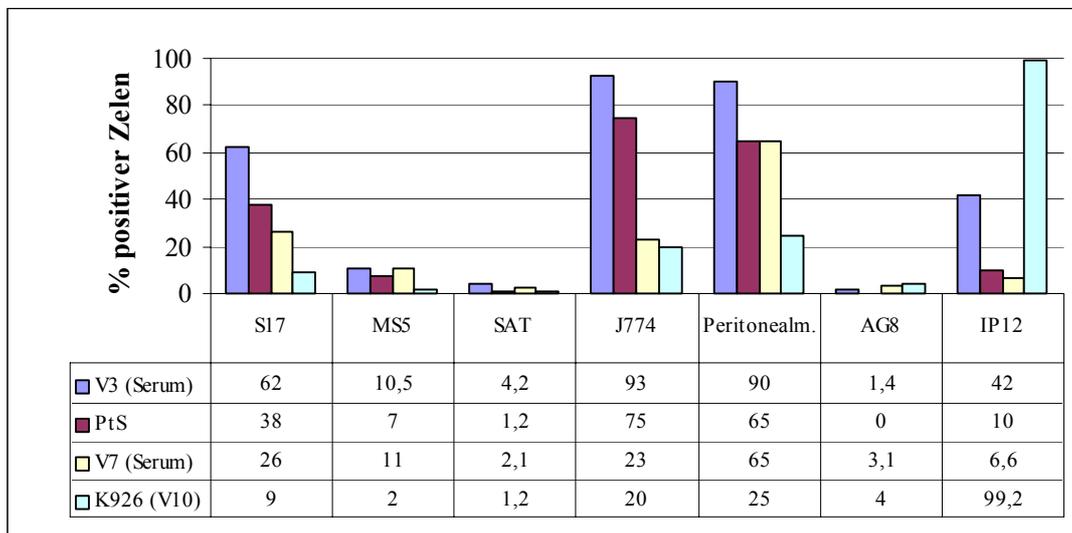
Wie in Abb.2 deutlich zu erkennen, markiert der mAk PtS nahezu 100 % der pMV7CD44v3 transfizierten Ag8 Zellen. KLN Zellen wurden jedoch nur zu 42 % von PtS markiert (Abb.3). Die Zelllinie KLN exprimiert CD44v1-10 und wird sowohl vom anti-V10 mAk K926, als auch von anti-CD44s-Antikörpern KM81 und IM-7 zu 100 % erkannt. CD44, insbesondere die Variante 3, unterliegt starken posttranslationalen Modifikationen. Schon die Tatsache, dass „nur“ 7 von 47 anti-V3-Peptid-Kulturüberständen ihr Epitop auch als Bestandteil des intakten Proteins auf lebenden Zellen zu erkennen vermochten, zeigt die Bedeutung von Konformation und Modifikation des Gesamtproteins für die Bindungseigenschaften des Antikörpers. Um diese Annahme zu unterstützen, wurde der Einfluss der N-Glycosilierung auf die Bindung von PtS untersucht. Tunicamycin ist ein hydrophobes Analogon des UDP-N-Acetylglucosamins, das die Addition von Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, also den ersten Schritt bei der Bildung eines Core-Oligosacharids, hemmt. Nach Tunicamycinbehandlung lassen sich daher keine N-glycosilierten Proteine mehr auf der Zelloberfläche nachweisen. Auf KLN-Zellen konnte die N-Glycosilierung erfolgreich mit 5µg Tunicamycin / ml blockiert werden. Der Effekt im Hinblick auf die Bindung von PtS war, wie in Abbildung 3 deutlich zu erkennen, recht drastisch. Während die Bindung des anti-CD44s-Antikörpers KM81 unbeeinflusst blieb, erhöhte sich die Bindung von PtS auf nahezu 100 %. Da die Zelllinie KLN CD44 nur als Variante CD44v1-10 exprimiert, spiegelt die im Vergleich zu KM81 etwa um eine 10er-Potenz

## Fluoreszenzmarkierung un behandelter (A) und in Gegenwart von 5 µg Tunicamycin gewachsener (B) CD44-1-10<sup>+</sup> KLN-Zellen



**Immunfluoreszenz:** Eine Kultur CD44-1-10<sup>+</sup> KLN Zellen wurden geteilt. Ein Teil der Zellen wurde über Nacht in RPMI 1640, 10 FKS in Gegenwart von 5µg Tunicamycin / ml kultiviert, die Kontrolle erhielt kein Tunicamycin. Gezeigt ist eine vergleichende Immunfluoreszenz von un behandelten (A) und Tunicamycin behandelten Zellen (B) mit den Antikörpern PtS und KM81

## Vergleich der Bindung anti-Varianten-spezifischer mAk und Kaninchenserum auf verschiedenen Zelllinien



**Abbildung 4**

**Immunfluoreszenz:** Jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit den angezeigten mAk / Seren gefolgt von PE-Markierten Zweitantikörpern gefärbt. Die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers (anti-Ratte bei PtS und K926) sowie die unspezifische Färbung durch das Serum eines unimmunisierten Tieres, gefolgt von anti-Kaninchen Ak wurde berücksichtigt

geringere mittlere Fluoreszenzintensität, eine geringere Affinität von PtS zu seinem Epitop, wider.

Ein immunisiertes Kaninchen erzeugt, selbst gegen ein relativ kleines Peptid, wie es für die CD44v3 Immunisierung eingesetzt wurde, eine Reihe unterschiedliche Epitope erkennender Antikörper. Während die Affinität eines mAk durch eine posttranslationale Veränderung „seines Epitopes“ stark beeinflusst werden kann, ist Veränderung „eines singulären Epitopes“ für die Affinität eines poly- oder auch nur oligoklonalen Serums nahezu ohne Belang. Abbildung 4 zeigt den Vergleich der Bindung des polyklonalen Serums und PtS auf verschiedenen murinen Zelltypen und Zelllinien. Die Unterschiede fielen, mit Ausnahme der Balb/c T-Zelllinie IP12-7, geringer aus als erwartet.

Die Zelllinien KLN und IP-12 scheinen damit im Hinblick auf die N-Glycosylierung des v3-Epitopes, oder in dessen unmittelbarer Nachbarschaft, eine Sonderstellung einzunehmen. Dass keiner der Antikörper bzw. Seren an die als Negativkontrolle mitgeführte, weil kein CD44 exprimierende Zelllinie SAT bindet, spricht für deren Spezifität.

Wesentlich für weiterführende Untersuchungen waren folgende Beobachtungen:

1. Die murine Knochenmarkstromalinie S17, die die Reifung lymphoider Progenitoren fördert, exprimiert CD44v3 deutlich stärker, als die Stromalinie MS5, welche die myeloide Progenitorenreifung unterstützt.
2. Die starke Bindung von PtS an die murine Makrophagenzelllinie J774 ebenso wie an von Balb/c Tieren gewonnenen Peritonealmakrophagen (Methoden, 1.6).
3. Im Hinblick auf die Bindung eines CD44v7-spezifischen polyklonalen Serums erscheint erwähnenswert, dass bei einem Bindungsmuster, das dem von v3 weitgehend entspricht, eine deutlich abgeschwächte Bindung erfolgt.

Das Bindungsmuster des monoklonalen CD44v10 Antikörpers K926 hingegen unterscheidet sich weitgehend. Eine hohe Bindung von anti-v10 wird von den getesteten Linien nur auf der T-Zelllinie IP12-7 beobachtet.

### 3.2 Expression von CD44v3 auf hämatopoetischen Progenitorzellen und reifen hämatopoetischen Zellen

Das Expressionsmuster von CD44v3 auf hämatopoetischen Zellen sollte näher charakterisiert werden. Als primäre Quelle für Vorläuferzellen und reife Zellen des murinen Systems, wurden Knochenmark- und Milzzellen Doppelfärbungen mit anti-CD44v3 und einem weiteren Antikörper, für jeweils charakteristische Oberflächenmarker wie z.B. CD4, CD8 und

Mac1 unterzogen. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer (FACScalibur; Becton Dickinson)

Die starke Bindung von PtS an die Zelllinie J774 und Peritonealmakrophagen wurde durch die 95%ige Markierung der 3%igen Fraktion Mac-1 positiver Zellen in der Milz (Monozyten/Makrophagen) bestätigt. Der Anteil von PtS erkannter T-Zellen schwankt für  $CD4^+$  T-Helferzellen ebenso wie für  $CD8^+$  zytotoxische-T-Zellen zwischen 20 und 25 %. Im Gegensatz zu der für PtS negativen Myelomzelllinie Ag8 sind murine B-Zellen zwischen 79 und 96 % positiv für PtS (Abb.5). Die Stimulation von T-Zellen durch das Mitogen Con A hatte keinen Einfluss auf die CD44v3 Expression. Durch die Stimulation von B-Zellen und Makrophagen mittels LPS stieg zwar mit dem Anteil an B-Zellen in der Kultur auch der Anteil  $CD44v3^+$  Zellen, die durchschnittliche Expression von CD44v3 auf jeder einzelnen Zelle (Meanfluoreszenz) blieb hingegen gleich.

Doppelfluoreszenzen murinen Knochenmarkes mit PtS und Oberflächenmarkern verschiedener Subpopulationen (Abb.6) ergaben folgendes Bild:

Unter den 40% der Knochenmarkzellen, die von PtS erkannt wurden, waren nahezu 100 % der Oberflächen-IgM positiven Zellen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um eingewanderte B-Zellen.  $Mac1^+$  /  $CD43^+$ ,  $33D1^+$  und  $CD45RO^+$  (B220) und damit die Makrophagen-, Dendriten- und B-Zell-Vorläufer waren ebenfalls zu 100% positiv.

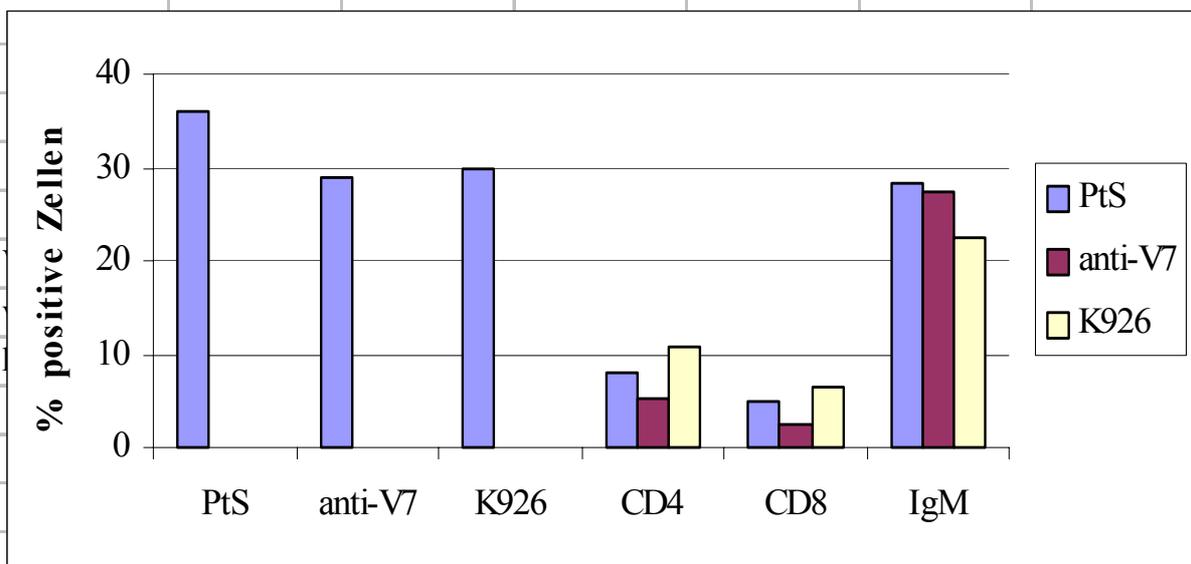
Weniger einheitlich war das Bild bei den Stroma-Zell-Markern. Während mit 5 % gesamtpositiven Zellen nahezu 100 % der  $CD34^+$  Zellen auch von PtS erkannt wurden, waren es nur 80 % der  $CD106^+$  (VCAM1) und sogar nur 50 % der  $CD31^+$  Zellen. Auffallend war, dass die insgesamt kleine Menge  $CD4^+$  (5 % der Gesamtzellpopulation) und  $CD8^+$  Zellen (3 % der Gesamtzellpopulation) ebenfalls zu 96 % bzw. 98 % von PtS markiert wurden.

Die Ergebnisse dieser ersten Expressionsanalyse warfen mehrere Fragen auf:

1. V3 scheint vornehmlich auf Zellen exprimiert zu werden, welche die Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen. Beeinflusst CD44v3 die Antigenpräsentation?
2. In welcher Weise beeinflusst CD44v3 die Hämatopoese im Knochenmark?
3. Lassen sich die  $CD44v3^+$  T-Zellen näher charakterisieren?

Doppelfluoreszenz frisch isolierter Milzzellen mit den varianten Antikörpern PtS (CD44v3), K926 (CD44v10) und einem anti-CD44v7-Kaninchenserum

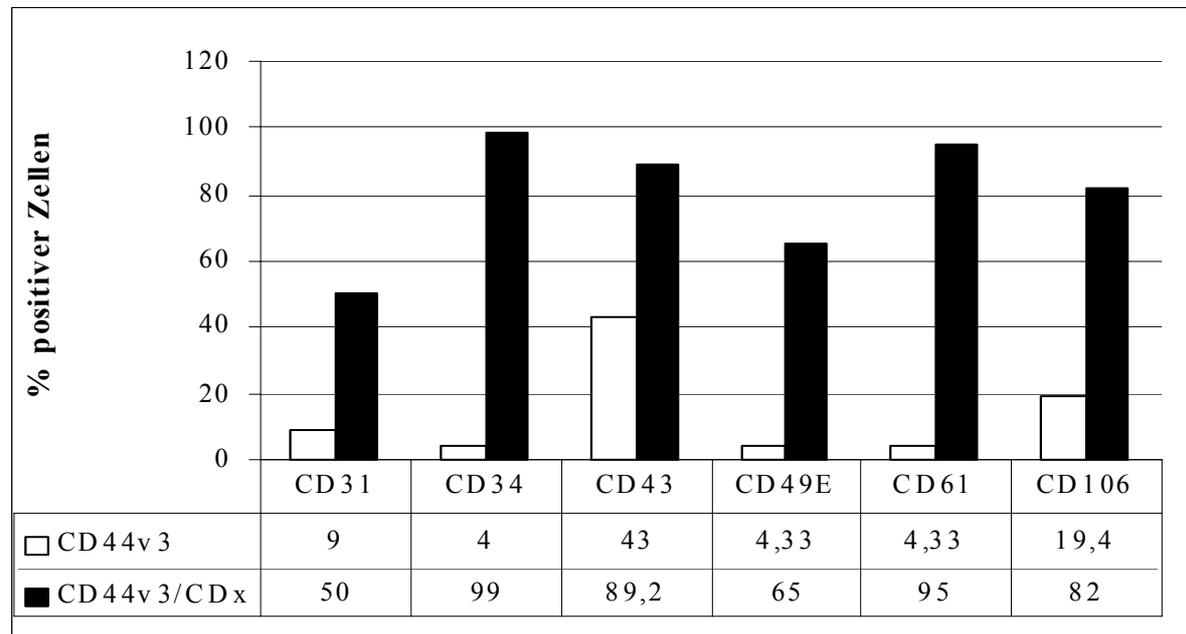
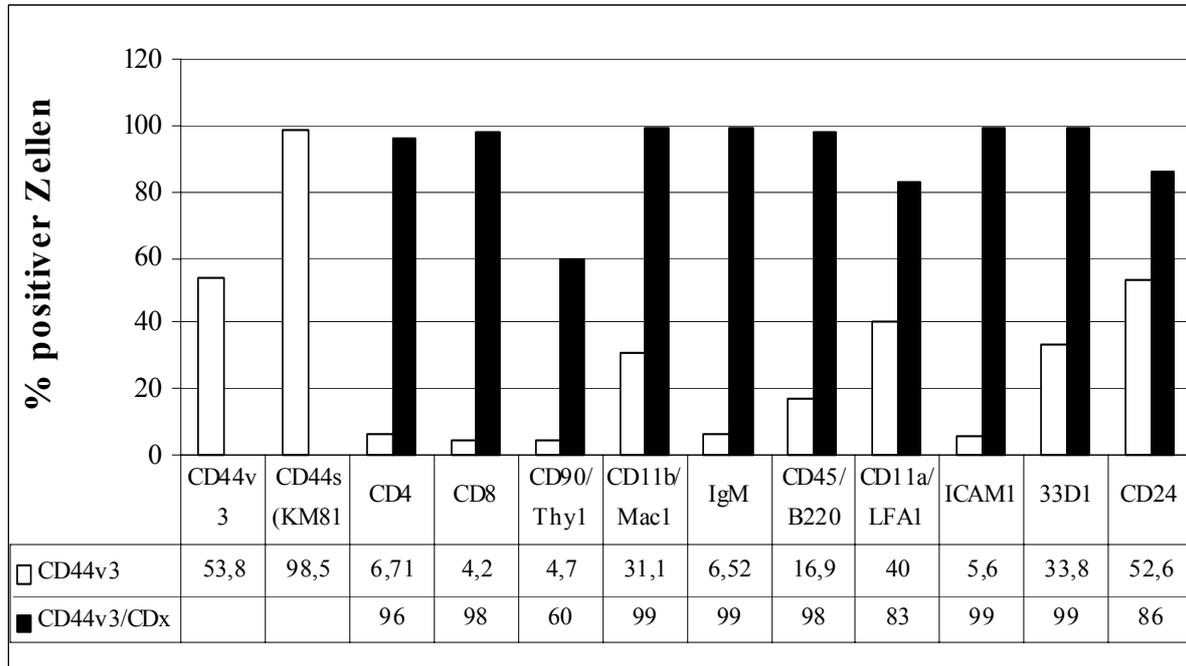
	PtS	anti-V7	K926	CD4	CD8	IgM
<b>PtS</b>	36	29	30	8,1	5	28,3
<b>anti-V7</b>				5,16	2,61	27,4
<b>K926</b>				10,7	6,5	22,6
<b>Anteil der Varianten + Zellen an der jeweiligen Lymphozytensubpopulation</b>						
<b>v3</b>				25	24,6	82,4
<b>v7</b>				16	13,5	81,6
<b>v10</b>				35	32	66



**Doppelfluoreszenz:** Frisch isolierte Milzzellen wurden mit den angezeigten Linienantikörpern gefolgt von PE-konjugiertem Zweitantikörper markiert. Für die Doppelfluoreszenz wurden biotinylierte PtS-mAk, K926-mAk gefolgt von PE-konjugiertem Streptavidin und direkt markierte (Oregon green) anti-CD44v7-Serum eingesetzt.

**Abbildung 5**

**Doppelfluoreszenz mit anti-CD44v3 und den angezeigten mAk auf frisch isolierten Knochenmarkzellen (Balb/c)**



Das Knochenmark einer 6-8 Wochen alten weiblichen Balb/c Maus wurde präpariert. Jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen / Probe wurden mit den jeweiligen Identifizierungsmarkern gefolgt von PE-markierten Zweitantikörpern gefärbt. Anschließend wurden dieselben Zellen mit biotinyliertem PtS gefolgt von Streptavidin-FITC gefärbt und im Durchflußzytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson) mit der Software Cellquest© analysiert.

**Abbildung 6**

### 3.3 Einfluss der mAk PtS und Km81 auf die Entwicklung von Langzeitknochenmarkkulturen.

In den 80er Jahren fanden die Wissenschaftler Whitlock und Witte auf der einen und Dexter auf der anderen Seite eine Möglichkeit, die Hämatopoese, wie sie normalerweise im Mark langer Röhrenknochen abläuft, *in vitro* nachzustellen. Sie fanden, dass sich in Kulturschalen aufgenommene Knochenmarkzellen ähnlich organisieren wie *in Vivo*. Die Stromazellen bilden eine dichte konfluente Schicht auf dem Flaschenboden. Dieser Vorgang nimmt einige Zeit in Anspruch, so dass ein Großteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen absterben, da sie Kontakt zur Stromazellschicht brauchen.

Dexter fand, dass Pferdeserum in Kombination mit Hydrocortison (hemmt die Entstehung von Lymphozyten) die Entwicklung myeloider Zellen wie Monozyten, Dendriten und Erythrozyten fördert während Whitlock und Witte durch den Zusatz von IL-7 die Hämatopoese von B-Lymphozyten unterstützen konnten. Wie bereits gezeigt (Abb4) bindet PtS sehr viel stärker an S17 Stromazellen, welche aus einer Kultur des Whitlock-Witte Typs stammen, als an MS5 Stromazellen, deren Ursprung eine Dexter Kultur ist. Durch die Addition von jeweils 10µg / ml der Antikörper PtS, KM81 und 3.9 (anti-Gallium) als Kontrollantikörper zu Kulturen des jeweiligen Typs, sollte der Einfluss von CD44s und CD44v3 auf die Entwicklung der Hämatopoese in Kultur untersucht werden.

Die Kulturen wurden wöchentlich durch den Ersatz von 50% des den jeweiligen mAk enthaltenden Mediums gefüttert. Zum ersten Mal nach Ablauf der 3. Woche und dann in wöchentlichem Abstand wurden nicht adhärente Zellen aus der Kultur entnommen und für die Durchflusszytometrie bzw. zur Bestimmung der Anzahl und des Verhältnisses verschiedener Vorläuferzellen (Methoden, 1.7.1) verwendet.

Während Dexter-Kulturen in ihrer Entwicklung erwartungsgemäß von PtS unbeeinflusst blieben, zeichnete sich in Whitlock-Kulturen ein deutlicher Effekt ab (Abb.7 und 8). Gezeigt sind die Ergebnisse nach 4 Wochen Kultur.

Ins Auge fällt ein 69%iger Anstieg der B-Zellvorläufer in Gegenwart von PtS gegenüber der Kontrolle. Dieser findet seine Entsprechung in dem verstärkten Auftreten B220<sup>+</sup> (CD45R0) und Scd1<sup>+</sup> (Stammzell-Antigen-1) Zellen, charakteristisch für frühe B-Zellvorläufer (pro-B-Zellen) (x). Zu erkennen war auch ein deutlicher Rückgang der Expression von CD54 (ICAM1) und CD102 (ICAM2), welche Liganden für das ebenfalls vermindert exprimierte CD11a (LFA-1) darstellen. Ein Grund für ein verstärktes Auftreten von Pro-B-Zellen könnte eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion sein, da IFN $\gamma$  B-Vorläuferzellen in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung arretiert, wodurch sie sich in Kultur akkumulieren würden. Weder die

Kreuzvernetzung von v3 auf frischen Knochenmarkzellen (Abb.12a) noch die von Zellen aus der Whitlockkultur, führten jedoch zu einem entsprechendem Anstieg der IFN $\gamma$ -Produktion.

**Einfluss der Antikörper KM81 (CD44s) und PtS (CD44v3) auf die Expression von Identifizierungsmarkern (Immunfluoreszenz A) und die Entwicklung von Vorläuferzellen (Koloniewachstum in semisolidem Agar B)**

**A**

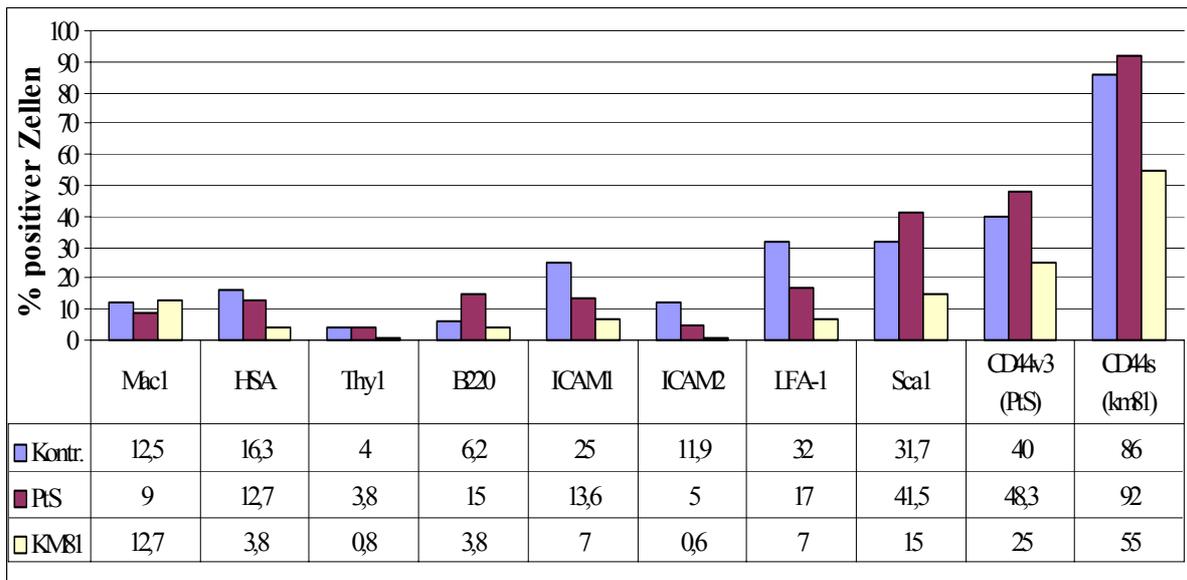
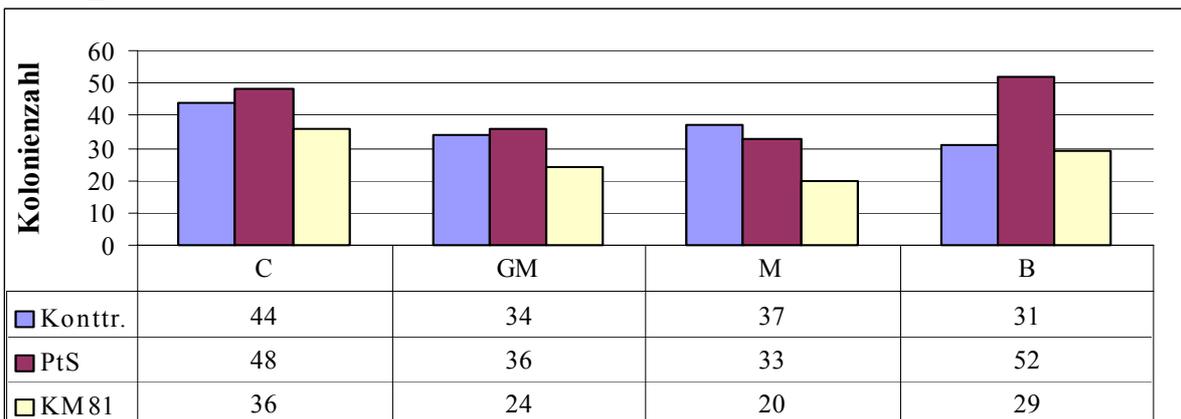


Abbildung 7

**B**



**Vorläufer der verschiedenen Zellpopulationen: C = pluripotent, GM = Granulozyten/Makrophagen, M = Makrophagen, B = B-Zellen**

Abbildung8

2 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen / ml wurden in Whitlock-Medium, supplementiert mit jeweils 10 $\mu$ g PtS, bzw KM81, aufgenommen. Alle 7 Tage wurde die Hälfte des Mediums ersetzt. Nach Ablauf von 4 Wochen wurde die nicht adhärenente Fraktion für Immunfluoreszenz und Vorläuferzelltest verwandt.

### 3.4 Generierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark als Modell für antigenpräsentierende Zellen

Km81 signifikant erhöht. Wir schließen daraus, Es wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Talmor (132) zur Erzeugung dendritischer Zellen (DC) aus murinem Knochenmark etabliert. Die Identität der so gewonnenen Zellen wurde auf verschiedene Weise überprüft.

#### 1. Morphologie:

Abbildung 9 zeigt auf beiden Fotos reife dendritische Zellen, die unter entsprechenden Kulturbedingungen über 12 Tage aus Knochenmark gewonnen wurden. Zu diesem Zeitpunkt treten Dendriten als große, flotierende Zellen mit charakteristischen langen oder „igelförmig angeordneten Pseudopodien auf. Die abgebildeten Zellen entsprechen dieser Beschreibung.

#### 2. Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen

Es ist beschrieben, dass nur unreife DC Zellen bis etwa zum 7 Tag ihrer Entwicklung *in vitro* in der Lage sind, antigene Fremdproteine aufzunehmen und in der Folge zu präsentieren. Werden die Zellen in FKS-haltigem Medium kultiviert, so sind sie die ganze Zeit über von einer großen Menge Fremdprotein umgeben und werden automatisch damit beladen. Werden diese Fremdproteine erfolgreich präsentiert (und zwar auf MHCI- und II-Molekülen, welche beide konstitutiv von DC's exprimiert werden) sollten sie in der Lage sein, autologe T-Zellen, die ebenfalls von Balb/c Tieren stammen, zu aktivieren. Die relative Reinheit über eine Nylonwattensäule aufgereinigter T-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft (Abb10).

Im Proliferationstest (Abb.11) bewies ein Anstieg der Ereignisse pro Minute (Epm) von 1200 bei unstimulierten T-Zellen auf 17 000 Epm durch DC stimulierten T-Zellen (Verhältnis DC / T-Zelle 1 : 50) die Funktionalität der dendritischen Zellen.

In diesem ersten Ansatz wurde eine mögliche Beteiligung von CD44v3 an der T-Zellaktivierung und Antigenpräsentation durch Zugabe von PtS überprüft. Es konnte weder eine signifikante Reduktion noch eine signifikante Stimulation der Proliferationsrate beobachtet werden. Im Gegensatz zu PtS war die Proliferationsrate in Gegenwart des CD44s spezifischen mAk dass eine Blockade einer potentiellen CD44v3-Liganden-Interaktion keinen Einfluss auf die Aktivierung der T-Zellen nimmt.

Aus murinem Knochenmark (Balb/c) generierte dendritische Zellen Tag 12

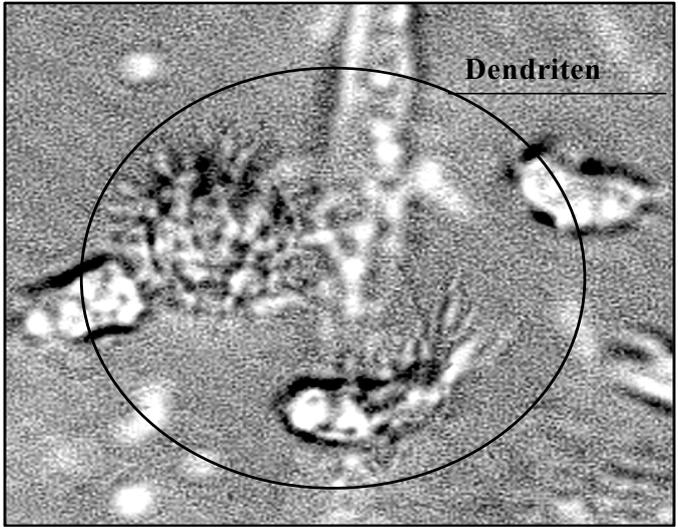
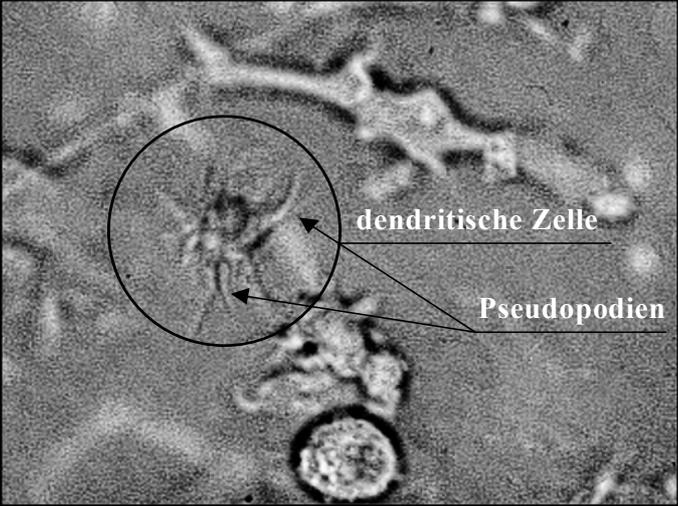
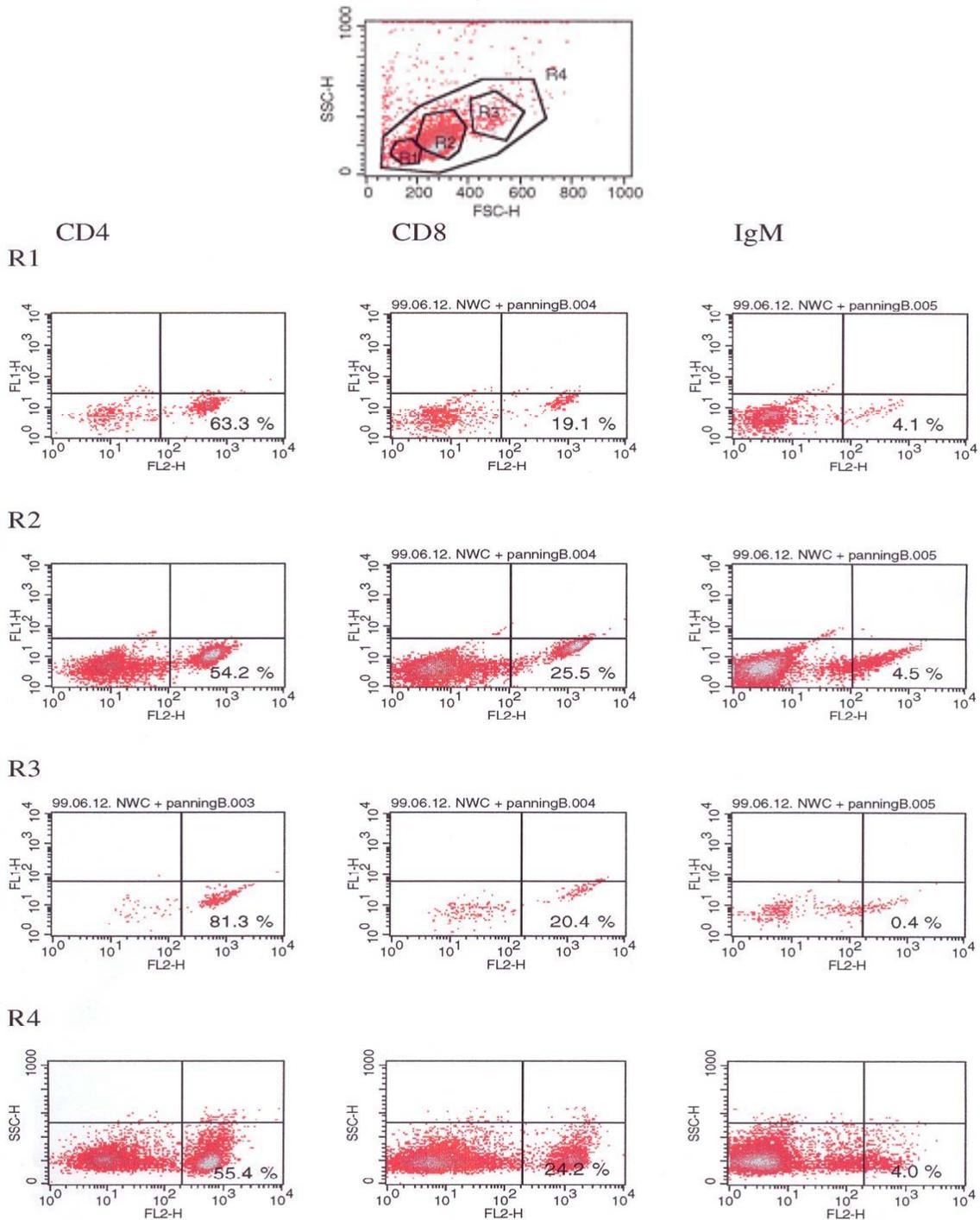


Abbildung 9

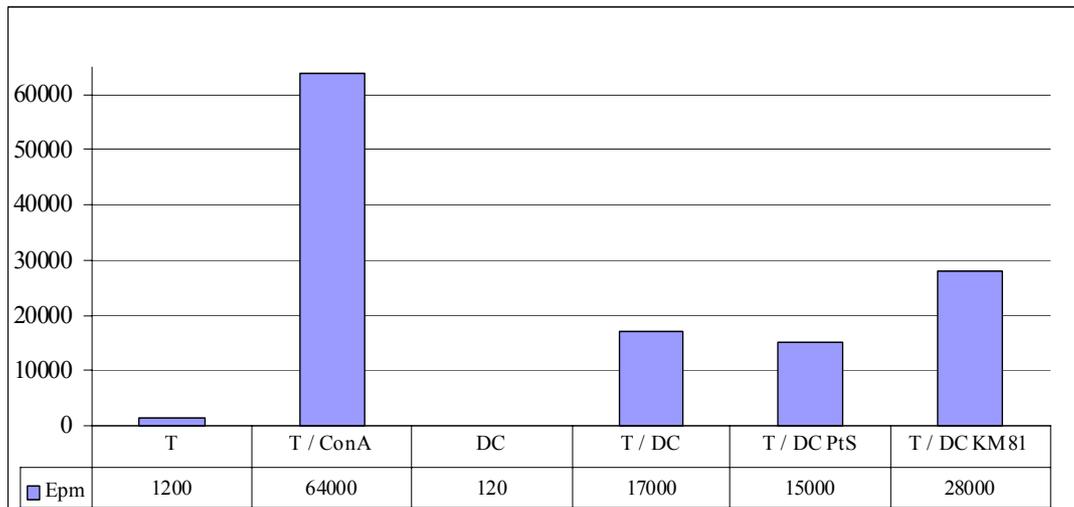
## Erfolgskontrolle der T-Zellanreicherung aus muriner Milz über Nylonwolle



**Immunfluoreszenz:** Die MNZ der Milzen zweier Balb/c Mäuse wurden vereinzelt und in 5ml RPMI 1640, 10 % FKS aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine bis zur 25 ml-Marke mit RPMI 1640 äquilibrierter Nylonwolle gefüllte 50 ml-Spritze aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde mit 50 ml RPMI1640 eluiert. Da FC-Rezeptor tragende Zellen an die Nylonwolle adhären, enthält das Eluat eine Fraktion aus T-Zellen und NK-Zellen. 80 % T-Zellen an der Gesamtzellpopulation und die Abwesenheit großer granulierter Zellen (Monozyten) beweisen die erfolgreiche Anreicherung.

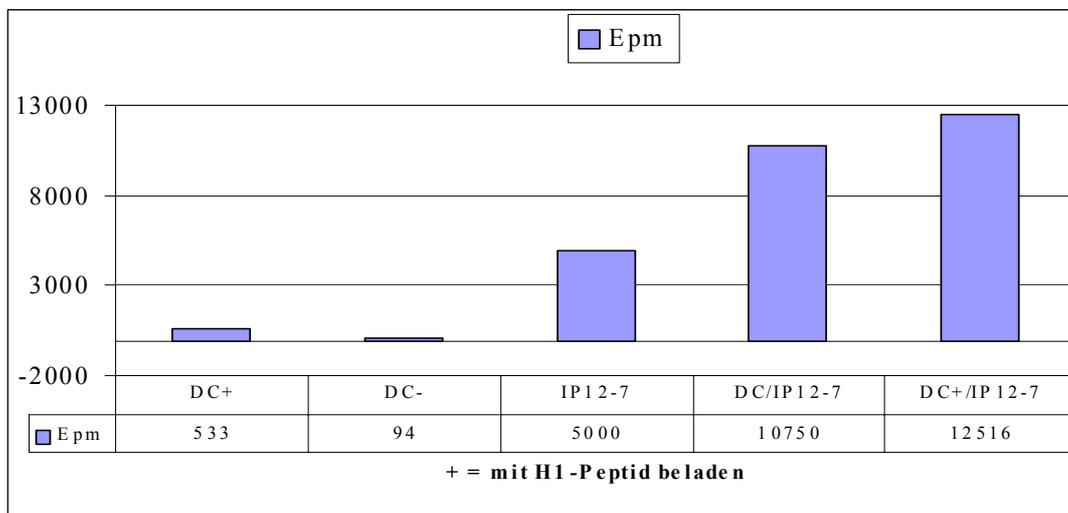
**Abbildung 10**

### Einfluss der mAk Pts und KM81 auf die Proliferation durch dendritische Zellen stimulierter T-Zellen



**Abbildung 11**

### Proliferationsmessung von HA1-Influenza-Peptid restringierten IP12-7 Zellen nach Stimulation mit unbeladenen und H1-Peptid beladenen dendritischen Zellen



**Abbildung 12**

**Proliferationstest:** Aus dem Knochenmark von Balb/c Mäusen generierte dendritische Zellen (Methoden, ) wurden mit 50 gray bestrahlt und im Verhältnis 1:50 mit Nylonwolle-angereicherten T-Zellen oder IP12-7-T-Zellen für drei Tage inkubiert. Am Morgen des dritten Tages wurde für 8h  $74 \times 10^3$  Bq  $^3\text{THdR}$  zu den Proben gegeben und der Einbau anschließend im Scintillationszähler gemessen. **H1 beladene Zellen** wurden im unreifen Zustand, von Tag 6 ihrer Entwicklung an, durch die Zugabe von  $10 \mu\text{g}$  Peptid zum Kulturmedium beladen. Der FKS-Anteil am Medium wurde zu diesem Zwecke von Tag 5 – 8 von 10 auf 5, 2,5 und schließlich 0 % verringert **PtS**, **KM81** Zusatz von jeweils  $10 \mu\text{g}$  / ml des angezeigten mAk zum Medium. Zur Stimulation eingesetzt wurden 9 Tage alte Dendriten.

Nachdem die DC ihre Fähigkeit zur Stimulation von frisch isolierten Balb/c T-Zellen unter Beweis gestellt hatten, sollte der Versuch mit der ebenfalls von einer Balb/c Maus stammenden T-Zelllinie IP12-7 wiederholt werden.

IP12-7 ist auf ein Peptid der HA1 Domäne des humanen Influenza-Virus (H1) restringiert.

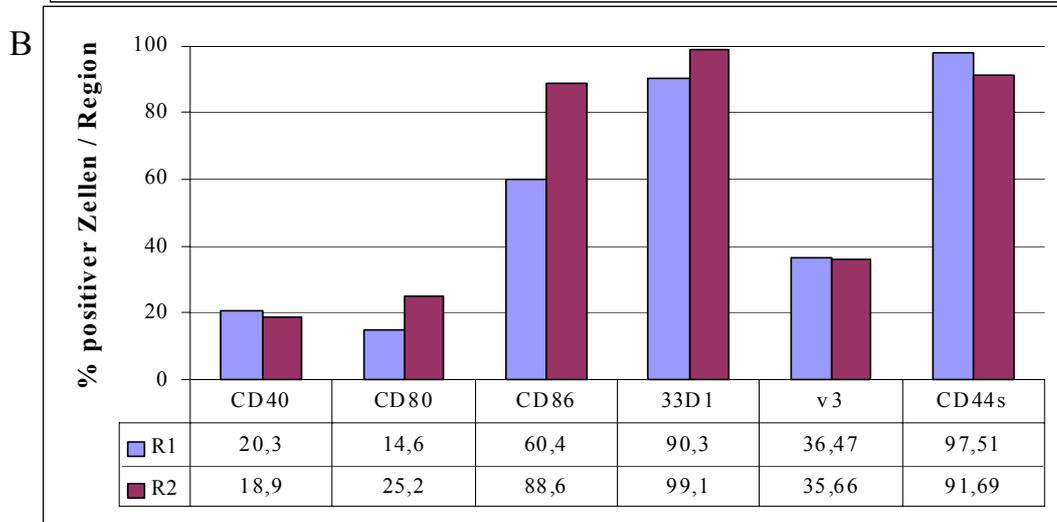
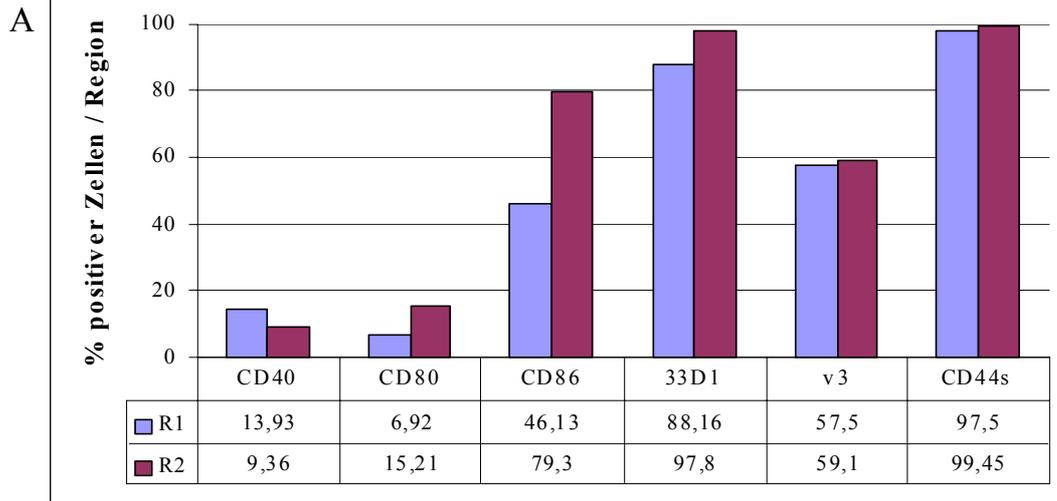
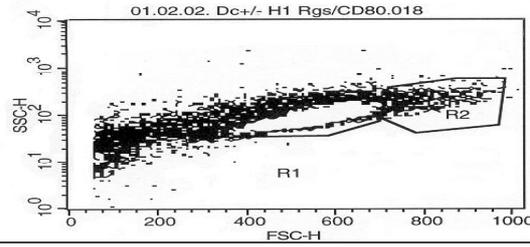
Abbildung 12 zeigt einen Proliferationstest, in welchem mit dem H1 Peptid beladene (Methoden, 1.8.1) und unbeladene DC im Verhältnis DC / T-Zellen 1 : 50 untransfizierte und CD44v3 transfizierte IP12-7 –T-Zellen stimulierten. Die erfolgreiche Beladung der DC zeigt sich an der in beiden Fällen erhöhten Epm. Die gesamt höheren Werte für die Transfektanten sind mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass sie direkt aus G418 haltigem Selektionsmedium stammen. Untransfizierte IP12-7 zeigen einen 16,4 %igen Anstieg der Proliferation als Reaktion auf beladene DC. v3-transfizierte Zellen reagieren unter gleichen Bedingungen mit einer 59 %igen Erhöhung. Die verstärkte v3-Expression führt also scheinbar zu einer effizienteren Antigen Präsentation durch die Dendriten oder eine effizientere Antigenerkennung durch die T-Zellen.

### 3. Expression von Identifizierungsmarkern

Der Vergleich unbeladener und beladener DC bezogen auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker zeigt neben einem Anstieg kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 einen Rückgang der CD44v3 Expression um mehr als 35 %. Die Expression des Identifizierungsmarkers für murine dendritische Zellen 33D1 sowie von CD44s (KM81) blieb hingegen unbeeinflusst (Abb. 13). Um die Bindung an einen potentiellen oberflächenständigen Liganden zu simulieren, wurden sowohl Dendriten (Tag 9) als auch frisch isolierte Knochenmarkzellen entsprechend Tag 0 der Reifung ebenso wie die zu stimulierende Milzzellpopulation mit anti-CD44v3 und einem anti-Ratten-Zweitantikörper kreuzvernetzt. (Abb.14a / b).

Auffällig war der zu verzeichnende Anstieg von CD44v3 nach Kreuzvernetzung mittels anti-CD44s oder anti-CD44v3. Hingegen wurde die LFA-1-Expression durch die Kreuzvernetzung mittels PtS, wie schon im Knochenmark gezeigt, stark verringert. Dieser Effekt wurde ausschließlich mit anti-CD44v3 beobachtet, während die Kreuzvernetzung mit KM81 zu einem moderaten Anstieg der LFA-1 Expression führte (Abbildung 14 b). Wesentlich ist der Befund, dass die über eine „Ligandenbindung“ von CD44v3 induzierte Expression von CD44v3 mit einem deutlichen Anstieg der Expression von IFN $\gamma$  und IL-12 einherging. Die Expression von IL-10 hingegen war deutlich reduziert. Beide Effekte waren ausschließlich auf Dendriten zu beobachten.

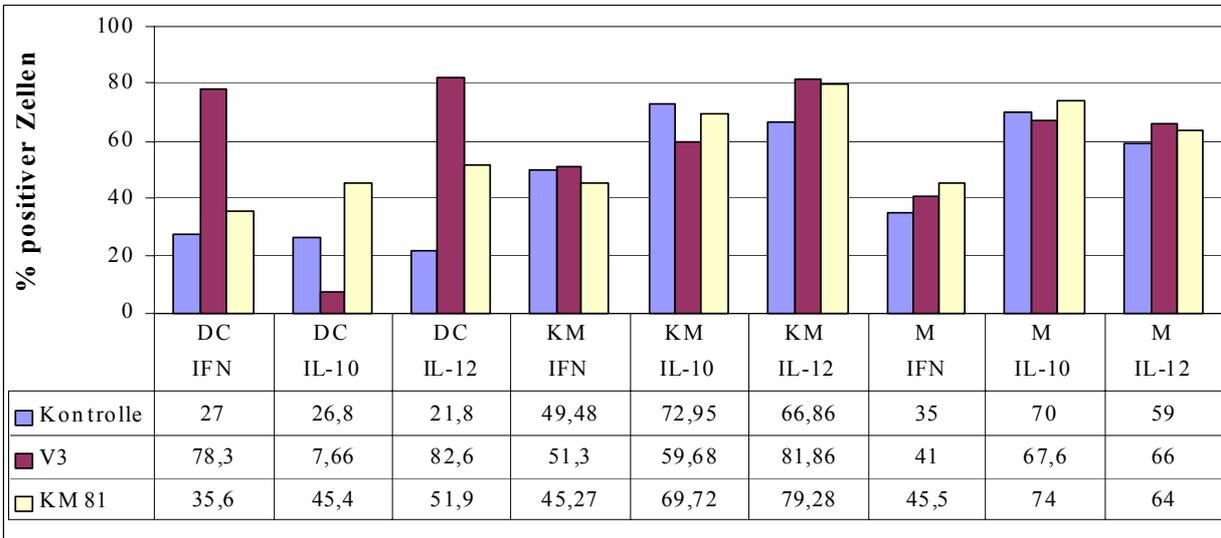
**Fluoreszenzmarkierung unbeladener (A) und beladener (H1) (B) aus murinem Knochenmark (Balb/c) generierter Dendriten**



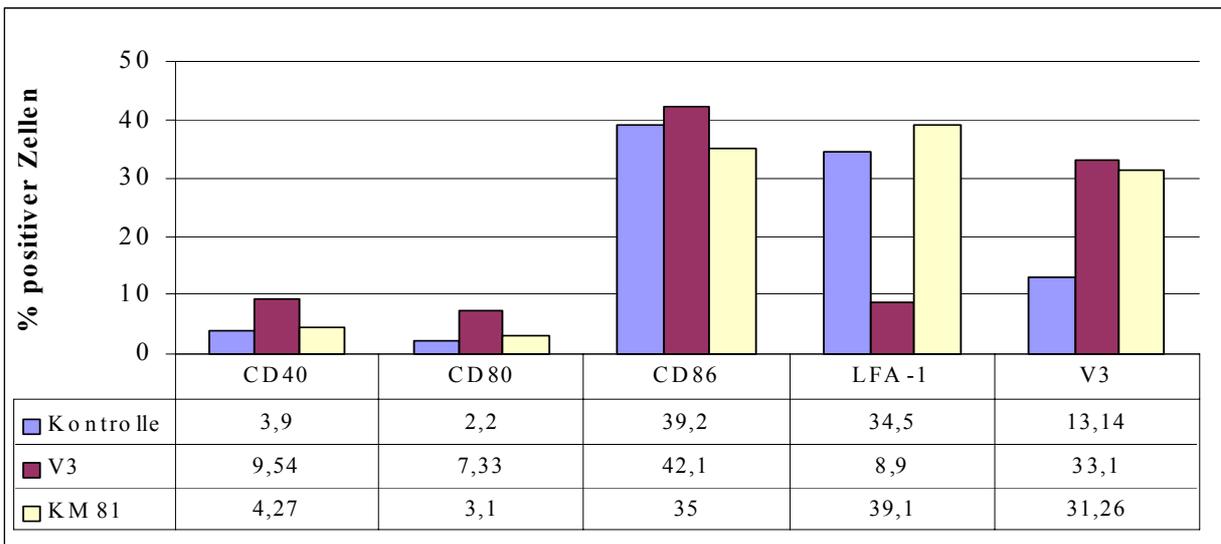
**Immunfluoreszenz:** Dendritische Zellen wurden wie beschrieben (Methoden, 1.8) aus dem Mark von Femur und Tibia 5-6 Wochen alter Balb/c Mäuse hergestellt. Am 6. Tag der Kultur wurden die Zellen geteilt. Ein Teil wurde durch Zusatz von 10µg / H1-Peptid zum Kulturmedium über 3 Tage beladen, der andere in normalem DC-Medium (s.Methoden, 1.8) weiterkultiviert. Am neunten Tag ihrer Entwicklung wurden die Dendriten beider Kulturen mit den angezeigten mAk gefärbt ( $1 \times 10^6$  / Probe) und die durchflußzytometrische Messung mit der Software Cellquest ausgewertet.

**Abbildung 13**

**Einfluss der Kreuzvernetzung durch KM81 und PtS auf die Zytokinproduktion muriner Dendriten (DC) Knochenmarkzellen (KM) und Milzzellen (M) (A) und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Dendriten (B)**



**Abbildung 14 A**



**Kreuzvernetzung:** Frisch isolierte Knochenmark- und Milzzellen sowie neun Tage alte aus murinem Knochenmark generierte dendritische Zellen wurden für 30 min ( RT, RPMI 1640 + 10% FKS, ) mit 40 µg /ml der Antikörper PtS oder KM81 inkubiert. Nicht gebundener mAk wurde durch zweimaliges Waschen mit RPMI 1640 entfernt. Die Zellen wurden über Nacht mit 10µg / ml anti-Ratten-Ak kultiviert. Mit den kultivierten Zellen wurde eine intra- (Zytokinproduktion ) und eine extrazelluläre Immunfluoreszenz (Oberflächenmarker) dendritischer Zellen durchgeführt.

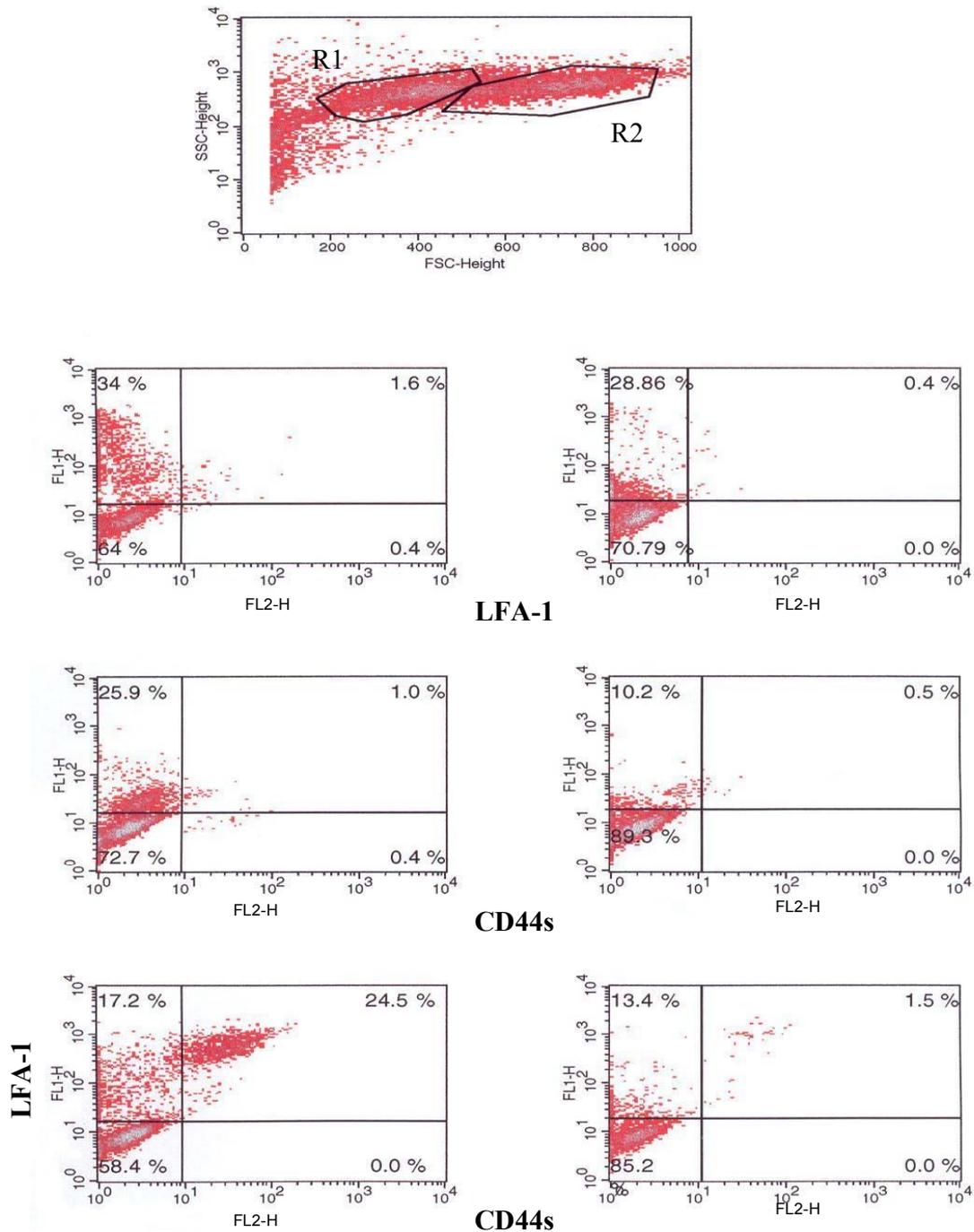
**Abbildung 14 A**

### 3.5 Einfluss von CD44v3 auf die Regulation der LFA-1 Expression

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass CD44v3 hauptsächlich auf Antigen-präsentierenden Zellen und Stromazellen aus Kulturen lymphoider Progenitorzellen exprimiert wird. Deswegen werde ich mich in der Folge vornehmlich mit den hämatopoetischen Kompartimenten befassen. Einer der auffälligen Befunde, die sowohl im Kontext der Antigenpräsentation als auch der B-Zellreifung beobachtet wurden, war die Assoziation zwischen Modulationen der CD44v3 und LFA-1 Expression. Um zu überprüfen, ob ein direkter Bezug zwischen der Expression dieser beiden Moleküle besteht, wurde ein nicht-hämatopoetisches Modell gewählt, das sich durch die fehlende Expression sowohl von CD44 als auch LFA-1 auszeichnet. Die Zelllinie Stockholm Adenokarzinom-Tumor SAT ist eine der wenigen zur Verfügung stehenden CD44 negativen Zelllinien. SAT-Zellen wurden mit dem Vektor pMV7 CD44v3 transfiziert. Nach Transfektion und Selektion in G418-haltigen Medium wurde die Bulkkultur auf die Expression von CD44v3 überprüft. Die simultane Untersuchung der Expression von LFA-1 ergab, dass in der Tat CD44v3 positive Zellen LFA-1 exprimieren und dass die Expression auf CD44v3-positive Zellen beschränkt bleibt (Abb.15). SAT Zellen wachsen in Form einer adhärenen Monolayer, an der lose einzelne kreisrunde Zellen adhären. Ein weiterer großer Teil der Zellen flotierte in unterschiedlich großen Verbänden im Medium. In der Analyse der durchflusszytometrischen Messung können die nicht adhärenen Zellen als 2 distinkte Populationen aufgeschlossen werden.

Abbildung 16 zeigt, dass speziell die kleinere Population (R1) der nichtadhärenen Zellen LFA-1 exprimierten. Zur Kontrolle der möglichen Spezifität für CD44v3 wurden SAT-Transfektanten eingesetzt, die mit der Standardform von CD44, CD44v6 und CD44v7 transfiziert waren. Diese wurden freundlicherweise von Herrn Dirk-Steffen Schmidt zur Verfügung gestellt. Auf Abbildung 17 ist eine durchflusszytometrische Messung der Varianten-Expression aller Transfektanten im Vergleich zu untransfizierten Zellen dargestellt. Die Restriktion der CD44-Expression auf die Fraktion kleinerer nicht adhärenen Zellen ist nur bei den CD44v3 Transfektanten festzustellen. Eine Immunfluoreszenz aller Transfektanten mit dem anti-LFA-1-mAk M17 und KM81 (Abb.18) zeigt, dass die Induktion der LFA-1 Expression nicht auf CD44v3 beschränkt ist, sondern auch nach Transfektion mit CD44v6 und CD44v7 beobachtet werden kann. Die Expression mit CD44s führt zu einer nur sehr geringen LFA-1 Expression. Der Anteil LFA1 positiver Zellen ist unabhängig von der Effizienz der Transfektion und liegt bei allen drei Varianten-Transfektanten SATv3, SATv6 und SATv7 Zellen mit 23 %, 21 % und 21 % im gleichen Bereich.

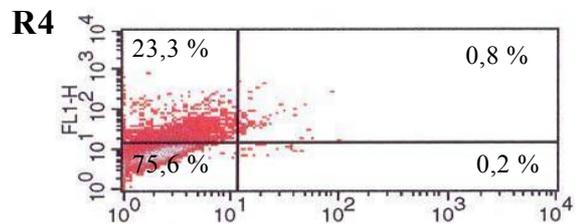
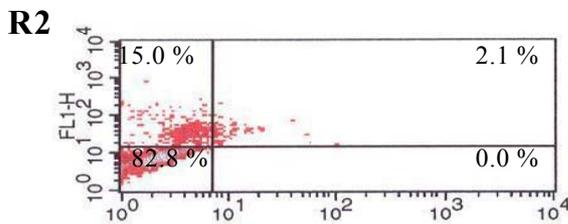
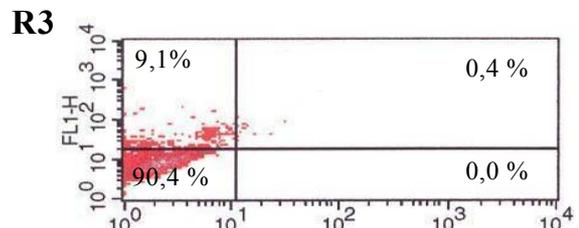
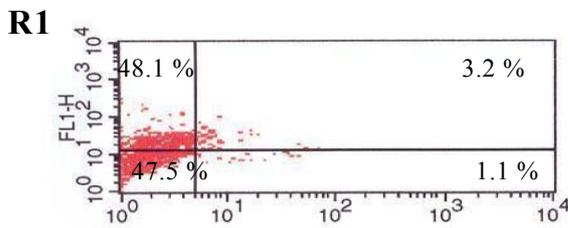
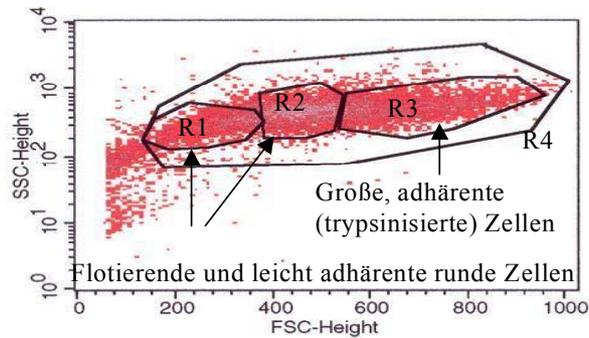
Expression von CD44s und LFA1  
auf CD44v3 transfizierten SAT Zellen



Mit CD44 v3 transfizierte SAT-Zellen wurden, der Vergleichbarkeit wegen, mit direktmarkiertem (Oregon Greene) anti-LFA-1 und anti-CD44s (KM81) Antikörpern markiert. Für die Doppelfluoreszenz wurde CD44s ebenfalls mit direktmarkiertem KM81 (Oregon Greene), LFA-1 jedoch mit anti-LFA-1 mAκ gefolgt von PE-konjugiertem Zweitantikörper markiert.

Abbildung 15

## LFA-1 Expression auf CD44v3 transfizierten SAT-Zellen



**Immunfluoreszenzanalyse:** Gezeigt ist eine Immunfluoreszenz CD44v3 transfizierter SAT-Zellen. Der nicht adhärente Teil der Kultur wurde dekantiert und nach der Trypsinisierung des adhärenen Teils mit demselben vereinigt. Die Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten anti-LFA1 mAk gefärbt und mit der Software Cellquest<sup>®</sup> analysiert. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme der Expression von LFA-1 auf größeren im Vorwärtsscatter weiter rechts liegenden Zellen, welche die adhärente Fraktion darstellen. Die Region 4 zeigt die Expression von LFA-1 bezogen auf die Gesamtzellpopulation

Abbildung 16

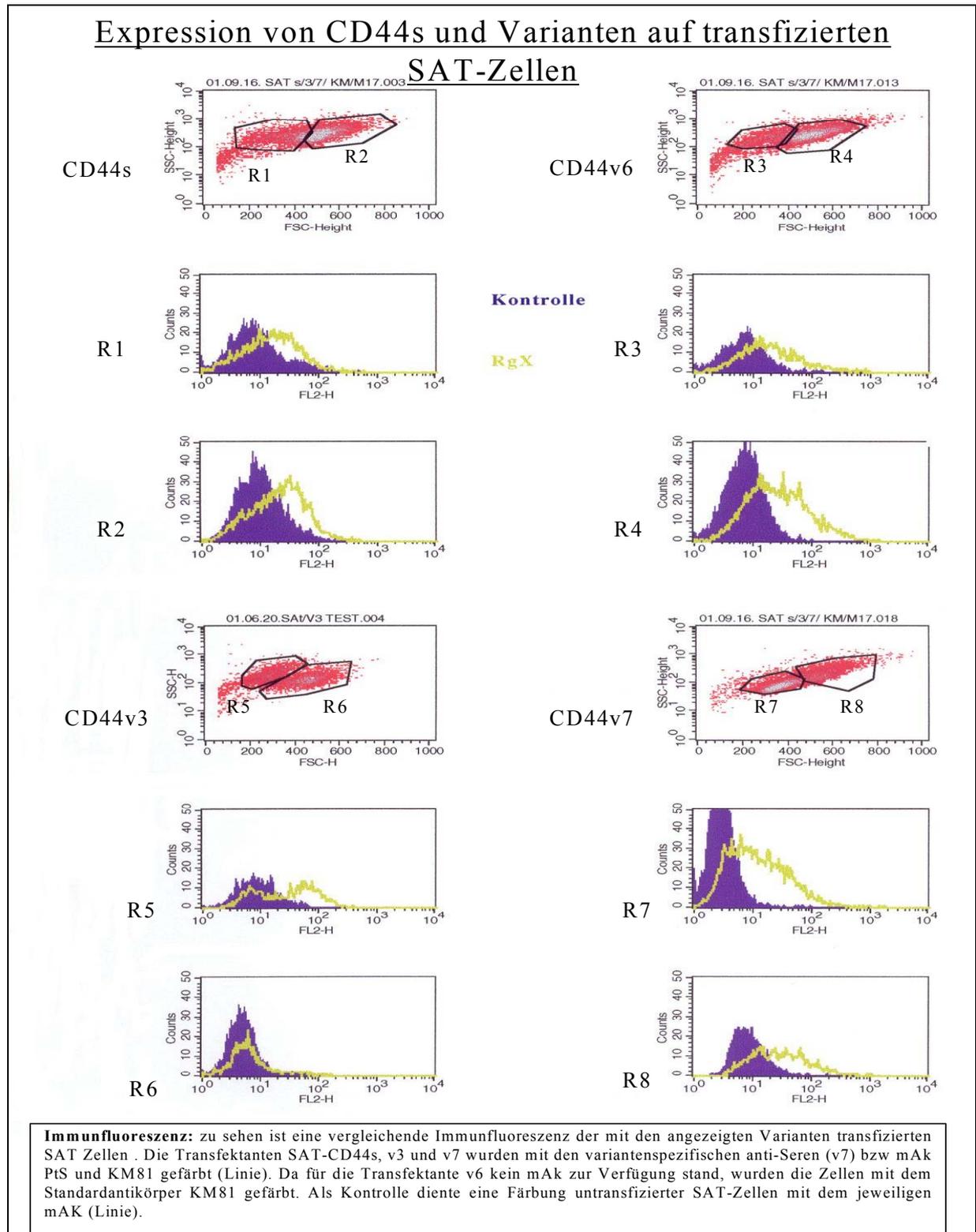


Abbildung 17

Immunfluoreszenz (A) und Immunpräzipitation (B) CD44s und Varianten transfizierter SAT-Zellen

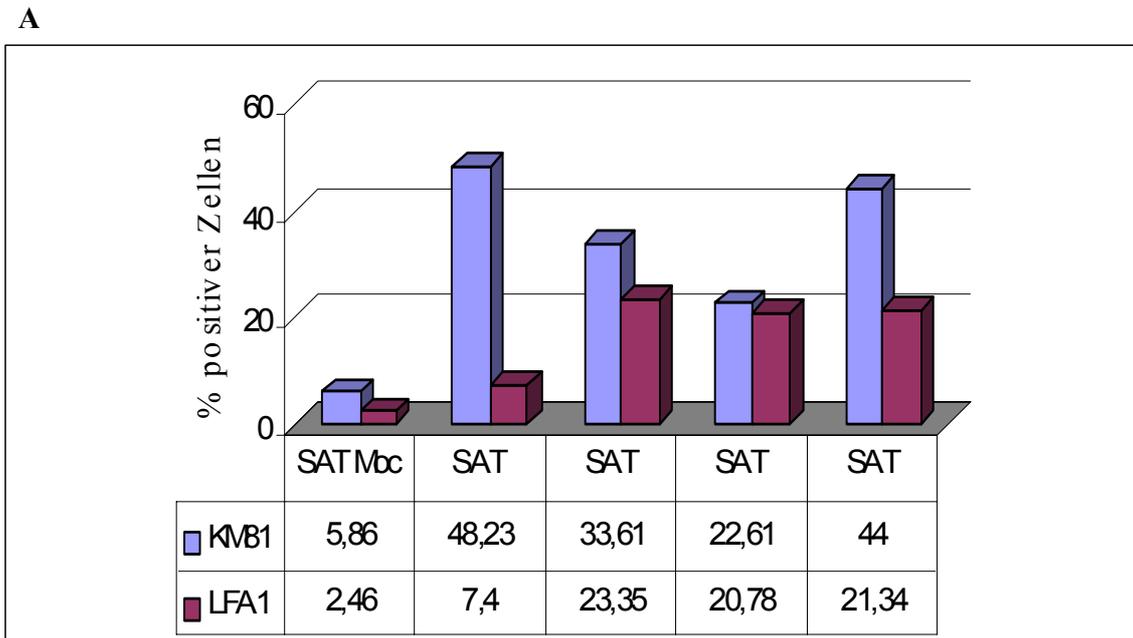
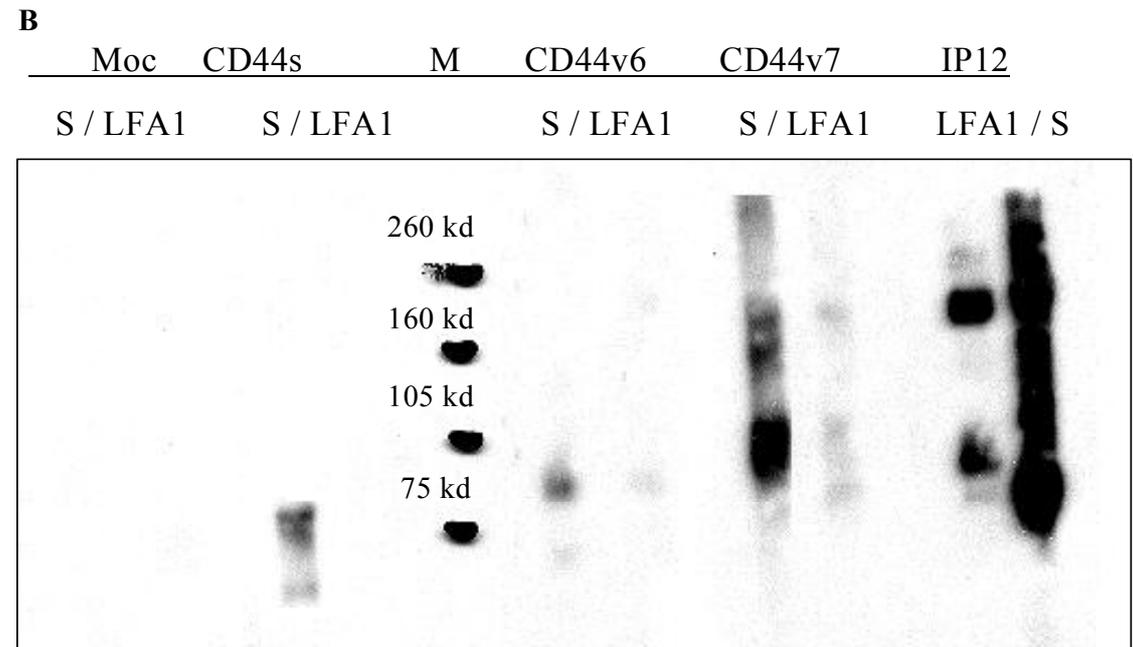


Abbildung 18



**Immunfluoreszenz :** Abbildung 18A zeigt die Ergebnisse der Markierung verschieden transfizierter SAT-Zellen mit anti-LFA-1 und KM81. Abbildung 18B zeigt eine **Immunpräzipitation** von LFA-1 und CD44s mit der Membranfraktion der mit dem leeren Vektor pHT transfizierten Moc-Transfektanten und mit CD44s oder varianten-CD44-Isoformen transfizierten SAT-Zellen. Die biotinylierten, präzipitierten Proteine wurden mittels eines 8 %igen SDS-Gels ausgetrennt und auf eine pvdf-Membran transferiert. Die Membran wurden mit Streptavidin-POD und ECL-Reagenz gefärbt.

Abbildung 19

Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen durch G418 wirkt sich eher auf die sich teilenden nicht adhärennten Zellen, als auf die langsamer wachsenden adhärennten Zellen aus.

Man könnte daher annehmen, dass erfolgreich transfizierte Zellen präferentiell in der nicht-adhärenen Fraktion angereichert sind. Dem widerspricht die Beobachtung, dass CD44v6 transfizierte Zellen gleichermaßen in der adhärenen und nicht-adhärenen Population gefunden werden. Die Möglichkeit, dass CD44v3 und CD44v7 mit der Adhärenz von SAT-Zellen an Plastik interferieren, bietet einen alternativen Erklärungsansatz.

Die Expression von LFA-1 auf SAT-Zellen schien ungewöhnlich, da LFA-1 bisher nur auf Lymphozyten beschrieben wurde. Um die Spezifität des verwendeten Antikörpers zu bestätigen, wurde daher eine Immunpräzipitation der Membranfraktionen untransfizierter SAT-Zellen, mit leerem Vector transfizierten s.g. Moc-Transfektanten, sowie mit CD44s, CD44v6 und CD44v7 cDNS transfizierten SAT Zellen durchgeführt. Die Abbildung 19 zeigt eine erfolgreiche Präzipitation von LFA-1 mit CD44v6 und v7 Transfektanten.

Mit Moc oder CD44s transfizierten Zellen ließ sich LFA-1 hingegen nicht präzipitieren.

Als Kontrolle dienen stark CD44s, CD44v10 und LFA-1 positive IP12-7 Zellen. LFA-1 ist ein Dimer aus CD11a ( $\alpha$ -L Integrin von 180 kd) und CD18 ( $\beta$ -2 Integrin von ca. 85 kd). Der verwendete mAk M17.51 ist gegen die  $\alpha$ -L-Untereinheit gerichtet. Nach der Auftrennung im SDS-Gel sind beide Proteine getrennt voneinander gut zu erkennen.

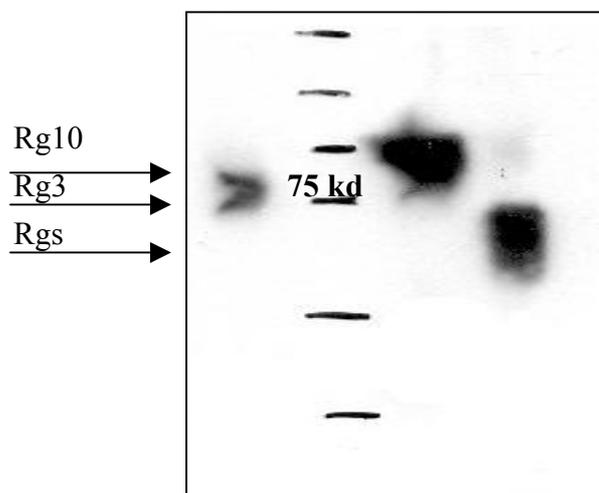
#### 4.1 Erstellung, Reinigung und Kontrolle der Funktionalität eines CD44v3-Rezeptorglobulins

Für die Suche nach einem variantenspezifischen Liganden für die Variante drei wurde der extrazelluläre Anteil des Konstruktes CD44v3 aus dem schon vorgestellten Vektor pT7T3 in den eukariotischen Expressionsvektor pHT umklontiert. Die Klonierung erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen SacI und HindII beider Vektoren und die anschließende Ligation des CD44v3 Fragmentes aus pT7T3 mit dem Vektor pHT (Traunecker et. al). Der freundlicherweise von Frau Dr. Ulla Günthert (Basel Institut für Immunologie) zur Verfügung gestellte Vektor kodiert für die  $\kappa$ -leichte Kette murinen IgG's. Das entstehende Fusionsprotein aus dem extrazellulären Bereich von CD44v3 und der  $\kappa$ -leichte Kette wird von transfizierten Zellen sezerniert und kann mit anti-v3, anti-CD44s oder anti- $\kappa$  mAk detektiert werden. Ag8 Zellen wurden mit dem Konstrukt transfiziert und anschließend selektioniert und kloniert. Als Selektionsmarker enthält pHT das aus E.coli stammende Gen Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (gpt). Das zur Selektion verwendete Medium enthält Mycophenolsäure und Xanthin. Mycophenolsäure ist ein Inhibitor der IMP-Dehydrogenase und verhindert die Umsetzung von Inosinat zu Xantalat. Hierdurch wird die Biosynthese des

Nukleotids dGTP verhindert. Gpt-transfizierte Zellen können jedoch angebotenes Xanthin verwerten und dGTP synthetisieren. Als weitere Fusionsproteine fanden die von Herrn Dr. Volker Zawadski hergestellten Fusionsproteine CD44s- $\kappa$ -leichte Kette und CD44v10- $\kappa$ -leichte Kette sowie das von Herrn Dirk-Steffen Schmidt zur Verfügung gestellte CD44v7- $\kappa$ -leichte-Kette Verwendung. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Fusionsproteine als Rezeptorglobulin-CD44s (Rgs), Rezeptor-globulin-CD44v3 (Rg3), Rezeptorglobulin-CD44v7 (Rg7) und Rezeptorglobulin-CD44v10 (Rg10) bezeichnet. Da ich für Immunfluoreszenzuntersuchungen die Rezeptorglobuline in biotinylierter Form benötigte, war es erforderlich, die Rg's aus den Zellkulturüberständen selektiv und effizient aufzureinigen. Die Aufreinigung mittels eines an CnBr-Sepharose gekoppelten anti-Standard Antikörpers (IM-7) schlug trotz der Wahl verschiedener Kopplungs- und Elutionsbedingungen fehl. Mit dem gegen die  $\kappa$ -leichte Kette gerichteten mAk 187.1 an CnBr-Sepharose oder auch kovalent an Protein-G gekoppelt gelang eine effiziente Aufreinigung der Rezeptorglobuline.

Im Folgenden sind die Elutionsprofile (benutzt wurde eine Pharmacia FPLC-Einheit), Coomassie gefärbte Proteingele zum Nachweis der relativen Reinheit und KM81-gefärbte Westernblots zur spezifischen Identifikation dargestellt (Abbildungen 20,21 und 22).

Es ist zu beachten, dass in den jeweils 8 %igen SDS-Gelen das Standardfusionsprotein von CD44 bei etwa 70kd, Rg3 bei 75 kd und Rg10 bei 80kd läuft.

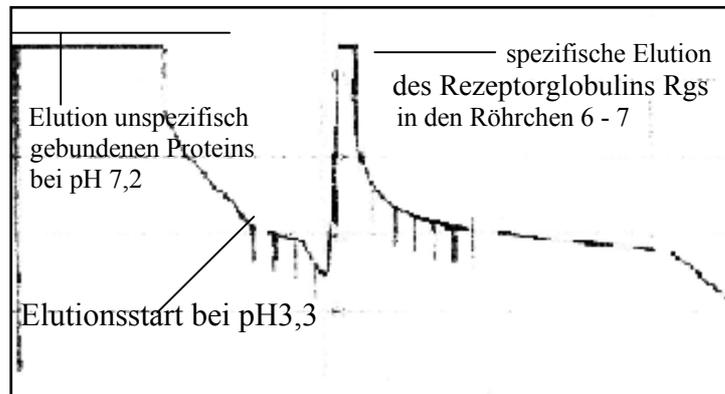


#### Immunoblot:

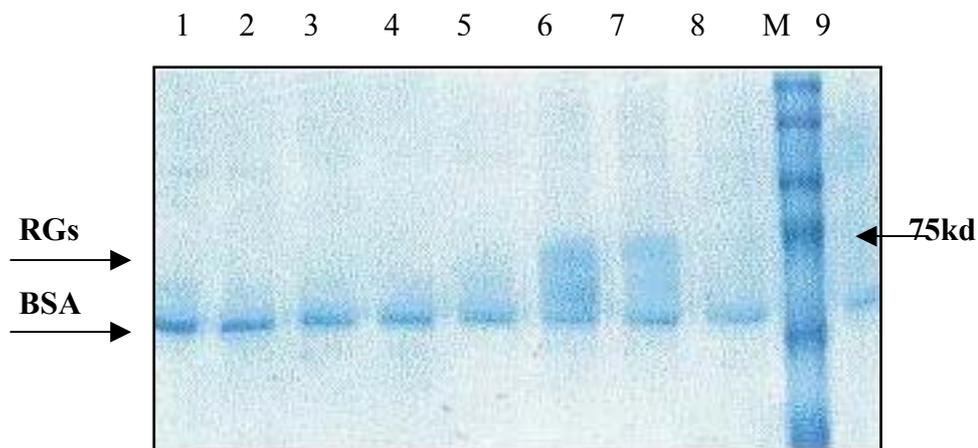
Überstände der Ag8-Transfektanten Ag8-Rgs, Ag8-Rg3 und Ag8-Rg10 wurden mittels SDS-Gelelektrophorese in einem 8 %igem Gel aufgetrennt und mit dem antiCD44s mAk KM81 nachgewiesen

**Abbildung 20**

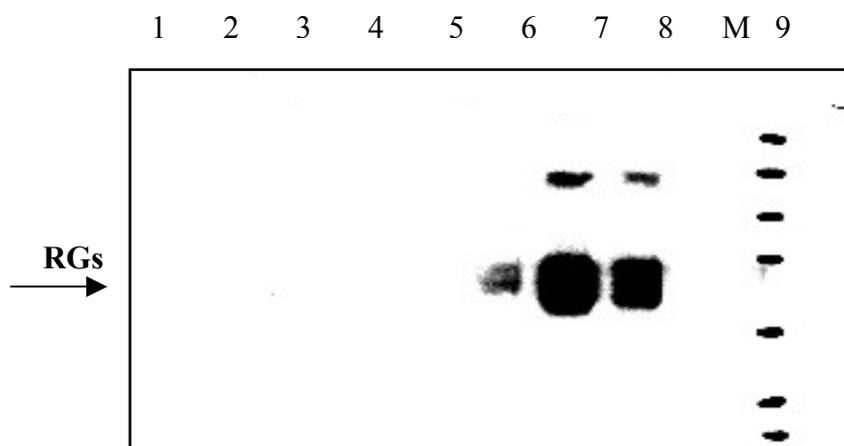
## Aufreinigung des CD44-Standard-Rezeptorglobulins Rgs



**Elutionsprofil:** Fraktionierte Elution (2 ml / Fraktion) des Kulturüberstandes CD44-Rgs-transfizierter Zelllinien von einer mit dem mAk 187.1 gekoppelten CnBr-Agarosesäule



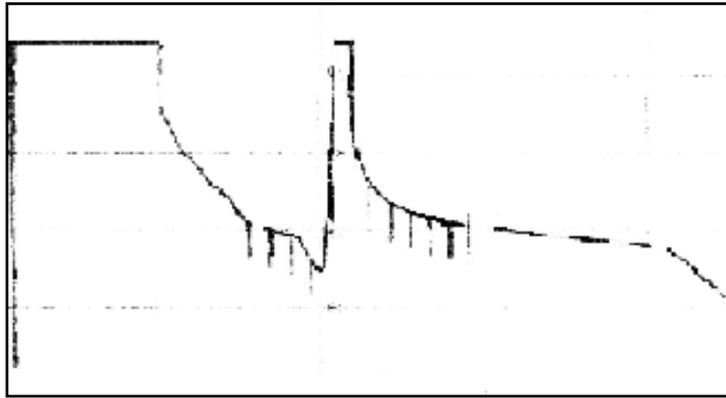
**Coomassie-Färbung:** Die Fraktionen 1 – 9 (20  $\mu$ l / Spur) wurden einer SDS Gelelektrophorese (8 %) unterworfen und anschließend mit Coomassie-brilliantblau gefärbt.



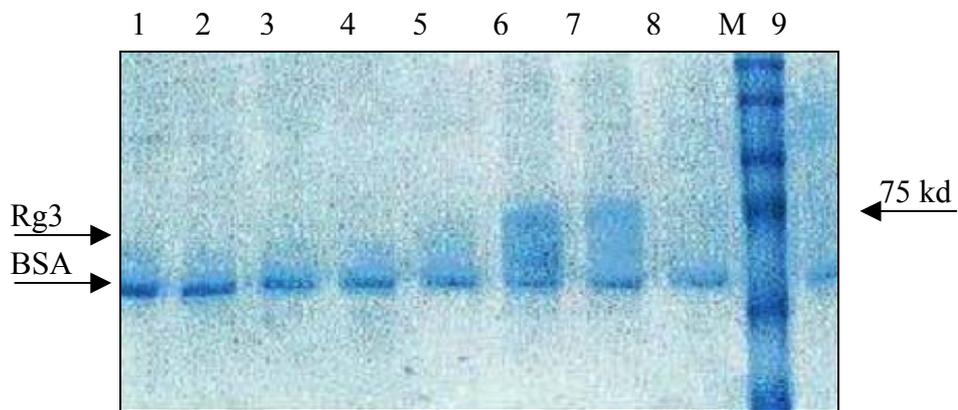
**Immunoblot:** Die im SDS-polyacrylamidgel aufgetrennten Fraktionen wurden auf eine pvdf-Membran transferiert und mit dem anti-CD44s mAk KM81 gefärbt.

**Abbildung 21**

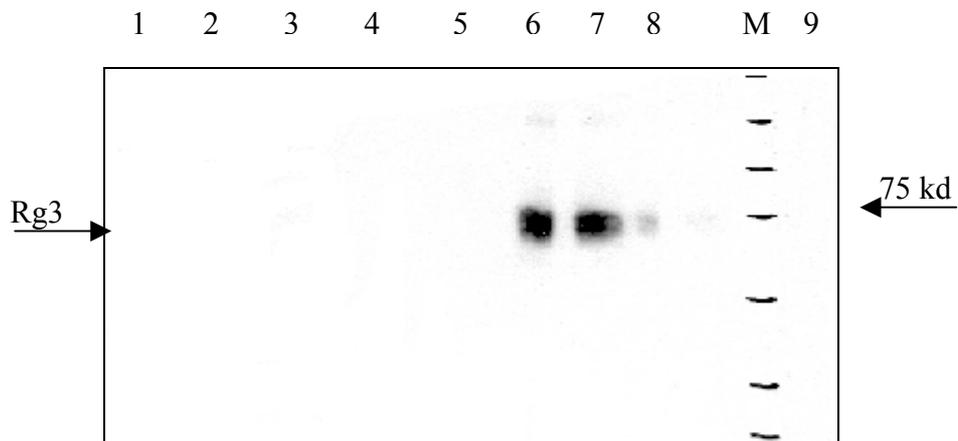
### Aufreinigung des CD44-Varianten-Rezeptorglobulins Rg3



**Elutionsprofil:** Fraktionierte Elution (2 ml / Fraktion) des Kulturüberstandes CD44-Rg3-transfizierter Zellen von einer mit dem mAk 187.1 gekoppelten CnBr-Agarosesäule



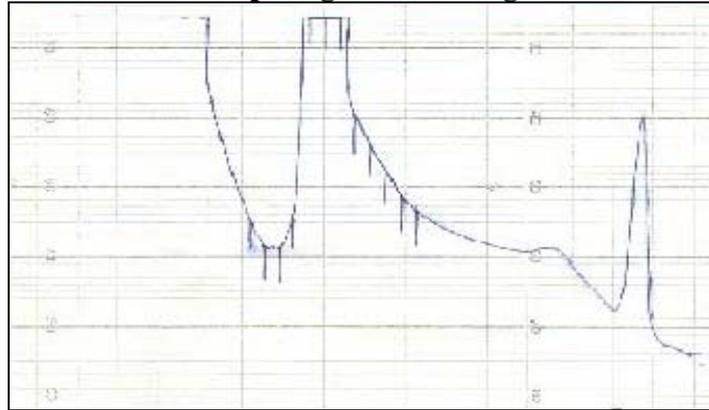
**Coomassie-Färbung:** Die Fraktionen 1 – 9 (20  $\mu$ l / Spur) wurden einer SDS Gelelektrophorese (8 %) unterworfen und anschließend mit Coomassie-brilliantblau gefärbt.



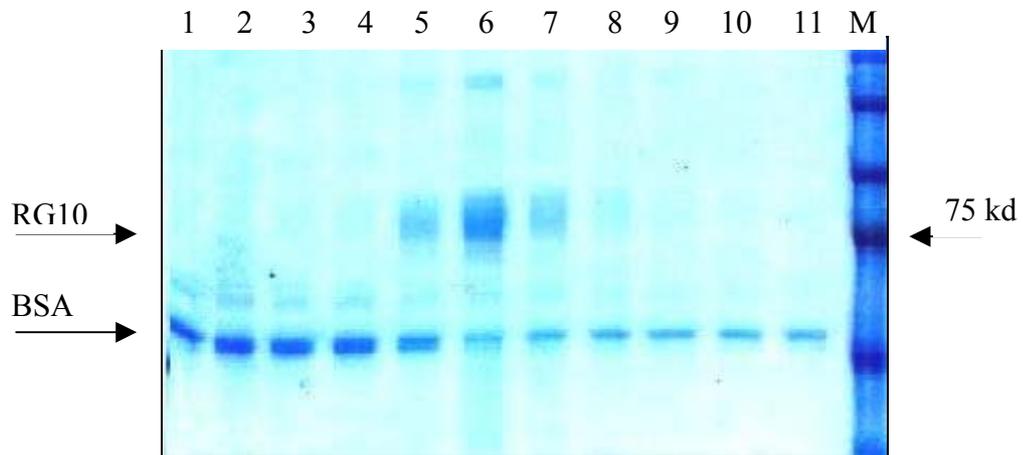
**Immunoblot:** Die im SDS-polyacrylamidgel aufgetrennten Fraktionen, wurden auf eine pvdf-Membran transferiert und mit dem anti-CD44s mAk KM81 gefärbt.

**Abbildung 22**

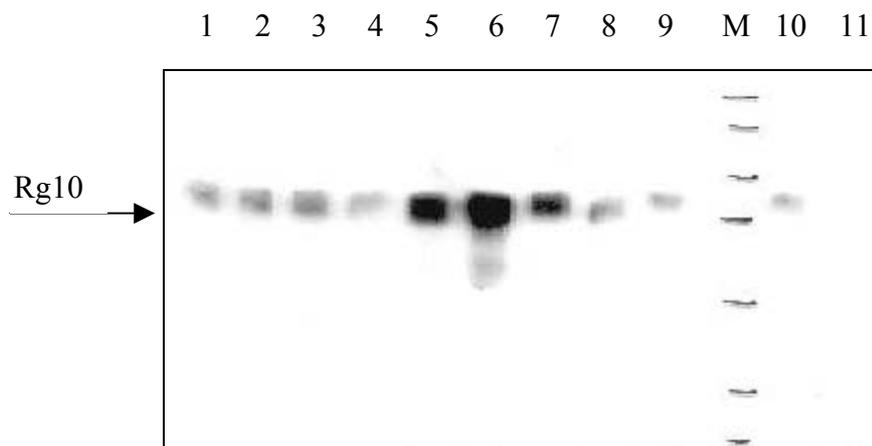
### Aufreinigung des CD44v10-Rezeptorglobulins Rg10



**Elutionsprofil:** Fraktionierte Elution (2ml / Fraktion) des Kulturüberstandes CD44-Rg10-transfizierter Ag8 Zellen von einer mit dem mAk 187.1 gekoppelten CnBr-Agarosesäule



**Coomassie Färbung:** Die Fraktionen 1 – 10 (20µl / Spur) wurden einer SDS Gelelektrophorese (8 %) unterworfen und anschließend mit Coomassiebrilliantblau gefärbt.



**Immunoblot:** Die im SDS-Gel aufgetrennten Fraktionen wurden auf eine pvdf-Membran transferiert und mit dem anti-CD44s mAk KM81 gefärbt

**Abbildung 23**

Die biologische Aktivität der Rezeptorglobuline wurde auf zweierlei Art überprüft, über die Bindung der AK an die sezernierten Rg's und über die Bindung der Rg's an Matrixmoleküle. Alle verwendeten anti-CD44s oder anti-Varianten mAk erkennen ihr natives Protein auf lebenden Zellen. Da alle Rezeptorglobuline den CD44-Standardanteil enthielten in den jeweils exklusiv nur eine einzelne Variante inkloniert war, sollten alle Rg's von beiden Standard-mAk, jedoch nur jeweils dem korrespondierenden anti-Varianten-mAk, erkannt werden. Wie Abbildung.24 zeigt, wurde diese Vorhersage durch einen entsprechende ELISA voll bestätigt. Zu den vielen beschriebenen Liganden von CD44 (s. Einleitung , 1.4.1) gehören Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) wie z.B. Hyaluronan oder Fibronectin. Ein ELISA, der die Bindungseigenschaften der Rg's an verschiedene dieser ECM-Moleküle prüfen sollte (Abb. 25), zeigt eine Bindung aller 3 getesteten Rg's, Rgs , Rg3 und Rg10 an Fibronectin. Eine Bindung an den erwiesenermaßen Hauptliganden von CD44, Hyaluronan, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte seine Erklärung darin finden, dass die Affinität eines einzelnen CD44 Moleküls zu Hyaluronan für eine dauerhafte Bindung nicht ausreicht (79).

## 4.2 Interaktion

Nachdem ich zeigen konnte, dass über die Expression varianter CD44-Isoformen die Expression von LFA-1 induziert wird, war es von Interesse, zu untersuchen, ob ein ähnliches Phänomen im Kontext mit sezerniertem CD44 zu beobachten wäre. Die Beantwortung dieser Frage gibt gleichzeitig einen Hinweis, ob die Interaktion zwischen CD44 und LFA-1 in cis oder trans stattfindet.

Ag8 sind dem Typ nach Suspensionszellen. Hält man die Zellen jedoch für längere Zeit in Kultur, setzt sich ein Teil der Zellen als leicht-adhärente Fraktion am Flaschenboden fest, ohne ihre runde Form völlig aufzugeben. Die Abbildung 26 zeigt eine vergleichende Immunfluoreszenz untransfizierter und Rg3 transfizierter Ag8 Zellen. Die Regionen 1 und 2 repräsentieren die große Fraktion flotierender Zellen, während 3 und 4 den, wie schon bei SAT Zellen am Größenunterschied erkennbaren, adhärenen Anteil bezeichnen.

Im Gegensatz zu SAT exprimieren Myelomzellen, LFA-1. Auf der nicht adhärenen Fraktion Rg3 sezernierender Zellen ist jedoch ein starker Anstieg der LFA-1 Expression sichtbar. Ag8 Zellen sind wie schon gesagt CD44v3 negativ (weshalb sie auch als Kontrollzellen mit pT7T3CD44v3 transfiziert wurden, Abb.4). Eine Erklärung für die Detektion von v3 auf der Suspensionsfraktion von Ag8 wäre die Bindung des sezernierten Rezeptorglobulins an einen Liganden für den Standard oder den Varianten Teil von CD44, der nur auf nicht adhärenen

### Spezifische Erkennung der Rezeptorglobuline Rgs, Rg3 und Rg10 durch korrespondierende anti-Varianten-mAk

	Kontrollserum	Kontroll. rIgG	KM81	IM-7	K926	PtS	anti-v3-Serum	anti-v7-Serum
Rg3	0,15	0,07	1,2	0,95	0,23	0,87	1,18	0,25
Rg10	0,138	0,08	1,4	1,15	0,95	0,08	0,24	0,23
RgS	0,12	0,06	0,9	1,1	0,12	0,12	0,22	0,24
Rg7	0,13	0,06	1,23	1,1	0,09	0,12	0,34	1,34

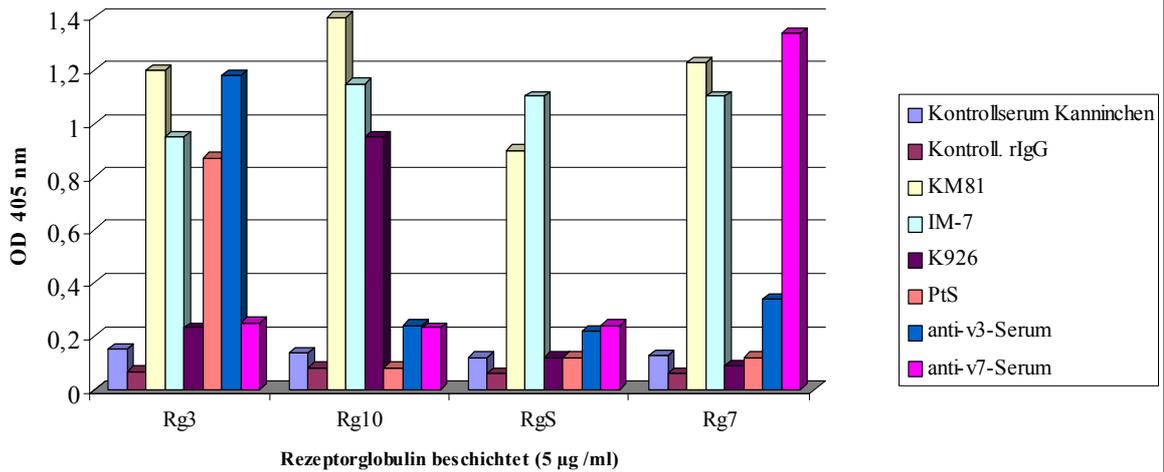


Abbildung 24

### Alle drei Rezeptorglobuline binden Fibronektin, jedoch weder die getesteten Kollagene noch Hyaluronan

	RSA	Kollagen-1	Kollagen-3	Kollagen-4	Fibronektin	Hyaluronan
Rgs	269	195	130	2	658	234
Rg3	303	136	142	268	937	280
Rg10	348	98	94	260	931	198

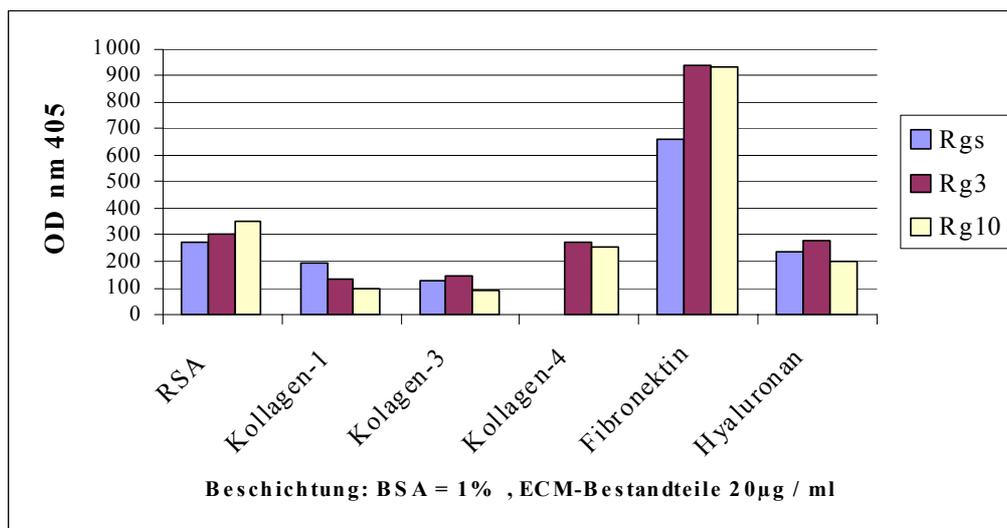
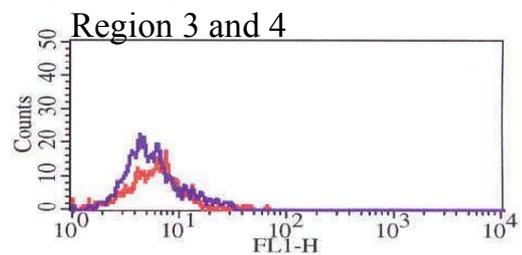
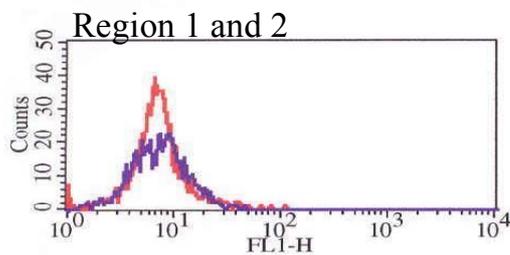
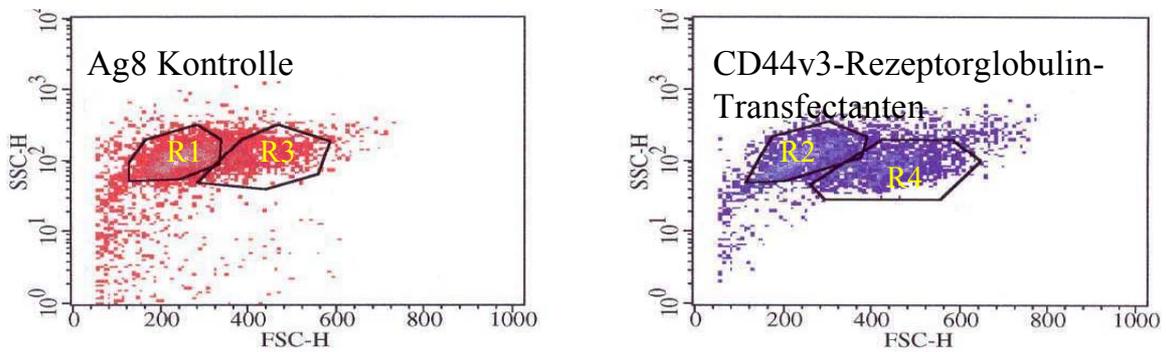
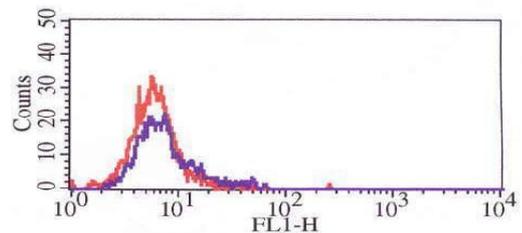
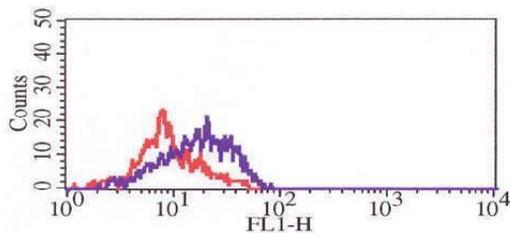


Abbildung 25

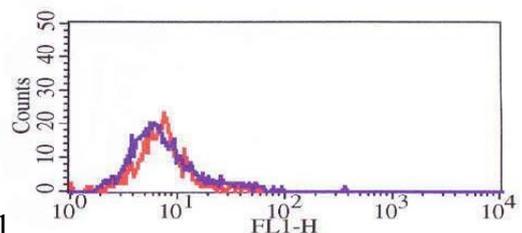
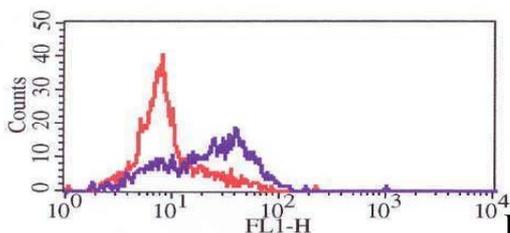
Vergleich der Expression von LFA-1 auf Rg3 transfizierten Ag8 Zellen und Moc-transfizierten Kontrollzellen



Negativ Kontrolle



CD44v3

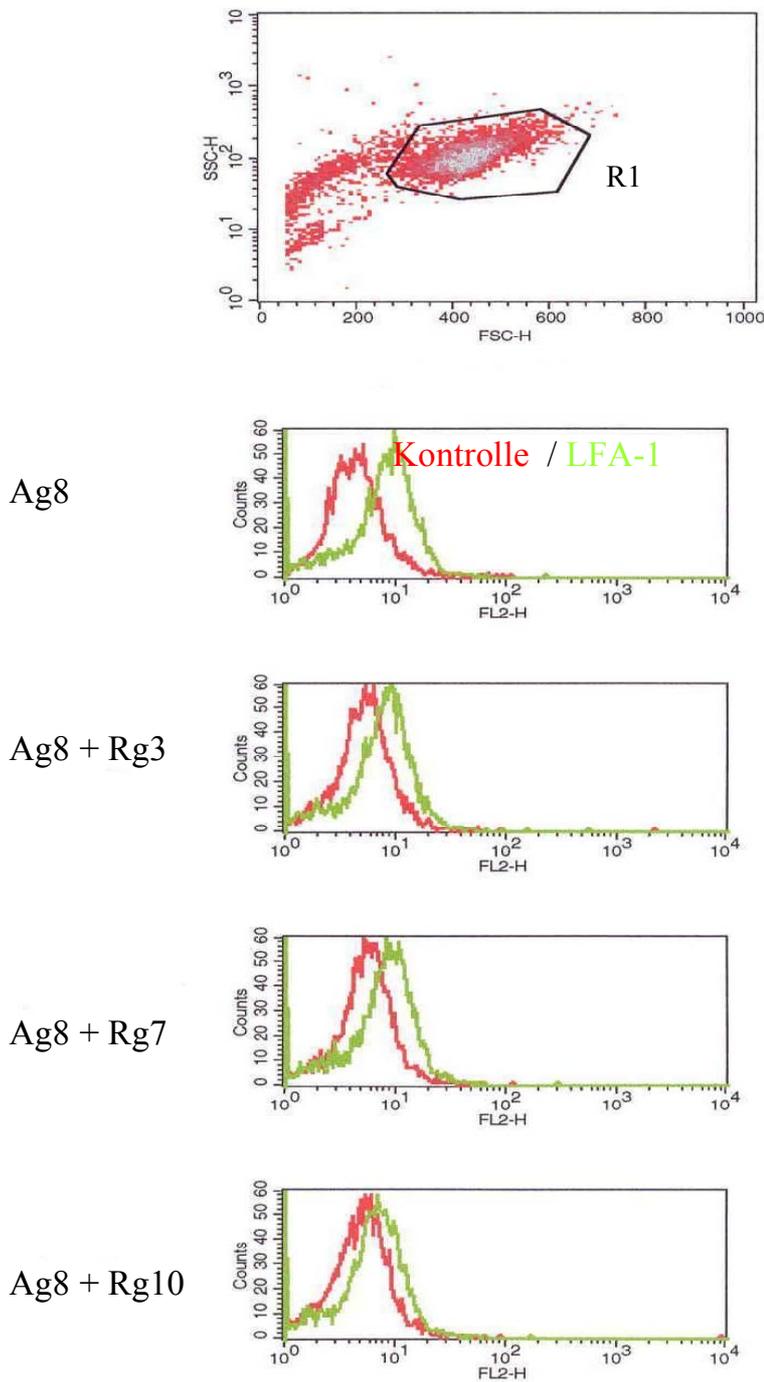


LFA-1

**Immunfluoreszenz:** Ag8 Zellen, die mit dem leeren Vektor (Moc) und solche, die mit pHT-CD44v3-κ transfiziert wurden, sind mit M17.51 und PtS gefärbt worden. Die Regionen R1 und R2 liegen im Forwardscatter (FSC) weiter links und im Sidescatter (SSC) höher als die in Region 3 und 4. Sie repräsentieren damit den Großteil kleiner, nicht adhärenter Zellen an der Zellpopulation. Die Region 2 ist sehr viel stärker positiv für CD44v3 (PtS) und LFA-1 als die Region 1. Für die Regionen 3 und 4 ist kein Unterschied feststellbar.

Abbildung 26

## Einfluss der Gegenwart verschiedener CD44-Rezeptorglobuline auf die LFA-1 Expression untransfizierter Ag8 Zellen



**Immunfluoreszenz** : Die Ag8-Zellen aus zwei 50 ml Kulturflaschen wurden vereinigt und anschließend auf 4 neue Kulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden in RPMI1640 10 %FKS allein = Ag8, + 50 % Kulturüberstand von Ag8-Rg3, -Rg7 oder -Rg10 für 24 oder 48 h kultiviert. Gezeigt ist eine Immunfluoreszenzmarkierung mit dem anti-LFA-1 mAk M17.5 nach 48h auf den verschiedenen kultivierten Zellen.

**Abbildung 27**

Zellen exprimiert würde. Diese Annahme ließ sich nicht bestätigen. Wenn nicht transfizierte Ag8-Zellen mit RG3 inkubiert wurden, ließ sich auch auf der nicht adhärenen Fraktion kein gebundenes Rezeptorglobulin nachweisen. Die Befunde sprechen daher dafür, dass sezerniertes Rg3 keinen Einfluss auf die Expression von LFA-1 nimmt, vielmehr eine Interaktion in cis stattfindet. Diese Interpretation wurde auch durch das folgende Experiment unterstützt. Nach Inkubation von Ag8-Zellen mit allen drei varianten Rezeptorglobulinen konnte keine erhöhte Expression von LFA-1 festgestellt werden. Stattdessen kam es zu einer Abnahme der LFA-1 Expression auf der Zelle nach Inkubation mit jedem der drei Rezeptorglobuline. (Abb. 27)

### 4.3 Immunpräzipitationen von LFA-1 und CD44

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei LFA-1 nicht um einen möglichen Liganden von CD44v handelt, stellte sich die Frage, ob die Koexpression ausschließlich auf eine Induktion der Transkription zurückzuführen ist, und ob die beiden Moleküle direkt interagieren. Abbildung 28A zeigt eine Immunpräzipitation von CD44s und CD44v3 durch die Antikörper KM81 und PtS sowie das anti-v3-Kaninchenserum und ein Kontrollserum eines nicht immunisierten Kaninchens. Die verwendeten Zellen waren J774 Makrophagenzellen, da diese Linie CD44v3 sehr stark exprimiert. Zu erkennen ist deutlich die Präzipitation von CD44s durch KM81 bei etwa 66 kd. Eine Bande von ca. 180 kd ist bei allen drei Präzipitationen mit Ausnahme des Kontrollserums sichtbar. Bei dieser Bande könnte es sich der Größe nach (Zitat) um CD44v3-8-10 handeln. In dem Bereich um 90 kd ( $\beta$ 2-Integrin) ist weder mit PtS noch anti-v3-Kaninchenserum eine Bande sichtbar.

IP12-7 Zellen exprimieren sowohl viel LFA-1 und CD44s als auch v3 in ausreichender Konzentration.

Die in Abbildung 28 B gezeigte Präzipitation mit den Anti-CD44 mAk KM81, IM-7, anti-v3-Serum PtS und M17 ließ eine Kopräzipitation von CD44s und dem  $\beta$ 2-Integrin-Anteil an LFA-1 vermuten (s. Pfeil). Umgekehrt präzipitierte der anti-LFA-1 Antikörper hingegen ein Protein von der Größe des CD44 Standardmoleküls (66 kd). Dass das anti-v3-Serum ebenfalls eine Bande von Standardgröße präzipitiert, ließe sich durch eine monomere Bindung von CD44v3 und CD44s und eine dadurch ermöglichte Kopräzipitation beider erklären. Das anti-v3-Serum präzipitiert auch auf T-Zellen CD44v3-8-10 (s. Pfeile) während PtS, der, wie schon beschrieben, nur sehr schlecht an IP12-7 bindet, keine spezifische Präzipitation zeigt.

Sollte es sich tatsächlich um eine Kopräzipitation von LFA-1 und CD44 handeln, müsste sich durch den anti-LFA-1-mAk kopräzipitiertes CD44s durch einen anti-CD44 mAk nachweisen lassen.

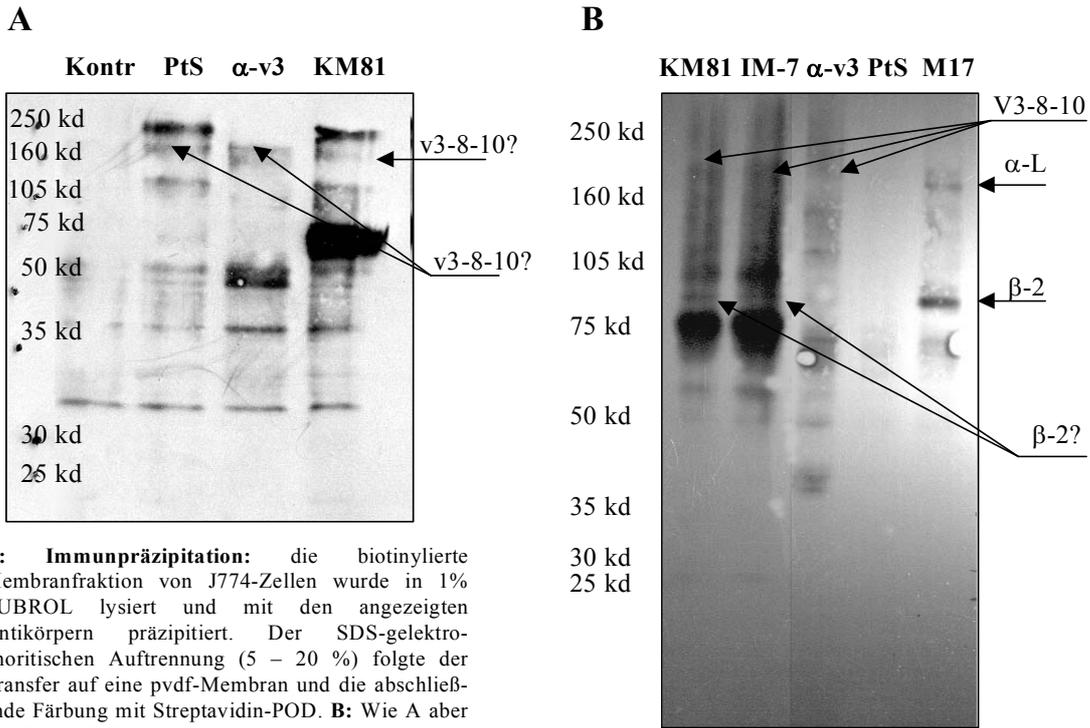
Bei den bisherigen Immunpräzipitationen wurden die Zelloberflächenproteine vor der spezifischen Präzipitation durch mAk biotinyliert. Nach einer Auftrennung der durch einen mAk präzipitierten Proteine im SDS-Gel wurden diese nach Transfer auf eine pvdf-Membran mittels Streptavidin und ECL-Reagenz gefärbt.

Unbiotinylierte Proteine, die auf die gleiche Art und Weise präzipitiert wurden, konnten, soweit es sich um CD44s handelte, mit biotinyliertem IM-7 mAk ohne störende Nebensignale des zur Präzipitation eingesetzten mAk nachgewiesen werden.

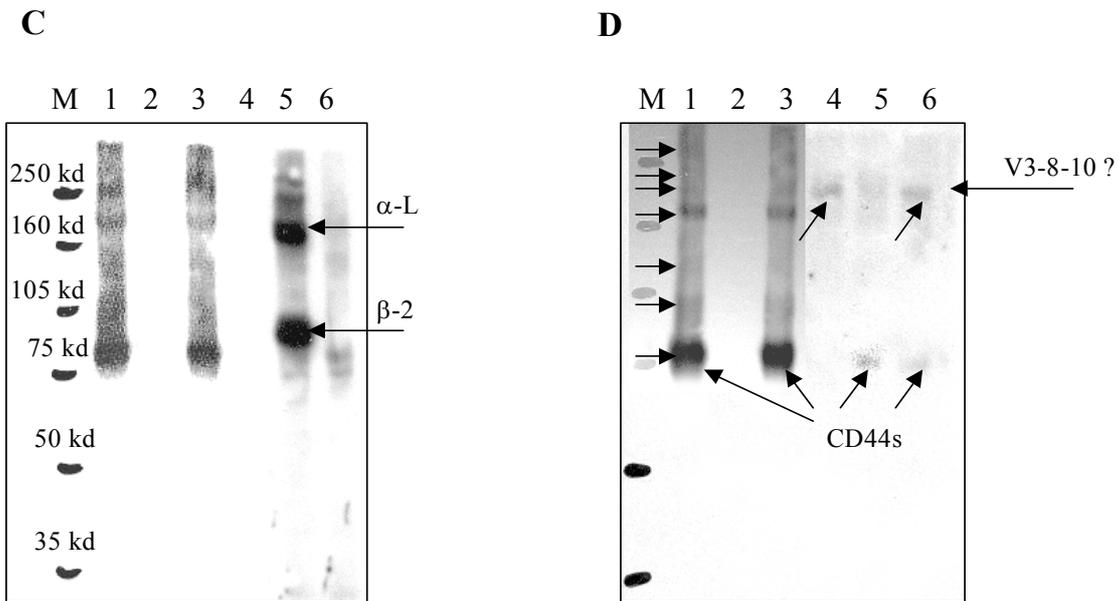
Setzt man die extrem schwache Bande in Spur 5 von Abbildung 28 D in Bezug zu der großen Menge von CD44s und LFA-1 die auf IP12-7 Zellen exprimiert werden, so kann von keiner spezifischen Kopräzipitation gesprochen werden. Die schwache Bande CD44-v3-8-10, die in Bande 6 von anti-v3-Serum präzipitiert wird, ist auch in Bande 4 durch den anti-CD3 mAk 2C11 präzipitiert worden. Eine Verbindung von CD44v3-8-10 mit CD3 über dessen  $\epsilon$ -Kette ist bereits beschrieben (78) und damit ein weiteres Indiz für die Identität von CD44v3-8-10.

Die bisher erhobenen Befunde haben gezeigt, dass CD44v3 vornehmlich auf Stromazellen für lymphoide Progenitoren und auf APZ exprimiert wird. Die Blockade von CD44v3 auf Stromazellen resultierte in einer Reifungsblockade von B-Progenitorzellen. Die Blockade von CD4v3 auf DC zeigte keinen direkten Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen, allerdings kam es zu einer verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern sowie der Expression von die Reifung von TH1 Zellen unterstützenden Zytokinen. Es sei auch erwähnt, wie bei der schwachen Expression auf T-Zellen fast zu erwarten, dass ich keine Hinweise für eine wesentliche Funktion von CD44v3 als Ligand eines kostimulatorischen Molekül erheben konnte. Dies „negativen“ Daten sind der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt. Ein weiterer wesentlicher Befund war die Induktion der Expression von LFA-1 durch variante CD44 Isoformen. Die Frage einer CD44v-spezifischen Signaltransduktion, die zur Expression von LFA-1 führt, bleibt zu klären. Sichergestellt werden konnte, dass LFA-1 keinen Liganden von CD44v3 darstellt und dass eine direkte Interaktion zwischen CD44-Varianten und LFA-1 eher unwahrscheinlich ist.

### Schwache Kopräzipitation von CD44 und LFA-1



**A: Immunpräzipitation:** die biotinylierte Membranfraktion von J774-Zellen wurde in 1% LUBROL lysiert und mit den angezeigten Antikörpern präzipitiert. Der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung (5 - 20 %) folgte der Transfer auf eine pvdf-Membran und die abschließende Färbung mit Streptavidin-POD. **B:** Wie A aber mit IP12-7 Zellen



**C/D: Immunpräzipitation** von IP12-7 Zellen ( $3 \times 10^6$  Zellen / Spur). Verwandte Antikörper: 1 = KM81; 2 = YBM; 3 = IM-7; 4 = 2C11; 5 = M117; 6 = PtS . **A:** Biotinylierte Membranfraktion wurde in 1 % LUBROL lysiert, mit den angegebenen mAk präzipitiert und nach SDS-gelelektrophoretisch Auftrennung (8 %) auf eine pvdf-Membran übertragen. Transferierte Proteine wurden mit Streptavidin-POD gefärbt und mit ECL-Reagenz nachgewiesen. **B:** Unbiotinylierte Membranfraktion wurde behandelt wie in A, um anschließend mit biotinylierten anti-CD44s-mAk IM.7 nachgewiesen zu werden.

**Abbildung 28**

## 4.4 Ligandensuche

Die Rezeptorglobuline Rgs, Rg3 und Rg10 waren wie bereits erwähnt für die Suche nach Varianten spezifischen Liganden hergestellt worden.

Lösliche Rezeptorglobuline sollten in der Lage sein, ihren Liganden auf verschiedenen Zelltypen, wenn vorhanden, zu binden. Biotinylierte Rg's könnten mittels fluorochrommarkierten Streptavidins im Durchflusszytometer detektiert werden. Liegt ein löslicher Ligand vor, so könnte er eventuell nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung aus einem Zellüberstand oder Serum als auf eine pvdf-Membran geblottetes Protein von dem biotinyliertem Rg gebunden und auf diese Weise detektiert werden.

Als dritte Möglichkeit bietet sich, bei Verdachtsfällen, ein ELISA an, wie er schon für die Überprüfung der Bindung an ECM-Bestandteile Anwendung gefunden hat.

Zu Beginn wurde eine Doppelfluoreszenz mit den biotinylierten Rg's und Identifizierungsmarkern wie CD4, CD8 usw. auf frisch isolierten Milzzellen durchgeführt.

Die beiden Abbildungen 29a und b zeigen die erfolgreiche Durchführung und Auswertbarkeit der Immunfluoreszenz. Außerdem erkennt man neben der für Rg3 und Rgs vergleichbaren bevorzugten Bindung an Oberflächen-IgM<sup>+</sup> B-Zellen eine größere Population Rg3 bindender T-Zellen verglichen mit Rgs.

In der Population kleiner naiver Lymphozyten (Region1) werden lediglich B-Zellen von Rgs und Rg3 erkannt, T-Zellen dieser Region hingegen bleiben unmarkiert.

Eine nähere Charakterisierung Rgs /Rg3<sup>+</sup> Lymphozyten (Abb.30) bestätigt dieses Bild.

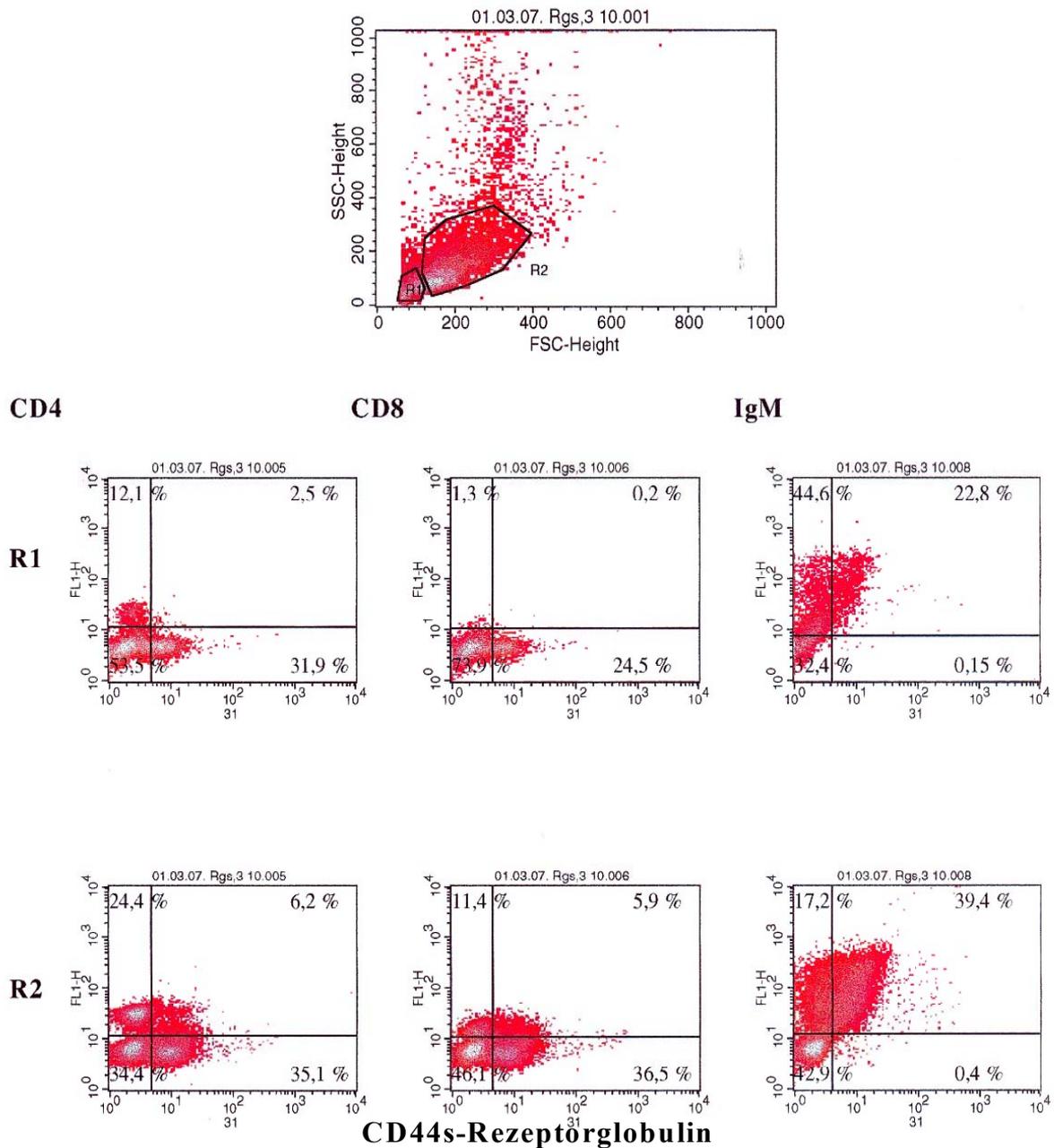
Der größte Anteil Rgs<sup>+</sup> wie Rg3<sup>+</sup> Zellen exprimiert ebenfalls CD40 dem B-Zell-Marker. In der murinen Milz sind Rgs und Rg3 bindende Zellen mit insgesamt 29% bzw. 37,5 gegenüber Rg10 mit ca. 13% (welches insgesamt gleichmäßiger zu verteilt sein scheint als die beiden anderen Rg's Abbildung 32) stärker vertreten

Im Knochenmark von Mäusen bietet sich ein anderes Bild. Hier dominieren Rg3 und Rg10 mit 44% bzw. 35 % gegenüber Zellen, die das Standardfusionsprotein mit nur 17 % binden.

Auffällig ist die Dominanz von Rg3 auf CD43<sup>+</sup> Zellen. Dieses Verteilungsmuster entspricht in etwa der Verteilung von v3 im Knochenmark. (Abb31 und 32). Daher schien es angezeigt, die Möglichkeit einer monomeren Bindung zwischen zwei CD44-Molekülen, einem Membranständigen auf der einen und einem Rezeptorglobulin auf der anderen Seite, zu überprüfen bzw. auszuschließen. Dies war am einfachsten mit nicht transfizierten und CD44-transfizierten SAT-Zellen möglich. Für Rg3 wurde mit 27 % gegenüber 9 % für Rgs und 24

% für Rg10 die stärkste Bindung an SAT Zellen nachgewiesen (Abb. 35), die Transfektion mit CD44s, CD44v3, CD44v6 oder CD44v7 führt zu keiner Verstärkung dieser

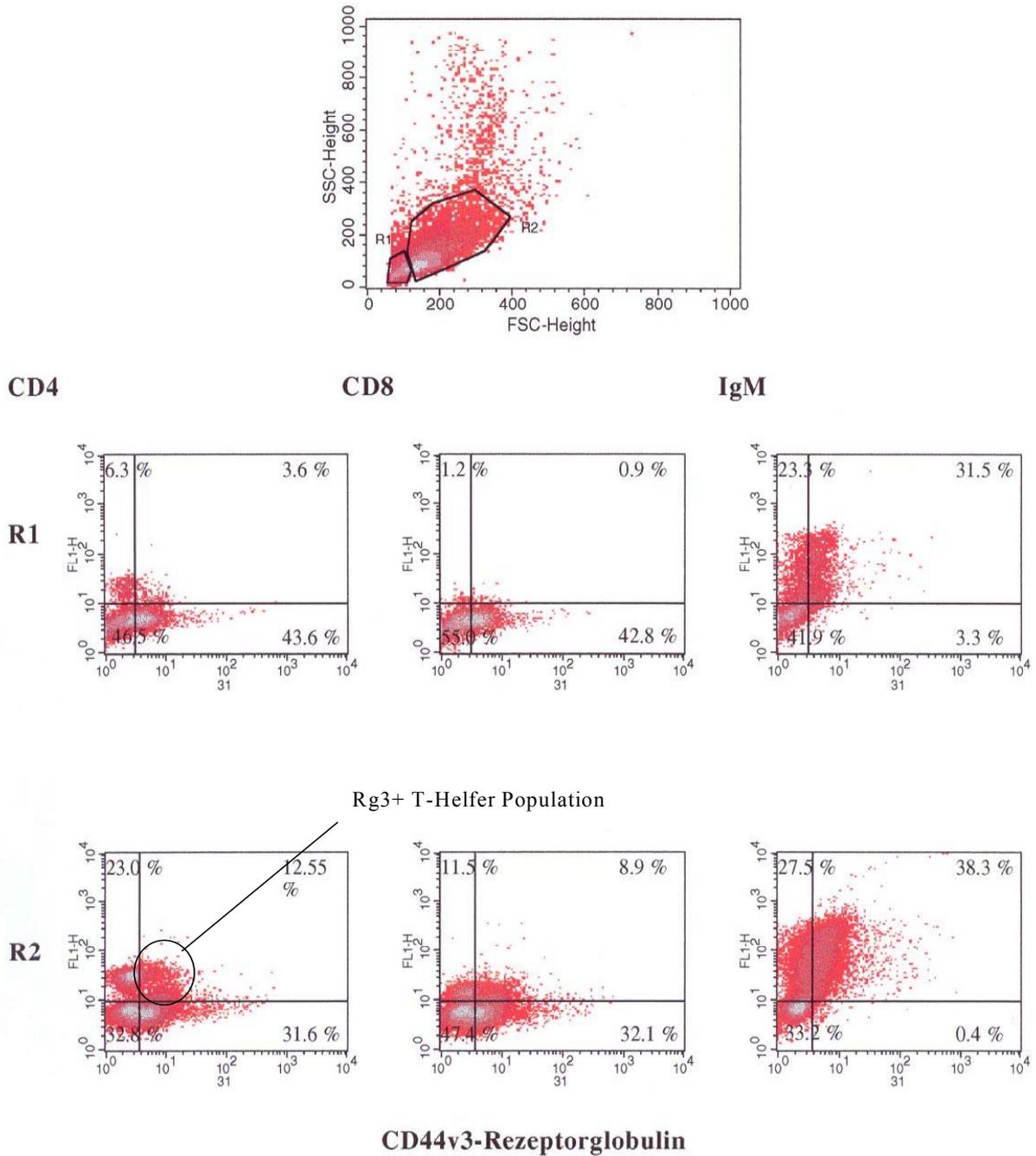
**Doppelfluoreszenz auf Balb/c-Milzzellen mit biotinyliertem CD44s-Rezeptorglobulin und den angezeigten Antikörpern**



**Doppelfluoreszenz:** Frisch isolierte BalB/c Milzzellen wurden mit den angezeigten mAk gefolgt von PE-konjugierten Zweitantikörpern und biotinyliertem CD44s-Rezeptorglobulin gefärbt. Dargestellt ist eine Density-Blot-Analyse der doppelt gefärbten Zellen. Weiße Farbe kennzeichnet Bereiche höchster Zelldichte.

Abbildung 29 a

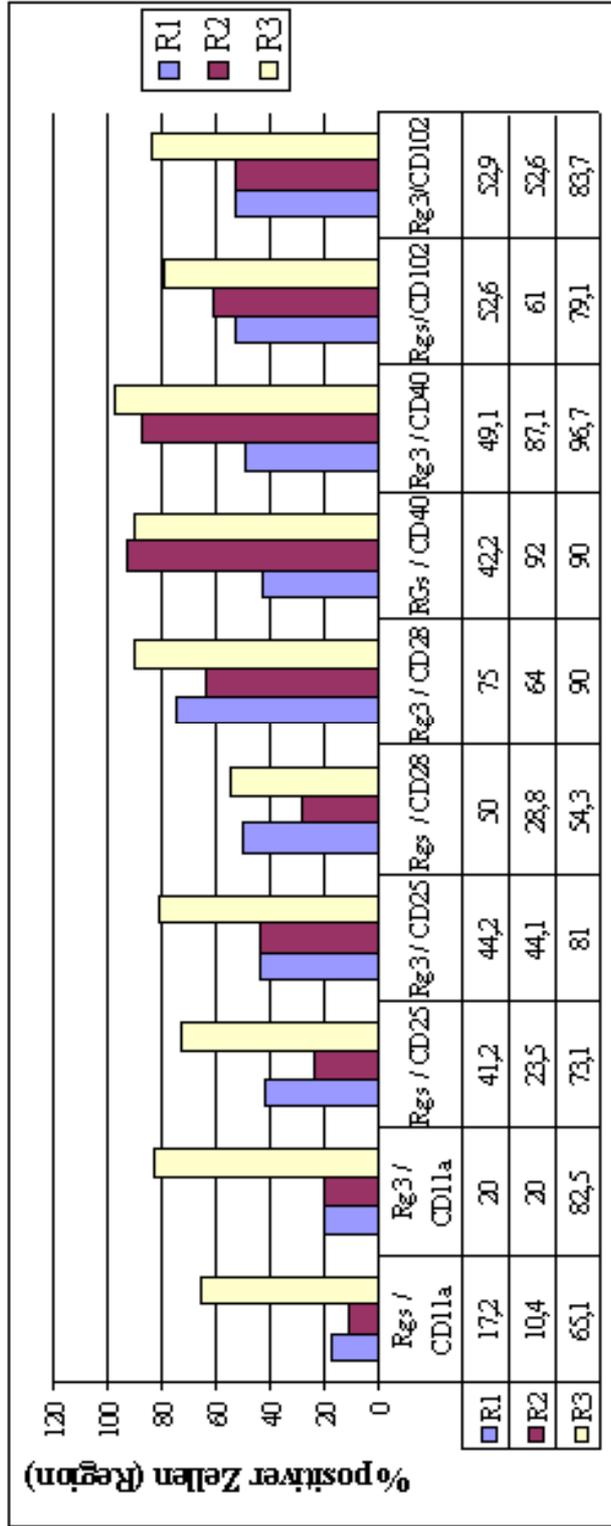
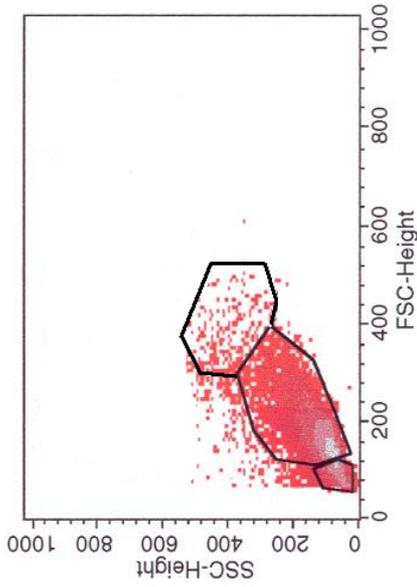
Doppelfluoreszenz auf Balb/c-Milzzellen mit biotinyliertem CD44v3-Rezeptorglobulin und den angezeigten Antikörpern



**Doppelfluoreszenz:** Frisch isolierte Balb/c Milzzellen wurden mit den angezeigten mAk gefolgt von PE-konjugierten Zweitantikörpern und biotinyliertem CD44v3-Rezeptorglobulin gefärbt. Dargestellt ist eine Density-Blot-Analyse der doppelt gefärbten Zellen. Weiße Farbe kennzeichnet Bereiche höchster Zelldichte.

Abbildung 29 b

Charakterisierung Rgs und Rg3 positiver Lymphozyten



**Doppel fluoreszenz:** Frisch isolierte murine Milzzellen wurden mit biotinylierten Rezeptorglobulin Rgs oder Rg3 und den angezeigten mAk gefolgt von FITC-konjugiertem Zweitantikörpern gefärbt. Die für die Regionen 1 (kleine naive Zellen) 2 (große, z.T. aktivierte Milzzellen) und 3 (Plasmazellen) angegebenen Werte beschreiben den Anteil Rgs/3<sup>+</sup> Zellen, bezogen auf die jeweils 100 % gesetzten Identifizierungsmarker<sup>+</sup> Zellen. In der Region 2, sind z.B. nur 28,8 % der CD28<sup>+</sup> Zellen auch Rgs, jedoch 64% Rg3<sup>+</sup>.

Abbildung 30

## Doppelimmunfluoreszenz mit den CD44-Rezeptorglobulinen Rgs, 3 und 10 sowie zelltypspezifischen Oberflächenmarkern auf:

A: Frisch isolierten Knochenmarkzellen (Balb/c) , B: Frisch isolierten Milzzellen (Balb/c)

R g s	8,5	20,5	12,1	3,3	2,1	5,3	4,6
R g 3				5,8	2,2	16,5	12,2
R g 10				4,1	1,8	7,2	5,5
% RgX-positiver Zellen, bezogen auf die jeweils Marker-charakterisierten Zellpopulationen							
R g s				39,1	43,1	14,6	26,9
R g 3				67,2	75,3	31,6	67,6
R g 10				51,3	38,3	18,5	27,5

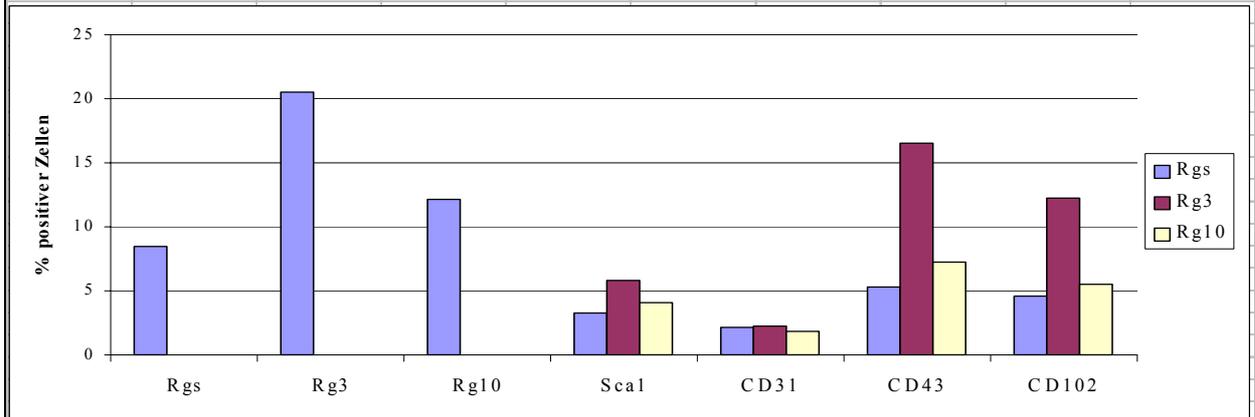
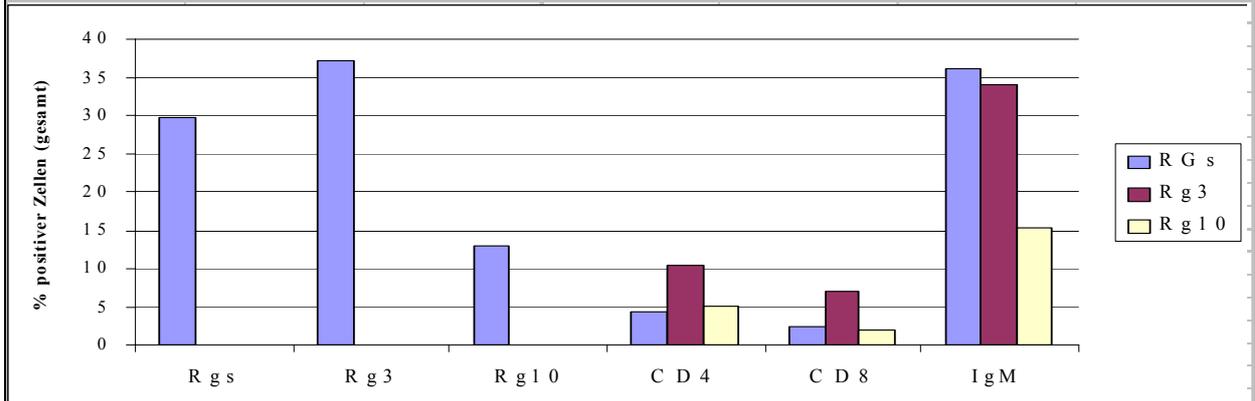


Abbildung 31

R G s	29,6	37,2	12,9	4,3	2,5	36,2
R g 3				10,4	7,1	34,1
R g 10				5,1	1,9	15,2
% RgX-positiver Zellen bezogen auf die jeweilige Lymphozytenpopulation						
R g s				18,3	25,1	64,1
R g 3				39,7	37,8	56,1
R g 10				20,4	21,3	28,5



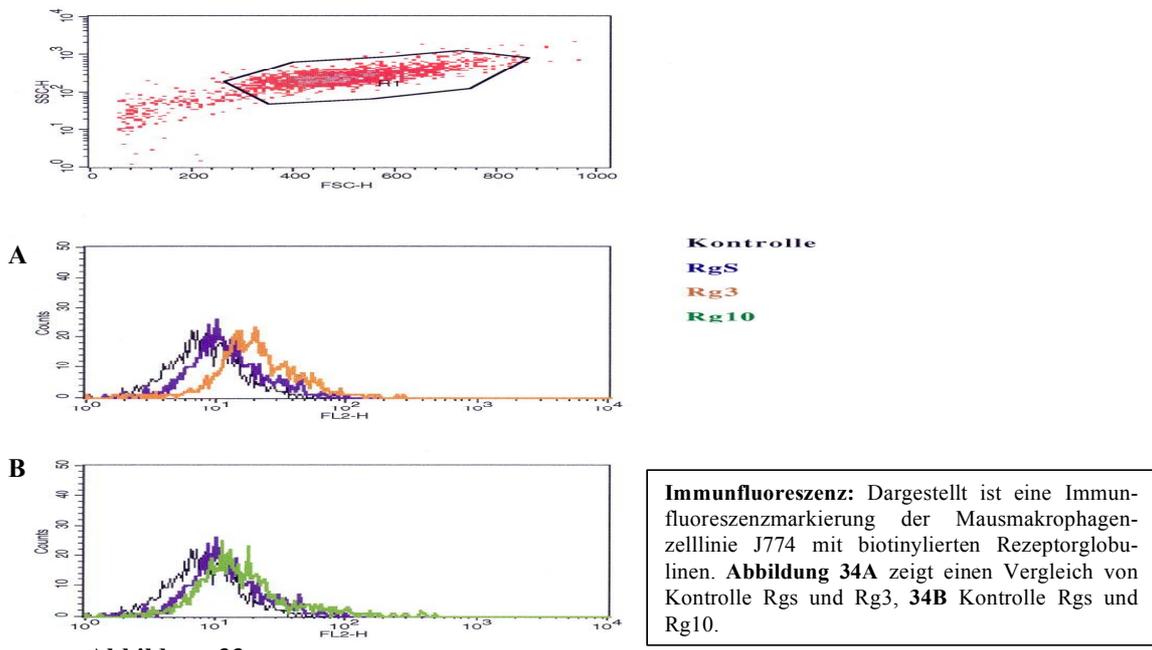
**Doppelimmunfluoreszenz:** Frisch isolierte Milz- oder Knochenmarkzellen von Balb/c Mäusen wurden mit direkt FITC-markierten Identifizierungsmarkern und biotinylierten Rezeptorglobulinen gefolgt von PE-konjugiertem Streptavidin gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

Abbildung 32

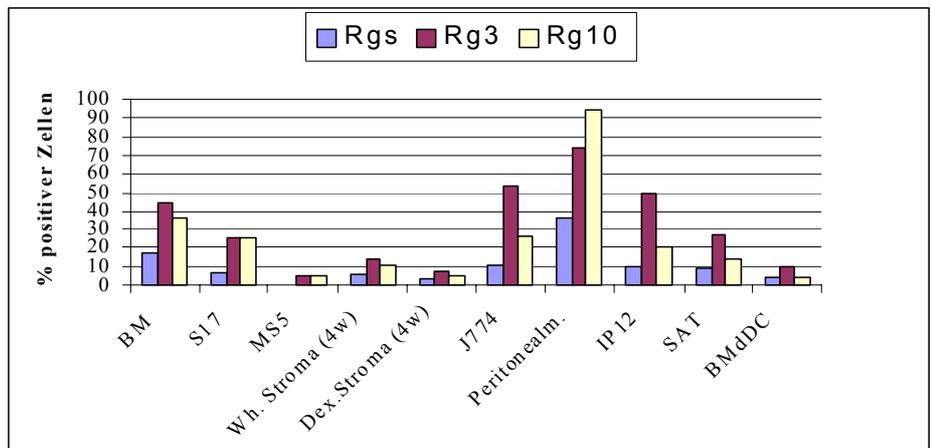
Bindung (in Abb. 33 ist der Übersicht wegen nur die Bindung an SAT und CD44v3 transfizierte SAT-Zellen dargestellt). Außer SAT Zellen wurden auch eine Reihe weiterer Zelllinien auf die Expression von CD44s, CD44v3 und CD44v10-Liganden überprüft (Abbildung 33 und exemplarisch für J774-Zellen in Abb. 34). Dabei zeigte sich, dass die Bindung von Rgs in jedem Fall hinter denen der varianten Rezeptorglobuline zurückbleibt. Die verstärkte Bindung der varianten Rezeptorglobuline spricht für die Anwesenheit eines „zusätzlichen“, variantenspezifischen Liganden. Hingegen werden lymphoide Progenitorzellen unterstützende Stromazellen von Rg3 und Rg10 mit der gleichen Intensität markiert. Gleiches gilt, wenn auch in viel geringerer Intensität, für die myeloische Progenitorzellen unterstützende MS5 Zellen. Die in frischem Knochenmark um 10 % „intensivere“ Bindung von Rg3 gegenüber Rg10 erfolgt somit wahrscheinlich an nicht adhärenente Progenitorzellen. Die bevorzugte Bindung von Rg3 an die Mausmakrophagenzelllinie J774 ließ sich durch die Färbung von Peritonealmakrophagen (Balb/c ) nicht bestätigen. Ungewöhnlich ist ebenfalls die im Vergleich zu frisch isolierten murinen T-Lymphozyten starke Bindung an die T-Zelllinie IP12-7. Da wie bereits beschrieben eine störende Interferenz durch CD44 mittels der CD44 negativen SAT Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurden diese Zellen für die Suche nach variantenspezifischen Liganden gewählt. Eine Membranpräparation von SAT Zellen wurde im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine pvdf-Membran übertragen und mit den biotinylierten Rg's gefärbt. Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung der  $\kappa$ -leichten Kette diente ein ebenfalls biotinylierter B5.5 mAk, der ebenfalls eine solche Kette trägt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 35 zu sehen. Man erkennt deutlich eine Bande im Bereich von 105 kd, welche Rg3 spezifisch zu sein scheint. Das ebenfalls abgebildete Coomassie gefärbte Gel beweist, dass nicht unspezifisch die prominentesten Banden gefärbt wurden. Auf der Höhe von 105 kd ist im Coomassie-Gel nur eine schwache Bande zu sehen. Aufgrund der aufwendigen Herstellung reiner Rezeptorglobuline war es zeitlich nicht möglich, eine ausreichend große Menge dieses CD44v3-Liganden zu präzipitieren und massenspektrometrisch zu identifizieren.

### Immunfluoreszenzmarkierung der Mausmakrophagenzelllinie J774 mit biotinylierten CD44-Rezeptorglobulinen



### Immunfluoreszenz muriner Zelltypen und Zelllinien mit den CD44-Rezeptorglobulinen Rgs, Rg3 und Rg10

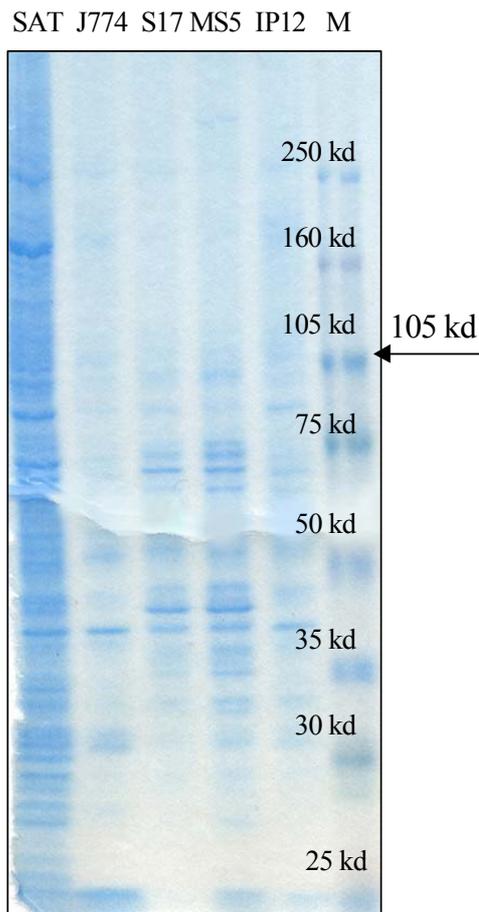
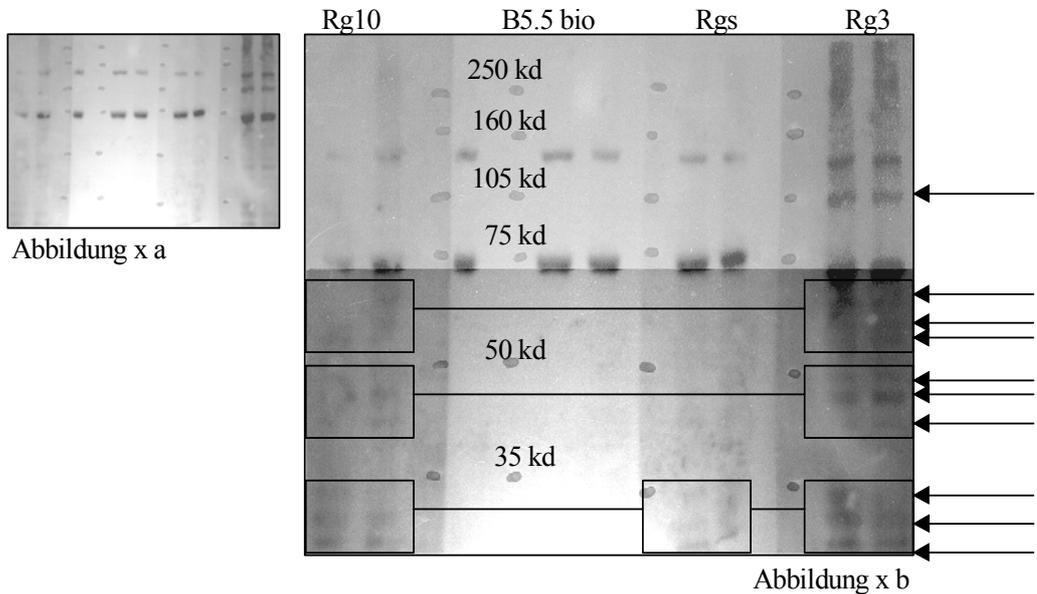


	Rgs	Rg3	Rg10
BM	17,8	44,86	35,7
S17	7	25	25
MS5	0	5	5
W.h. Stroma	5,5	14	11
Dex. Stroma	2,6	8	5
J774	11	53	26
Peritonealm.	36	74	94
IP12	10	50	20
SAT	8,9	27,3	13,8
BMdDC	4	10	4

**Abbildung 34**

**Immunfluoreszenz:** Vergleichende Immunfluoreszenz mit den biotinylierten Rezeptorglobulinen Rgs, Rg3 und Rg10 auf murinen Zellpopulationen und Zelllinien

Vergleich prominenter Banden einer SAT-Zell Membranfraktion nach Coomassie Färbung und Immunoblotting mit den CD44-Rezeptorglobulinen Rg3, Rg3 und Rg10



Die Membranfraktion der Zelllinie SAT wurde in Laemmly-Puffer aufgenommen und einer SDS-Gelelektrophorese (8 %) unterworfen. Die Proteine wurden auf eine PvDF-Membran transferiert und mit den angezeigten biotinylierten CD44-Rezeptorglobulinen gefolgt von Streptavidin MPOD gefärbt. Unbearbeiteter Scan: Abbildung a; Digital bearbeitet, Abbildung b. Alle Banden sind auf dem Original deutlich zu erkennen.

Die Membranfraktion der verschiedenen Zelllinien wurde direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen und einer SDS-Gel-elektrophorese (Gradientengel 5 – 15 %) unterworfen. Anschließend wurde mit Coomassie Brilliantblau gefärbt.

**Abbildung 35**

#### 4.5 Die Identifizierung von Osteopontin als einen spezifischen Liganden von CD44v10.

Bei der Suche nach löslichen Liganden habe ich mich auf Osteopontin als einen bereits definierten Liganden von CD44 beschränkt. Osteopontin wurde mehrfach als Ligand für CD44 beschrieben. Nicht eindeutig geklärt war, ob es an CD44s oder CD44v6-10 bindet.

Da sich die Rezeptorglobuline Rg3, Rgs und Rg10 als korrekt gefaltet und somit nativ erwiesen hatten, konnte ihre Bindung an rekombinantes Osteopontin im ELISA überprüft werden (Abbildung 37).

Das Ergebnis war eindeutig. Lediglich Rg10 war in der Lage Osteopontin zu binden. Rg3 und Rgs hingegen nicht.

#### Von den getesteten Rezeptorglobulinen zeigt lediglich Rg10 eine spezifische Bindung an Osteopontin

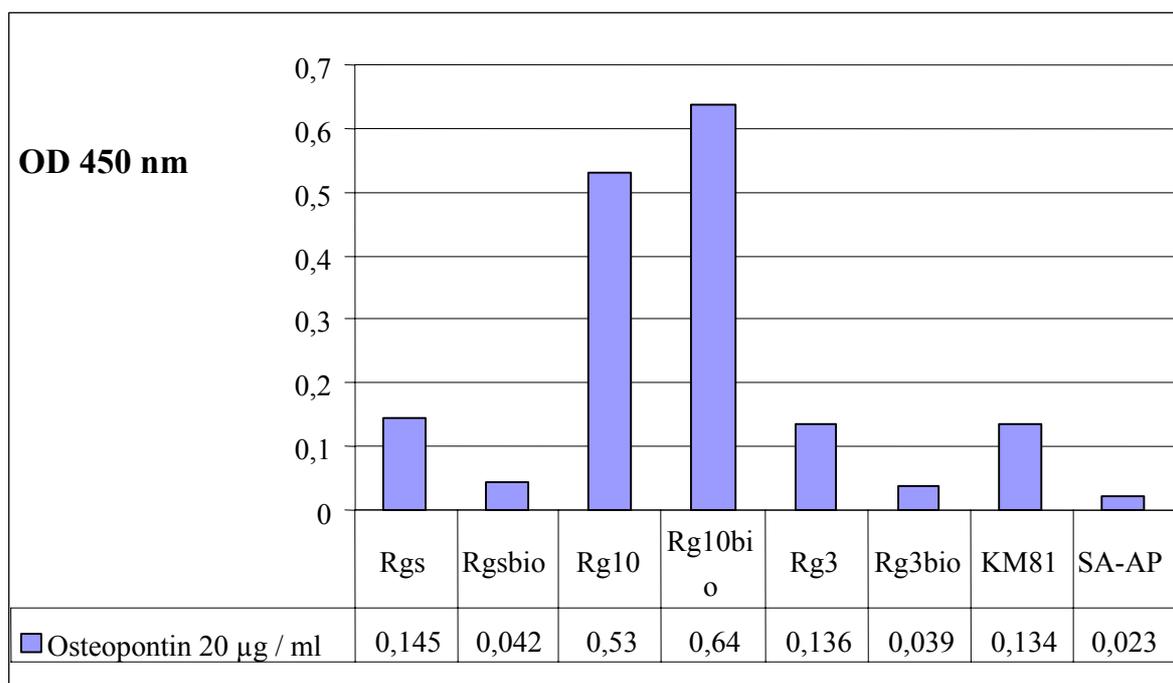


Abbildung 37

## IV. Diskussion

Betrachtet man die Zelle als elementaren Baustein biologischer Systeme, wird deutlich, dass der Aufbau einer größeren Einheit mit übergeordneter Funktion, eine definierte Orientierung der einzelnen Bausteine zueinander und zu ihrer unmittelbaren Umgebung verlangt. Die Funktion einer solchen übergeordneten Einheit, eines Gewebes oder eines Organs bedingt seine Form. Ob einzelne Zellen eingebettet in eine Matrix wie beim Knorpel, in enger Nachbarschaft zueinander wie bei Epithelien oder frei beweglich wie Lymphozyten im Blutstrom, nur eine geringe Anzahl unterschiedlicher s.g. Adhäsionsmoleküle vermittelt den dauerhaften oder zeitweisen Kontakt von Zellen untereinander. CD44 ist ein solches Adhäsionsmolekül, womit seine physiologische Hauptaufgabe bereits festgelegt ist.

Dieser elementaren Aufgabe entspricht auch seine ubiquitäre Verbreitung. Einerseits nahezu allgegenwärtig zu sein, andererseits jedoch eine Vielzahl von Funktionen auszuführen, verlangt eine große Variabilität der Struktur. Neben Unterschieden in N- und O-Glycosilierungen kann alternatives Spleißen von zehn varianten Exons im Falle von CD44 zu theoretisch mehr als 1000 verschiedenen Isoformen führen. Die große Menge von Funktionen mit der An- bzw. Abwesenheit verschiedener alternativ gespleißter Exons zu erklären, drängt sich somit förmlich auf. Das Interesse an den verschiedenen CD44 Varianten fand seinen ersten Höhepunkt 1991 in der Feststellung, dass eine nicht metastasierende Rattentumorzelllinie nach erfolgreicher Transfektion mit CD44v4-7 Lymphknoten-Metastasen erzeugte und dass sich dieses Tumorwachstum durch die Gabe von anti-CD44v6-Antikörpern unterdrücken ließ (88). Für die nächsten sechs bis acht Jahre war die Richtung der Forschung, die Varianten von CD44 betreffend, damit festgelegt. Eine große Anzahl teils widersprüchlicher Veröffentlichungen versuchte, mit Hilfe von Immunhistologie, durchflußzytometrischen Screenings und RT-PCR CD44-Varianten als prognostische Faktoren für die verschiedensten Krebsarten zu etablieren. Für einige Tumorarten konnte in der Tat eine Korrelation zwischen der Expression bestimmter CD44v Isoformen und der Metastasierungstendenz erstellt werden (140). Bei anderen Tumoren war dies nicht der Fall oder es wurde eine negative Korrelation beobachtet. Bei einer weiteren Gruppe von Tumoren

erscheint das Expressionsprofil der CD44 Standardform als ein wesentlicher Parameter. Robert Stern fand 2001 eine Abhängigkeit der CD44-Varianten Expression von der Hyaluronsäure Konzentration in der Umgebung der Zelle; ein Befund, der einige der unterschiedlichen Ergebnisse auf diesem Gebiet erklärt (80). Auch die Standardform von CD44 unterliegt großen posttranslationalen Modifikationen (25). Die N-Glycosilierung nimmt starken Einfluss auf die Bindung von Hyaluronan (39 - 44). Die O-Glycosilierung mit Molekülen wie z.B. Chondrotinsulfat, beeinflusst die Bindung an Fibrin und Fibronectin (40, 50 - 53). Die Standardform selbst ist an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt, weshalb die Expression varianter Isoformen unter physiologischen Bedingungen lange Zeit nur wenig Beachtung fand. Im Rahmen meiner Arbeit habe ich mich ausschließlich mit physiologischen Funktionen varianter CD44 Isoformen befasst. Ich hatte einleitend erwähnt, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen eine Basisvoraussetzung für die Entwicklung mehrzelliger Organismen darstellt. Von besonderem Interesse ist hierbei das hämatopoetische System, da seine Zellen zwischen einem sessilen und mobilen Zustand wechseln. Man muss davon ausgehen, dass die gleiche hämatopoetische Zelle in Abhängigkeit von ihrem Aktivitätszustand unterschiedliche Adhäsionsmoleküle exprimiert. Zu zeigen, dass und inwieweit dies für variante CD44 Isoformen zutrifft, war eines der Ziele meiner Arbeit.

### **Alternatives Spleißen als Grundlage funktioneller Vielfalt**

Auf den scheinbaren Widerspruch ubiquitärer Expression und funktioneller Vielfalt habe ich bereits einleitend hingewiesen. Um unterschiedliche Aufgaben erfüllen zu können, muss ein Molekül in der Lage sein, mit einer Vielzahl von Partnern zu interagieren. Möglich ist eine durch die Bindung unterschiedlicher extrazellulärer Liganden ausgelöste Konformationsänderung eines Rezeptors, welche ihn in die Lage versetzt, verschiedene intrazelluläre Partner zu binden. Diese Möglichkeit allein führt allerdings nur zu einer eingeschränkten Variabilität. Eine Änderung des Standardproteins durch alternatives Spleißen, potenziert die Möglichkeit verschiedene Liganden zu binden. Grundsätzlich können durch alternatives Spleißen entstandene Varianten die Funktionen der Standardform auf vier verschiedene Arten beeinflussen.

**Passiv:**

1. Die N-terminal gelegene Hyaluronanbindungsstelle wird durch das Einfügen zusätzlicher Aminosäuren in den extrazellulären Teil von CD44 über die Glycocalix der Zelle hinausgehoben, was eine Bindung an den Liganden erleichtert.
2. Das Einfügen zusätzlicher Aminosäuren (einer oder mehrerer varianter Exons) in das Standardmolekül führt über eine Konformationsänderung in der Tertiärstruktur zur Entstehung neuer Bindungsstellen für zusätzliche Liganden, in- bzw. extrazellulär.

**Aktiv:**

3. Posttranslationale Modifikationen (N- und O-Glycosylierungen) der eingefügten Varianten, z.B. die Addition von Chondroitinsulfat, sorgen für das Entstehen neuer Bindungsstellen.
4. Das eingefügte Peptid selbst stellt einen Rezeptor bzw. Liganden für einen löslichen oder oberflächengebundenen Bindungspartner da.

Existiert eine Kopplung von Funktion und An- bzw. Abwesenheit von Varianten, so sollten:

- Varianten bzw. Variantenkombinationen mit verschiedenen Zelltypen und / oder Aktivierungsstadien einer Zelle assoziiert sein.
- Möglichkeiten bestehen mit variantenspezifischen Antikörpern die Ligandenbindung zu simulieren bzw. zu blockieren (Sofern eine aktive Beeinflussung der Funktion besteht, wie unter Punkt 3 und 4 beschrieben).
- Die Expression oberflächenständiger variantenspezifischer Liganden, mit entsprechenden Fusionsproteinen, durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können.
- Die Anwesenheit löslicher, variantenspezifischer Liganden, im Serum oder Kulturüberstand, durch Auftrennung im SDS-Gel und anschließendem Immunoblotting mit den entsprechenden Fusionsproteinen nachweisbar sein, bzw. Ihre Bindung an CD44-Varianten in Kultur durch einen Überschuss an "löslichen" Fusionsproteinen blockiert werden können.

## **Verteilung varianter CD44-Isoformen im murinen System**

Die von den varianten Exons drei und zehn codierten Peptide stellen aufgrund ihrer Größe (die Variante 10 ist annähernd doppelt so groß wie alle anderen Varianten) und ihrer starken posttranslationalen Modifikation (ausschließlich die Variante 3 trägt mit einer Heparin-Sulfat-Seitenkette eine Bindungsstelle für eine Reihe von Wachstumsfaktoren; Einleitung, Tabelle 1) die aussichtsreichsten Kandidaten für die Suche nach varianten-spezifischen Funktionen dar.

Ein durchflußzytometrisches Screening muriner Zelllinien (Abb. 3, und 4) sowie unterschiedlicher hämatopoetischer (Balb/c)-Zellpopulationen (Abb. 5 und 6), ergab deutliche Unterschiede in der Expression der Varianten drei, sieben und zehn. Während die Varianten drei und sieben bevorzugt auf Zellen exprimiert werden welche die Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen, wie B-Zellen und Makrophagen, ist die Expression der Variante zehn weniger stark mit bestimmten Zelltypen assoziiert. Die prominentesten Vertreter von CD44-Isoformen, welche die Varianten drei, sieben oder zehn enthalten, sind CD44-Meta-1 (4-7), CD44E (8-10), CD44R2 (10) sowie die namenlosen Isoformen CD44-3,8-10 bzw. CD44-3-10. Wenngleich im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine detaillierte Untersuchung der jeweiligen CD44-Isoformen durchgeführt wurde, kann doch davon ausgegangen werden, dass die stärkere Expression von v10 im Vergleich zu v3 auf der T-Zelllinie IP12-7 Zellen sich durch die Expression kein v3 enthaltender Isoformen wie CD44E und CD45R2 erklärt.

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung hingegen wies die konstitutive Expression und einen Anstieg von CD44v3 nach T-Zell Stimulierung mittels PMA oder CD3 / IL-2 nach. Wohingegen in unserem Labor die Stimulierung von murinen T- und B-Zellen mit Con A bzw. LPS ohne Einfluß auf die CD44v3 Expression der Zellen blieb. Die überzeugendsten Ergebnisse der Arbeit, z.B. der durch RT-PCR und Western-Blot nachgewiesene starke Anstieg der Expression nach Stimulation, wurden jedoch mit den Zelllinien MOLT4 und CCRR-CEM und nicht mit peripheren T-Zellen erlangt (141.), so dass ein zelllinienspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann.

Die auf Makrophagen und Stromazellen festgestellte, stärkere Expression von v3 hingegen verlangt eine v3 enthaltende, v10 negative Isoform von CD44. Die distinkte Verteilung der Varianten im murinem System, eine grundlegende Voraussetzung für variantenspezifische Funktionen, hat sich somit bestätigt.

### **Einfluss verschiedener anti-CD44s/v-Antikörper auf murine hämatopoetische Zellen unterschiedlicher Reifestadien in vitro**

Um zu überprüfen, ob die festgestellte distinkte Verteilung der CD44 Isoformen mit einer ebenso distinkten Verteilung der Funktionen einhergeht, sollte der Einfluss CD44-Varianten

bzw. Standard spezifischer mAk auf unterschiedliche Zellpopulationen untersucht werden. Die murine Stromazelllinie S17 wurde mit einer mehr als fünffachen Intensität von PtS33 erkannt als die ebenfalls getestete Stromalinie MS5 (Abb.4). S17 unterstützt die Entwicklung von B-Zellvorläufern, wohingegen auf MS5 kultivierte Knochenmarkzellen von Mäusen, sich zu myeloiden Vorläufern entwickeln. Whittlock-Wite-Langzeitkulturen unterstützen ebenfalls die Entwicklung von B-Zell-Vorläufern. Kulturen dieses Typ's bieten sich daher als interessantes System für die Testung der Beeinflussbarkeit der Hämatopoese durch anti-CD44s/v-mAk.

Die Bindung eines monovalenten Liganden kann durch einfache Antikörperbindung, die eines polyvalenten durch anschließende Kreuzvernetzung mittels Zweitantikörper, simuliert werden. Voraussetzung ist jedoch, dass der betreffende Antikörper ein relevantes (in Bezug auf die Signaltransduktion z.B.) Epitop erkennt.

Eindeutig waren die Ergebnisse, was den Einfluss auf die Entwicklung von Langzeitknochenmarkkulturen des Whitlock-Witte Typs anging (Abb.7 und 8). Die Addition des Anti-Standard Antikörpers KM81 führte zu einer steten Abnahme der Anzahl lebender Zellen insgesamt und damit auch der Vorläuferzellen sowie zu einer Abnahme der CD44s Expression durch Internalisation oder „Shedding“. Die Gabe von PtS zum Kulturmedium hingegen hatte einen starken Anstieg der B-Zell-Vorläufer in der Kultur sowie eine erhöhte CD44v3 Expression zur Folge. Die Zunahme der B-Zell-Vorläufer spiegelt sich in einer verstärkten B-220 und Sca-1 Expression wider, welche charakteristisch für frühe B-Zellen ist. Sowohl die Expression von LFA-1 als auch seiner Liganden ICAM-1 und ICAM-2 ist in beiden Fällen reduziert. Die Entwicklung von B-Zellvorläufern zu B-Zellen verlangt den Kontakt zur Stromazellschicht. Ist dieser nicht möglich, arretieren die B-Zellen in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung (Pro-B-Zellen) (142). KM81 erkennt die Hyaluronanbindungsstelle von CD44, hierdurch wird eine Bindung verhindert, was zu einem schnelleren Absterben der Knochenmarkszellen in Langzeitkulturen führt (143). Eine Zunahme früher B-Zellstadien ist daher nicht zu beobachten. Die Unterschiede in der Wirkung des anti-CD44s Antikörpers und des anti-CD44v3 mAk PtS33 zeigen deutlich die Relevanz der Variante 3 für physiologische Reifungsprozesse in der Hämatopoese.

Der beschriebene Effekt, die Zunahme von B-Zell-Vorläufern in der Langzeitkultur als Reaktion auf die Gabe von anti-CD44-v3 Antikörpern, ist nur die „sichtbare“ Folge einer

Reihe von Ereignissen wie sie nach der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor ablaufen. Wichtiges Mittel zur Kommunikation von Zellen untereinander (parakrin) bzw. mit sich selbst (autokrin) sind Zytokine. Die Bindung von CD154 and CD40 auf dendritischen Zellen führt z.B. zu einer verstärkten Expression von IL-12 Rezeptoren auf der eigenen und der Oberfläche von benachbarten dendritischen Zellen. Die ebenfalls gesteigerte Expression der Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$  führt zur verstärkten Expression von MHC I und II und bereitet die Zelle somit auf ihre Hauptaufgabe, die Antigenpräsentation, vor. Basierend auf diesen Überlegungen sollte die Frage beantwortet werden, wie sich eine Kreuzvernetzung durch anti-CD44s-mAk verglichen mit der durch PtS herbeigeführten auf die Zytokinproduktion verschiedener CD44v3 exprimierender Zellen auswirkt.

Während PtS ausschließlich die "v3-haltigen" Isoformen von CD44 miteinander vernetzt, verbindet ein anti-CD44s mAk alle Isoformen, einschließlich der die Variante 3 enthaltenden. Nach Quervernetzung von CD44s/v3 war auf frisch isolierten Knochenmark- oder Milzzellen im Bezug auf die Zytokinproduktion (Abb. 14A) kein Unterschied festzustellen. Auf reifen murinen Dendriten hingegen zeigte sich ein überproportional starker Anstieg der TH1 Zytokine IFN und IL-12 und ein starker Rückgang der IL-10 Expression durch Kreuzvernetzung mit PtS verglichen mit der durch KM81 induzierten. Ebenso v3-spezifisch wie der Einfluss auf die Zytokinproduktion war der beobachtete starke Rückgang der LFA-1 Expression (Abb. 14 B). Während die Kreuzvernetzung durch KM81 einen leichten Anstieg der LFA-Expression zur Folge hatte, ging sie durch die Wirkung von PtS auf ein Viertel im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, zurück.

Dies war neben dem registriertem Rückgang der LFA-1 Expression in der Whittlockkultur, der zweite Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Expression und Funktionen von CD44v3 und dem Lymphozytenintegrin.

### **LFA-1: Ein Steckbrief:**

LFA-1, ein Dimer aus CD11a ( $\alpha$ -L Integrin) und CD18 ( $\beta$ -2 Integrin), erfüllt eine Reihe von Funktionen. Die Vermittlung von Zell-Zell Kontakten z.B. zwischen T-Helfer- und B-Zelle, bei dem ZTL- oder NK-vermitteltem Abtöten von Tumorzellen oder Lymphozyten, sowie bei der Adhäsion und Extravasation von Leukozyten an / durch Endothelien, sind LFA-1 abhängige Zellfunktionen. Liganden von LFA-1 sind ICAM1 (CD54) ICAM3 (CD102) und

ICAM3 (CD50). LFA-1 tritt, wie die übrigen Integrine auch, in drei Aktivierungsstadien auf, basal-affin, niedrigaffin und hochaffin. Zweiwertige Ionen wie Magnesium und Mangan führen zu einer Aktivierung von Integrinen, die durch Calcium-Ionen wieder aufgehoben werden kann. Chemokine wie MCP-1 oder IL-8, die als Folge der losen selektin-vermittelten Bindung an Endothelien ausgeschüttet werden, führen zu einer Konformationsänderung von LFA-1, welche eine feste Adhäsion mit darauffolgender Extravasation von Leukozyten ans Endothel erst ermöglicht.

CD44v3 ist in der Lage, IL-8 über seine Heparinsulfat-Seitenkette zu binden (Tabelle 1). In der Langzeitkultur führte die Addition von antiCD44v3-Antikörpern zu einer verstärkten Expression von CD44v3. CD44v3 gebundenes IL-8 könnte fehlen, um die Konformationsänderung im LFA-1 Molekül zu bewirken, die eine feste Bindung von LFA-1 an seine Liganden ermöglicht und auf diesem Wege ebenfalls eine feste Bindung der Vorläuferzellen an das Stroma erschweren.

## **Variantenspezifische Liganden: Ihre Existenz und Verteilung im murinem System**

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Vernetzung unterschiedlicher Isoformen von CD44 divergierend die Zytokinproduktion sowie die Expression von LFA-1 beeinflusst. Die Bindung von KM81 an sein Epitop, die Hyaluronanbindungsstelle, ist in allen Fällen gleich stark. Die Beeinflussung der Affinität des Standardmoleküls zu einem Liganden durch die Addition von Varianten, wie für Hyaluronsäure beschrieben, (82) ist somit keine befriedigende Erklärung. Denkbar wäre ein abgestuftes Signal über die Bindung polyvalenter variantenspezifischer Liganden an ein einzelnes, mehrere Varianten enthaltendes, CD44 Molekül wie z.B. CD44 v3-10 , v1-10 oder v4-7. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die Bindung spezifischer Liganden an verschiedene Varianten enthaltende CD44 Moleküle auf einer Zelle Signale vermittelt, die entweder unabhängig von der über CD44s-HA induzierten Signalen sind oder diese verstärken oder blockieren. Die Existenz variantenspezifischer Liganden ist in beiden Modellen unabdingbare Voraussetzung. Die von mir eingesetzten Fusionsproteine bestehen aus dem extrazellulären Teil von CD44s, CD44v3 und CD44v10 und der Kappa-leichten-Kette murinen IgG's. Aufgrund der eukariontischen Expression und der damit gegebenen natürlichen Faltung und Glykosylierung erschienen sie für die Suche

nach solchen Liganden optimal geeignet. Da der Standardteil allen dreien gemeinsam ist, werden alle Standard-Liganden auch von jedem der drei Fusionsproteine erkannt. Verstärkte Bindung eines der varianten Rezeptorglobuline im Vergleich zum Standard weist also auf die Existenz eines variantenspezifischen Liganden, oder auf eine Optimierung der Zugänglichkeit einer Bindungsstelle im Standardteil des Moleküls hin. Für ein durchflusszytometrisches Screening wurden biotinylierte Rezeptorglobuline eingesetzt welche sich mit PE-konjugiertem Streptavidin nachweisen ließen. Um die Verteilung der Liganden Expression für CD44s mit der von CD44-Varianten vergleichen zu können, wurden folgende hämatopoetischen Zellpopulationen bzw. Zelllinien untersucht: Knochenmarkzellen, frisch präpariert und aus Langzeitkulturen, aus Knochenmarkzellen generierte dendritische Zellen, reife T-, B-Zellen und Monozyten aus der Milz, sowie Makrophagen aus der Bauchhöhle von Balb/c Mäusen sowie die Stromazelllinien S17 und MS5, sowie die Makrophagenzelllinie J774 die T-Zelllinie IP12-7 und last but not least die Adenokarzinomlinie SAT (Stockholm Adenokarzinom Tumorzelllinie), die konstitutiv kein CD44 exprimiert. Es ergab sich eine verstärkte Bindung für beide varianten Isoformen verglichen mit dem Standard auf allen getesteten Zellen (Abb. 34). Beide getesteten Varianten (v3 und v10) kommen auf allen getesteten Zelltypen, wenn auch mit starken Unterschieden in der Intensität, gemeinsam vor. Vergleicht man die Bindung der Rezeptorglobuline mit der der variantenspezifischen Antikörper, stellt man fest, dass Rezeptor und potentieller Ligand stets auf denselben Zellen und in ähnlicher Intensität exprimiert werden. Eine Ausnahme bildet die Variante 10. Während IP12-7 Zellen CD44v10 mit hoher Intensität exprimieren, werden dieselben Zellen von dem Fusionsprotein in sehr viel geringerem Ausmaß erkannt. Für Peritonealmakrophagen gilt dasselbe, nur mit umgekehrten Vorzeichen. Um aus diesen Indizienbeweisen für die Anwesenheit variantenspezifischer Liganden einen definitiven Nachweis zu machen, wurden folgende Strategien verfolgt.

1. Variantenspezifische Liganden sollten fest genug binden, um unter sanften Lysebedingungen mit der entsprechenden Variante durch einen variantenspezifischen mAk kopräzipitiert zu werden.
2. Gebundene Variantenspezifische Liganden sollten nach SDS-gelelektrophoretischer Aufreinigung von Membranfraktionen im Immunoblot durch die entsprechenden Rezeptorglobuline als spezifische Bande erkannt werden.

3. Für bereits beschriebene Liganden mehrere Varianten enthaltender Isoformen von CD44 wäre eine genaue Zuordnung zu einer einzelnen Variante durch Bindungsstudien mit den drei Rezeptorglobulinen möglich.

### **Osteopontin: Vom CD44s zum v10 Liganden**

Für die dritte Variante eignete sich das für die Isoform CD44-6-10 als Ligand beschriebene Osteopontin (OPN) (84). ELISA Bindungsstudien mit rekombinantem Osteopontin und den verschiedenen Rezeptorglobulinen wiesen die Variante 10 eindeutig als Bindungspartner von Osteopontin aus (Abb.37). Osteopontin wird von Con A aktivierten T-Zellen ebenso exprimiert wie von aktivierten Makrophagen und NK-Zellen.

Osteopontin wirkt als Chemoattraktant für humane und murine T-Zellen und Makrophagen. Über ein RGD-Motif (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) ist es in der Lage, Integrine ( $\alpha$ -v/ $\beta$ -3), bestehend aus CD51 und CD61, zu binden und spielt somit eine Rolle bei der Adhäsion von T-Zellen und Makrophagen an Endothelien und der folgenden Extravasation. Makrophagen sezernieren unter OPN Einfluß größere Mengen IL-12 (TH1) und verringern die Ausschüttung des TH2-Zytokins IL-10. Es wäre denkbar, dass CD44v10 als Fängermolekül für Osteopontin fungiert so dass gebundenes Osteopontin RGD-abhängig, aktivierten T- und B-Zellen sowie Tumorzellen, Makrophagen und Endothelien (sie alle exprimieren  $\alpha$ -v /  $\beta$ -3 Integrine) präsentiert wird.

Der anti-Standard-Antikörper KM81 interferiert mit der Bindung von Osteopontin und führt zu einer verstärkten Expression des TH2-Zytokins IL-10 trotz Gegenwart von Osteopontin.

Für den Anti-CD44v10 mAk K926, ist beschrieben dass er ebenfalls mit der TH1 vermittelten Immunantwort des verzögerten Typs interferiert (Rösel 1997; Seiter 1999). Die Verhinderung der Infiltration während einer DNFB-induzierten Reaktion vom verzögerten Typ sowie die Abnahme von TH1 Zellen ließen sich durch Blockade der OPN-Bindungsstellen auf T-Zellen und Makrophagen erklären. Migrationsversuche mit Con A aktivierten T-Zellen sowie die IL-10 Produktion LPS-aktivierter Makrophagen, in Gegenwart und Abwesenheit von anti-CD44v10 mAk und Rg10 und/oder kompetierenden RGD-Peptiden, könnten helfen, dieses Modell zu verifizieren.

## Die Suche nach neuen Liganden

Für die unter 2. beschriebene Methode der Markierung spezifischer Proteine im Immunoblot mittels biotinylierter CD44-Rezeptorglobuline, wurde neben anderen murinen Zelllinien auch die CD44 negative Zelllinie SAT (Stockholm Adeno Tumor) verwendet. Eine homomere Bindung zweier CD44 Moleküle konnte bei der Verwendung von SAT-Lysaten also ausgeschlossen werden. Wie auf Abbildung 35b deutlich zu erkennen, bindet das Rezeptorglobulin-3 spezifisch ein Protein von etwa 105 kD Größe. Die bereits beschriebenen, an die Heparinsulfatseitenkette bindenden Wachstumsfaktoren (Tabelle 1. Einleitung) haben eine Größe von 70 kD (HGF), 16-18 kD (FGF) und nur ca. 6 kD (EGF), so dass wir von einem noch nicht definierten Liganden von CD44v3 ausgehen. Die Art der Präparation (es wurde eine angereicherte Membranfraktion ohne Zytoplasma oder Kernanteil verwendet) spricht ebenfalls gegen einen löslichen (oder intrazellulären) Liganden. Andere bekannte Liganden v3-haltiger Isoformen wie Ankyrin mit 440 kD, oder das erst kürzlich als v3-Ligand beschriebene Her2neu (144) mit seinen 185 kD kommen ebenfalls nicht in Frage.

Über an CnBr-Sepharose gekoppeltes Rg3 könnte aus einer entsprechend großen Menge an SAT-Zellen eine ausreichende Menge des Liganden angereichert werden, um eine Identifikation zu ermöglichen.

Auch die Präzipitationsversuche mit den beiden anti-Standard-Antikörpern IM-7 und KM81 mit PtS und einem anti-CD44v3-Kaninchenserum führten zu interessanten Ergebnissen.

Alle Antikörper / Seren präzipitierten auf J774-Makrophagen und IP12-7 T-Zellen ein Protein von ca. 180 kD Größe (Abb. 28). Auf IP-12 Zellen wird das Protein ebenfalls, wenn auch nur schwach, von einem anti-CD3-Antikörper Kopräzipitiert und von einem biotinylierten IM-7 mAk im Blot erkannt (Abb.28 D). Für die murine Isoform CD44v3,8-10, ein Molekül von 180 kd, ist eine Bindung an die Zeta-Kette von CD3 beschrieben (102). Es spricht somit einiges dafür, dass es sich bei dem präzipitiertem Protein um eben dieses CD44v3,8-10 handelt.

## Die Verbindung zwischen LFA-1 und CD44vX ist indirekter Natur

Der anti-CD18 Antikörper M17/5.2 wurde zunächst als Positivkontrolle auf IP-12-7 Zellen mitgeführt, da diese T-Zelllinie eine große Menge LFA-1 (CD11a/CD18) exprimiert. Es fiel

auf, dass der Antikörper neben den beiden erwarteten Banden bei 190 kD (CD11a) und 95 kD (CD18) auch ein Protein von der Größe des CD44-Standardmoleküles Ko-präzipitierte (Abb 28 b). Eine, bezogen auf die Intensität, mit der beide Moleküle auf der Oberfläche von IP-12-Zellen exprimiert werden, extrem schwache Kopräzipitation ließ sich durch die Färbung des Präzipitats mit biotinylierten IM-7 nachweisen (Abb. 28 D). Wir interpretieren die Ergebnisse in dem Sinne, dass, zumindest in Abwesenheit aktivierender Stimuli, eine direkte Assoziation zwischen LFA-1 und CD44 kaum funktionell bedeutend sein kann.

Schwerer zu interpretieren sind die mit den Transfektanten erlangten Ergebnisse im Bezug auf

LFA1 und CD44v3. Rg3, Rgs Und Rg10 binden an SAT-Zellen. Das bedeutet, dass im Unterschied zu allen anderen getesteten Zelllinien und Zelltypen, welche Liganden und Rezeptor, wenn auch in stark unterschiedlichen Intensitäten, auf einer Zelle exprimieren, auf SAT-Zellen ausschließlich ein Ligand für CD44, aber nicht der CD44-Rezeptor vorliegt. Es sei erwähnt, dass die CD44-negativen SAT-Zellen von Rg3 mit der dreifachen/doppelten Intensität verglichen mit Rgs / Rg10 in der Durchflusszytometrie erkannt werden. Im Unterschied zu allen anderen getesteten Zelllinien und Zelltypen, welche Liganden und Rezeptor, wenn auch in stark unterschiedlichen Intensitäten, auf einer Zelle exprimieren, liegt auf SAT Zellen der Ligand für CD44v3 ohne seinen Rezeptor vor (Abb.1 Diskussion). SAT Zellen sind jedoch nicht nur für CD44 negativ, sie exprimieren auch kein LFA-1. SAT Zellen stellen somit ein Interessantes Model für die Untersuchung des Einflusses von CD44 auf die LFA-1 Expression dar. Um zwischen dem Einfluss der Standardform und dem varianter Isoformen von CD44 unterscheiden zu können, wurden SAT Zellen mit CD44s sowie den Varianten 3, 6 und 7 transfiziert. SAT-Zellen wachsen in Kultur in Form einer adhärenen und einer nichtadhärenen Fraktion. Nach erfolgreicher Transfektion mit CD44s/vx wurden beide Fraktionen getrennt voneinander durchflusszytometrisch auf die Expression von CD44s/vx bzw. LFA-1 untersucht. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Die überwiegende Mehrheit der adhärenen Zellen blieb auch nach erfolgreicher Transfektion mit CD44s/vx negativ für LFA-1. Für die flotierende Fraktion erwies sich, dass jede CD44vx positive Zelle LFA-1 zu exprimieren begonnen hatte. Während alle vier getesteten Varianten (v3, v6, v7 und v10) einen vergleichbaren Effekt erzielten was die Intensität der LFA-Expression betrifft, blieb der Effekt des Standardmoleküls, trotz erfolgreicher Transfektion

auf einen minimalen Anstieg der LFA-1 Expression beschränkt. Um den „Turnover“ von Oberflächenmolekülen zu messen, macht man es sich zunutze dass die Kreuzvernetzung von Molekülen auf der Zelloberfläche zur Migration fähiger Zellen, zur Bildung von Gruppen dieser Moleküle („Patches“ oder Flecken), schließlich zur Haubenbildung („Capping“) und abschließend zu einer Internalisation sämtlicher erkannter Moleküle kommt. Grundsätzlich stehen dem Experimentator 3 Möglichkeiten zur Verfügung einen solchen Vorgang auszulösen. Befinden sich die Zielzellen in Lösung, kann durch Zugabe eines Antikörpers gegen Molekül X gefolgt von einem Anti-Anti-Körper eine Kreuzvernetzung hervorgerufen werden (Abb.1 Diskussion A). Immobilisiert man den Anti-X Antikörper auf einer Plastikoberfläche, so bindet, während sich die Zellen über diese Plastikoberfläche bewegen, („Rolling“) ein Oberflächenmolekül nach dem anderen an die unbeweglichen Ak und wird auf diese Weise durch die Bewegung der Zellen bei adhärennten Molekül vernetzt. Die dritte Möglichkeit nutzt die Eigenschaft von Antikörpern mit ihrem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren von z.B. Monozyten zu binden. Bewegt sich ein Monozyt mit einem Fc-gebundenen Antikörper an einer Zelle vorbei, welche das Antigen diesen Antikörpers exprimiert, so kann der erste Arm des Ak an sein Antigen binden und bei Bewegung der Zellen gegeneinander schließlich auch der zweite. Stellt man sich vor das ein Monozyt eine ganze Reihe von Antikörpern gebunden hat kann auf diese Art und Weise ein großer Anteil von Oberflächmolekülen miteinander vernetzt werden (Abb.1 Diskussion C) . Gibt man den anti-X Antikörper ohne solche „akzessorischen“ (Fc-Rezeptor tragenden) Zellen zu sein Antigen exprimierenden Zellen, kann dieser wohl sein Epitop binden, nicht jedoch vernetzen (Abb.1 Diskussion D). Ebenso ist zwischen zwei nebeneinander liegenden adhärennten Zellen nur ein einfacher Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand, jedoch keine Vernetzung des einen durch den anderen möglich.

Die Tatsache, dass sich die beobachtete LFA-1 Expression auf CD44vX SAT-Transfektanten auf nicht adhärennte Zellen beschränkt, spricht also gegen eine Beteiligung löslicher Faktoren und für die Notwendigkeit eines Zell-Zell Kontaktes.

Liegt einer der beiden Partner hingegen in löslicher Form vor, besteht die Möglichkeit einer monovalenten Ligand-Rezeptor-Bindung ohne Kreuzvernetzung (Abb. 1 B / D). Ag 8 Zellen exprimieren zwar CD44s aber kein v3, im Gegensatz zu SAT-Zellen jedoch einen geringen Prozentsatz LFA-1. Ag8-Transfektanten, welche das Rezeptorglobulin Rg3 exprimieren und

es anschließend sezernieren, reagieren ebenso wie SAT-Transfektanten mit einem Anstieg der LFA-1 Produktion. Untransfizierte Ag8 hingegen, welche in Rg3 supplementiertem Medium wachsen, reagieren mit einer messbaren Abnahme der LFA-1-Expression. Wie es scheint, führt die Kreuzvernetzung von Ligand oder Rezeptor zu einem Anstieg, die einfache Bindung des einen an den anderen jedoch zu einer Abnahme der LFA-1 Expression. Die dauerhafte Sekretion des Rezeptorglobulins Rg3 von Ag8 Rg3-Transfektanten könnte bedeuten, dass die Fusionsproteine während des Ausschleusens aus der Zelle ihren Liganden auf Nachbarzellen binden und noch mit den sie exprimierenden Zellen verbunden sind. Die Herstellung stabiler Ag8 CD44v3 Transfektanten stellt somit einen logischen nächsten Schritt dar. Auf diesen Transfektanten sollte ein noch weitaus stärkerer Anstieg der LFA-1 Expression zu beobachten sein wenn der zugrunde gelegte Mechanismus der Kreuzvernetzung zutreffend ist.

Die Ergebnisse in Ihrer Gesamtheit zeigen, dass die Expression einzelner CD44-Varianten eine Reihe unterschiedlicher physiologischer Vorgänge unterschiedlich beeinflussen können. Stellt man sich die CD44 Varianten als ein System von Signalgebern vor, deren Effekte sich gegenseitig verstärken oder aufheben können, wird klar, warum der vollständige Verlust jeglicher CD44 Expression bei Knock-Out Tieren nahezu folgenlos bleibt (145). Das Ausknocken einzelner Varianten oder Gruppen von Varianten, welche zur Erfüllung bestimmter Aufgaben zusammenwirken, sollte weitaus sichtbarere Folgen haben. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, bestärken die Annahme physiologischer Expression und Funktion von varianten CD44-Isoformen. Der kombinierte Einsatz von Antikörpern, Rezeptorglobulinen und stabilen eukariotischen Transfektanten, haben sich als geeignete Werkzeuge erwiesen um das Funktionsprinzip von CD44s, CD44v3 und CD44v10 weiter zu entschlüsseln. Besonders der in dieser Arbeit wiederholt aufgezeigte Zusammenhang der CD44v3 und LFA-1 Expression verdient es, weiter evaluiert zu werden. Das Homing von Lymphozyten, die Infiltration in Entzündungsherde ebenso wie die zur Metastasierung notwendige Adhäsion und Extravasation von Tumorzellen an Endothelien sind potentielle Ziele einer solchen v3-LFA-1 Interaktion. Eine CD44v3 Knock-Out-Maus wäre sicher ein lohnendes Forschungsobjekt.

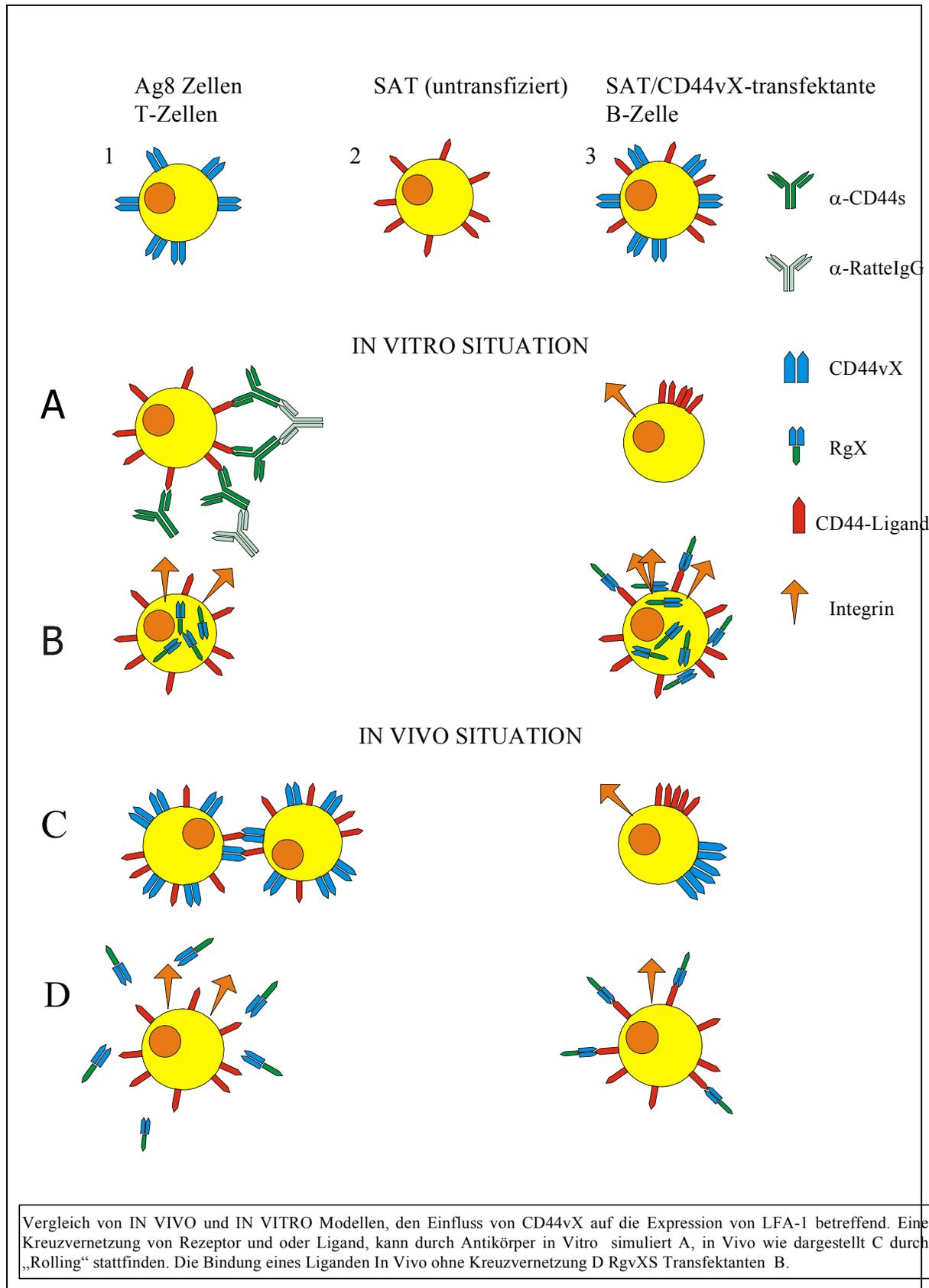


Abbildung 1

**1. Dalchau- -J; R; Kirkley Fabre-JW**

Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane Glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C)antigen of the rat.  
Eur-J-Immunol. 1980; Oct; 10(10): 737-44

**2. Hughes-EN; Colombatti-A; August-JT**

Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp-1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells  
J-Biol-Chem. 1983; Jan 25; 258(2): 1014-21

**3. Carter-WG; Wayner-EA**

Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells.  
J-Biol-Chem. 1988; Mar 25; 263(9): 4193-201

**4. Gallatin-WM; Wayner-EA; Hoffman-PA; St.-John-T; Butcher-EC; Carter-WG**

Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1989; Jun; 86(12): 4654-8

**5. Goldstein-LA; Zhou-DF; Picker-LJ; Minty-CN; Bargatze-RF; Ding-JF; Butcher-EC**

A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins.  
Cell. 1989; Mar 24; 56(6): 1063-72

**6. Haynes-BF; Liao-HX; Patton-KL**

The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms.  
Cancer-Cells. 1991; Sep; 3(9): 347-50

**7. Jalkanen-S; Jalkanen-M**

Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin  
J.cell Biol. 1992; 116, pp 817-25

**8. Haynes-BF; Telen-MJ; Male LP; Denning-SM**

CD44 a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell Activation [published erratum appears in Immunol Today 1990 Mar;11(3):80]  
Immunol-Today. 1989; Dec; 10(12): 423-8

**9. Stoll-M; Dalchau-R; Schmidt-RE;**

Cluster report CD44 leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens  
Oxford University Press 1989; pp 619-22

**10. Picker-LJ; De-los-Toyos-J; Telen-MJ; Haynes-BF; Butcher-EC**

Monoclonal antibodies against the CD44 [In(Lu)-related p80], and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors.  
J-Immunol. 1989; Mar 15; 142(6): 2046-51

**11. Joensuu-H; Klemi-PJ; Toikkanen-S; Jalkanen-S**

Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer.  
Am-J-Pathol. 1993; Sep; 143(3): 867-74

**12. St.-John-T; Meyer-J; Idzerda-R; Gallatin-WM**

Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells.  
Cell. 1990; Jan 12; 60(1): 45-52

**13. Coombe-DR; Rider-CC**

Lymphocyte homing receptors cloned: a role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion.  
Immunol-Today. 1989; Sep; 10(9): 289-91

**14. Tanabe-KK; Saya-H**

The CD44 adhesion molecule and metastasis.  
Crit-Rev-Oncog. 1994; 5(2-3): 201-12

**15. Herrlich-P; Zoller-M; Pals-ST; Ponta-H**

CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes.  
Immunol-Today. 1993; Aug; 14(8): 395-9

**16. Lesley-J; Hyman-R; Kincade-PW**

CD44 and its interaction with extracellular matrix.  
Adv-Immunol. 1993; 54: 271-335

**17. Gunthert-U**

CD44: a multitude of isoforms with diverse functions.  
Curr-Top-Microbiol-Immunol. 1993; 184: 47-63

**18. Yu-Q; Toole-BP**

A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44.  
J-Biol-Chem. 1996; Aug 23; 271(34): 20603-7

**19. Goodfellow-PN; Banting-G; Wiles-MV; Tunnacliffe-A; Parkar-M; Solomon-E; Dalchau-R; Fabre-JW**

The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined By monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11.  
Eur-J-Immunol. 1982; Aug; 12(8): 659-63

**20. Sherman-L; Sleeman-J; Dall-P; Hekele-A; Moll-J; Ponta-H; Herrlich-P**

The CD44 proteins in embryonic development and in cancer.  
Curr-Top-Microbiol-Immunol. 1996; 213 ( Pt 1): 249-69

**21. Hofmann-M; Rudy-W; Zoller-M; Tolg-C; Ponta-H; Herrlich-P; Gunthert-U**

CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: Homologous sequences are expressed in human tumor cell lines.  
Cancer-Res. 1991; Oct 1; 51(19): 5292-7

- 22. Dougherty-GJ; Landorp-PM; Cooper-DL; Humphries-RK**  
Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the Human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells.  
J-Exp-Med. 1991; Jul 1; 174 (1): 1-5
- 23. Tolg-C; Hofmann-M; Herrlich-P; Ponta-H**  
Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability.  
Nucleic-Acids-Res. 1993; Mar 11; 21(5): 1225-9
- 24. Screaton-GR; Bell-MV; Jackson-DG; Cornelis-FB; Gerth-U; Bell-JI**  
Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1992; Dec 15; 89(24): 12160-4
- 25. Screaton-GR; Bell-MV; Bell-JI; Jackson-D**  
The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat.  
J-Biol-Chem. 1993; Jun 15; 268(17): 12235-8
- 26. van-Weering-DH; Baas-PD; Bos-JL**  
A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products.  
PCR-Methods-Appl. 1993 Oct; 3(2): 100-6
- 27. Dougherty-GJ; Landorp-PM; Cooper-DL; Humphries-RK**  
Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells.  
J-Exp-Med. 1991; Jul 1; 174(1): 1-5
- 28. Bourguignon-LY; Iida-N; Welsh-CF; Zhu-D; Krongrad-A; Pasquale-D**  
Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis.  
J-Neurooncol. 1995; Dec; 26(3): 201-8
- 29. Kaufmann-M; Heider-KH; Sinn-HP; von-Minckwitz-G; Ponta-H; Herrlich-P**  
CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival [see comments]  
Lancet. 1995; Mar 11; 345(8950): 615-9
- 30. Welsh-CF; Zhu-D; Bourguignon-LY**  
Interaction of CD44 variant isoforms with hyaluronic acid and the cytoskeleton in human prostate cancer cells.  
J-Cell-Physiol. 1995; Sep; 164(3): 605-12
- 31. Welsh-CF; Zhu-D; Bourguignon-LY**  
CD44 and its interaction with extracellular matrix.  
Adv-Immunol. 1993; 54: 271-335

- 32. Cheung-ATW; Young-LJT; Chen-PCY; Chao-CY; Ndoye-A; Barry-PA; Müller-WJ Cardiff-RD**  
Microcirculation and metastasis in a new mammary tumor model system J Oncology 1997; 11, pp 69-77
- 33. Brooks-PC; Stromblad-S; Sanders-LC; von-Schalscha-TL; Aimes-RT; Stetler-Stevenson-WG; Quigley-JP; Cheresch-DA**  
Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.  
Cell 1996; May 31; 85(5): 683-93
- 34. Bourguignon-LY; Gunja-Smith-Z; Iida-N; Zhu-HB; Young-LJ; Muller-WJ; Cardiff-RD**  
CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells.  
J-Cell-Physiol. 1998; Jul; 176(1): 206-15
- 35. Goldstein-LA; Butcher-EC**  
Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM(CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues.  
Immunogenetics. 1990; 32(6): 389-97
- 36. Kohda-D; Morton-CJ; Parkar-AA; Hatanaka-H; Inagaki-FM; Campbell-ID; Day-AJ**  
Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration.  
Cell. 1996; Sep 6; 86(5): 767-75
- 37. Wolffe-EJ; Gause-WC; Pelfrey-CM; Holland-SM; Steinberg-AD; August-JT**  
The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and homology to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core/link proteins.  
J -Biol-Chem. 1990; Jan 5; 265(1): 341-7
- 38. Yu-Q; Toole-BP; Stamenkovic-I**  
Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function.  
J-Exp-Med. 1997; Dec 15; 186(12): 1985-96
- 39. English-NM; Lesley-JF; Hyman-R**  
Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding.  
Cancer-Res. 1998; Aug 15; 58(16): 3736-42
- 40. DeGrendele-HC; Kosfischer-M; Estess-P; Siegelman-MH**  
CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation.  
J-Immunol. 1997; Sep 15; 159(6): 2549-53
- 41. Hathcock-KS; Hirano-H; Murakami-S; Hodes-RJ**  
CD44 expression on activated B cells. Differential capacity for CD44-dependent binding to hyaluronic acid.  
J-Immunol. 1993; Dec 15; 151(12): 6712-22

- 42. Katoh-S; Zheng-Z; Oritani-K; Shimosato-T; Kincade-P**  
Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan.  
J-Exp-Med. 1995; Aug 1; 182(2): 419-29
- 43. Bartolazzi-A; Nocks-A; Aruffo-A; Spring-F; Stamenkovic-I**  
Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan.  
J-Cell-Biol. 1996; Mar; 132(6): 1199-208
- 44. Lesley-J; English-N; Perschl-A; Gregoroff-J; Hyman-R**  
Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation.  
J-Exp-Med. 1995; Aug 1; 182(2): 431-7
- 45. Bajorath-J; Greenfield-B; Munro-SB; Day-AJ; Aruffo-A**  
Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site.  
J-Biol-Chem. 1998; Jan 2; 273(1): 338-43
- 46. Zheng-Z; Cummings-RD; Pummill-PE; Kincade-PW**  
Growth as a solid tumor or reduced glucose concentrations in Culture reversibly induce CD44-mediated hyaluronan recognition by Chinese hamster ovary cells.  
J-Clin-Invest. 1997; Sep 1; 100(5): 1217-29
- 47. Dasgupta-A; Takahashi-K; Cutler-M; Tanabe-KK**  
O-linked glycosylation modifies CD44 adhesion to hyaluronate in colon carcinoma cells.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1996; Oct 3; 227(1): 110-7
- 48. Takahashi-K; Stamenkovic-I; Cutler-M; Dasgupta-A; Tanabe-K**  
Keratan sulfate modification of CD44 modulates adhesion to hyaluronate.  
J-Biol-Chem. 1996; Apr 19; 271(16): 9490-6
- 49. Jalkanen-S; Jalkanen-M**  
Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin.  
J-Cell-Biol. 1992; Feb; 116(3): 817-25
- 50. Faassen-AE; Schrager-JA; Klein-DJ; Oegema-TR; Couchman-JR; McCarthy-JB**  
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. 1992; Jan; 116(2): 521-31
- 51. Henke-CA; Roongta-U; Mickelson-DJ; Knutson-JR; McCarthy-JB**  
CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix.  
J-Clin-Invest. 1996 ; Jun 1; 97(11): 2541-52
- 52. Knutson-JR; Iida-J; Fields-GB; McCarthy-JB**  
CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes.  
Mol-Biol-Cell. 1996; Mar; 7(3): 383-96

- 53. Ehnis-T; Dieterich-W; Bauer-M; Lampe-B; Schuppan-D**  
A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV(undulin).  
Exp-Cell-Res. 1996; Dec 15; 229(2): 388-97
- 54. Fujimoto-T; Kawashima-H; Tanaka-T; Hirose-M; ToyamaSorimachi-N; Matsuzawa-Y; Miyasaka-M**  
CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan  
Intern.Immunology, 2001; Vol. 13, Iss 3, pp 359-366
- 55. DeGrendele-HC; Estess-P; Picker-LJ; Siegelman-MH**  
CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway.  
J-Exp-Med. 1996; Mar 1; 183(3): 1119-30
- 56. Taher-TE; Smit-L; Griffioen-AW; Schilder-Tol-EJ; Borst-J; Pals-ST**  
Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T-lymphocytes.  
J-Biol-Chem. 1996; Feb 2; 271(5): 2863-7
- 57. DeGrendele-HC; Estess-P; Siegelman-MH**  
Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site.  
Science. 1997; Oct 24; 278(5338): 672-5
- 58. Estess-P; DeGrendele-HC; Pascual-V; Siegelman-MH**  
Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral Blood is a marker of autoimmune disease activity  
[see comments]  
J-Clin-Invest. 1998; Sep 15; 102(6): 1173-82
- 59. Noble-PW; McKee-CM; Cowman-M; Shin-HS**  
Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages.  
J-Exp-Med. 1996; May 1; 183(5): 2373-8
- 60. McKee-CM; Penno-MB; Cowman-M; Burdick-MD; Strieter-RM; Bao-C; Noble-PW**  
Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44.  
J-Clin-Invest. 1996; Nov 15; 98(10): 2403-13
- 61. Föger-N; Marhaba-R; Zöller-M**  
Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells  
Journal of cell science, 2001; 114, Iss 6, pp 1169-1178
- 62. Laurent-TC; Fraser-JR**  
Hyaluronan.  
FASEB-J. 1992 ; Apr; 6(7): 2397-404

- 63. Yang-B; Yang-BL; Savani-RC**  
Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link Protein  
EMBO J 1994; 13, pp 286-96
- 64. Liao-HX; Lee-DM; Levesque-MC; Haynes-BF**  
N-terminal and central regions of the human CD44 extracellular domain participate in cell surface hyaluronan binding.  
J-Immunol. 1995; Oct 15; 155(8): 3938-45
- 65. Lesley-J; English-N; Perschl-A; Gregoroff-J; Hyman-R**  
Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation.  
J-Exp-Med. 1995; Aug 1; 182(2): 431-7
- 66. Lesley-J; Hascall-VC; Tammi-M; Hyman-R**  
Hyaluronan binding by cell surface CD44.  
J-Biol-Chem. 2000; Sep 1; 275(35): 26967-75
- 67. Liao-HX; Levesque-MC; Patton-K; Bergamo-B; Jones-D; Moody-MA; Telen-MJ; Haynes-BF**  
Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies.  
J-Immunol. 1993; Dec 1; 151(11): 6490-9
- 68. Underhill-CB; Chi-Rosso-G; Toole-BP**  
Effects of detergent solubilization on the hyaluronate-binding protein from membranes of simian virus 40-transformed 3T3 cells.  
J-Biol-Chem. 1983; Jul 10; 258(13): 8086-91
- 69. Knudson-CB; Knudson-W**  
Hyaluronan-binding proteins in development, tissue Homeostasis and disease.  
FASEB-J. 1993; Oct; 7(13): 1233-41
- 70. Thomas-L; Byers-HR; Vink-J; Stamenkovic-I**  
CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate.  
J-Cell-Biol. 1992; Aug; 118(4): 971-7
- 71. Liu-D; Sy-MS**  
Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain.  
J-Immunol. 1997 ; Sep 15; 159(6): 2702-11
- 72. Liu-D; Dong-XZ; Mori-H; SY-MS**  
Physiologic requirements and the role of cytoplasmic domain of CD44 in the interaction between CD44 and hyaluronic acid  
Cell Immunol 1996; 174, pp 73-83
- 73. Parsey-MV; Lewis-G**  
Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells.  
J-Immunol. 1993; Aug 15; 151(4): 1881-93

**74. Rao-KM**

Phorbol esters and retinoids induce actin polymerization in human leukocytes.  
Cancer-Lett. 1985; Sep 30; 28(3): 253-62

**75. Geppert-TD; Lipsky-PE**

Association of various T cell-surface molecules with the cytoskeleton. Effect of cross-linking and activation.  
J-Immunol. 1991; May 15; 146(10): 3298-305

**76. Pure-E; Camp-RL; Peritt-D; Panettieri-RA Jr; Lazaar-AL; Nayak-S**

Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain.  
J-Exp-Med. 1995; Jan 1; 181(1): 55-62

**77. Lesley-J; Hyman-R**

CD44 structure and function  
Front. In Bioscience, 1998; July 1, pp 616-630

**78. Rutledge-T; Cosson-P; Manolios-N; Bonifacino-JS; Klausner-RD**

Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with the T cell antigen receptor.  
EMBO-J. 1992; Sep; 11(9): 3245-54

**79. Aruffo-A; Stamenkovic-I; Melnick-M; Underhill-CB; Seed-B**

CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate.  
Cell. 1990; Jun 29; 61(7): 1303-13

**80. Stern-R; Shuster-S; Wiley-TS;**

Hyaluronidase Can Modulate Expression of CD44  
Exper. Cell Research, 2001; Vol 266, Iss 1 pp 167-176

**81. Formby-B; Wiley-TS**

Bcl-2, survivin and variant CD44 v7-v10 are downregulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis.  
Mol-Cell-Biochem. 1999; Dec; 202(1-2): 53-61

**82. Goodison-S; Urquidi-V; Tarin-D**

CD44 cell adhesion molecules.  
Mol-Pathol. 1999; Aug; 52(4): 189-96

**83. Weber-GF; Ashkar-S; Glimcher-MJ; Cantor-H**

Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1).  
Science. 1996; Jan 26; 271(5248): 509-12

**84. O'Regan-AW; Nau-GJ; Chupp-GL; Berman-JS**

Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: Teaching an old dog new tricks  
Immunology today 2000; Vol 121, Iss 10, pp 475-478

- 85. Zawaideh-S; Rittling-SR; Denhardt-DT; Glimcher-MJ; Cantor-H**  
Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1(cell-mediated) immunity.  
Science. 2000; Feb 4; 287(5454): 860-4
- 86. O'Regan-AW; Chupp-GL; Lowry-JA; Goetschkes-M; Mulligan-N; Berman-JS**  
Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro.  
J-Immunol. 1999; Jan 15; 162(2): 1024-31
- 87. Smith-LL; Greenfield-BW; Aruffo-A; Giachelli-CM**  
CD44 is not an adhesive receptor for osteopontin.  
J-Cell-Biochem. 1999; Apr 1; 73(1): 20-30
- 88. Seiter-S; Arch-R; Reber-S; Komitowski-D; Hofmann-M; Ponta-H; Herrlich-P; Matzku-S; Zoller-M**  
Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44.  
J-Exp-Med. 1993; Feb 1; 177(2): 443-55
- 89. Arch-R; Wirth-K; Hofmann-M; Ponta-H; Matzku-S; Herrlich-P; Zoller-M**  
Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44 [see comments]  
Science. 1992; Jul 31; 257(5070): 682-5
- 90. Sherman-L; Wainwright-D; Ponta-H; Herrlich-P**  
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. 1998; Apr 1; 12(7): 1058-71
- 91. Tanaka-Y; Adams-DH; Hubscher-S; Hirano-H; Siebenlist-U; Shaw-S**  
T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized Cytokine MIP-1 beta [see comments]  
Nature. 1993; Jan 7; 361(6407): 79-82
- 92. Bennett-KL; Jackson-DG; Simon-JC; Tanczos-E; Peach-R; Modrell-B; Stamenkovic-I; Plowman-G; Aruffo-A**  
CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the Presentation Of heparin-binding growth factor.  
J-Cell-Biol. 1995; Feb; 128(4): 687-98
- 93. Tumova-S; Woods-A; Couchman-JR**  
Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: Versatile coordinators of cellular functions.  
Int-J-Biochem-Cell-Biol. 2000; Mar; 32(3): 269-88

**94. Jackson-DG; Bell-JI; Dickinson-R; Timans-J; Shields-J; Whittle-N**

Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon.  
J-Cell-Biol. 1995; Feb; 128(4): 673-85

**95. Yonemura-S; Hirao-M; Doi-Y; Takahashi-N; Kondo-T; Tsukita-S; Tsukita-S**

Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2.  
J-Cell-Biol. 1998; Feb 23; 140(4): 885-95

**96. Bennett-V**

Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm.  
J-Biol-Chem. 1992; May 5; 267(13): 8703-6

**97. Bourguignon\_Lilly-YW, Zhu-D and Zhu-H**

CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression  
Front. In Bioscience, 1998; July 1, pp 637-649

**98. Lokeshwar-VB; Fregien-N; Bourguignon-LY**

Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the Expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function.  
J-Cell-Biol. 1994 ; Aug; 126(4): 1099-109

**99. Zhu-D; Bourguignon-LY**

The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation.  
Cell-Motil-Cytoskeleton. 1998; 39(3): 209-22

**100. Bourguignon-LY; Kalomiris-EL; Lokeshwar-VB**

Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction.  
J-Biol-Chem. 1991; Jun 25; 266(18): 11761-5

**101. Nunomura-W; Takakuwa-Y; Tokimitsu-R; Krauss-SW; Kawashima-M; Mohandas-N**

Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction.  
J-Biol-Chem. 1997; Nov 28; 272(48): 30322-8

**102. Bourguignon-LY; Gunja-Smith-Z; Iida-N; Zhu-HB; Young-LJ; Muller-WJ;**

CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix Metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. Cardiff-RD  
J-Cell-Physiol. 1998; Jul; 176(1): 206-15

**103. Liu-D; Sy-MS**

A cysteine residue located in the transmembrane domain of CD44 is important in binding of CD44 to hyaluronic acid.  
J-Exp-Med. 1996; May 1; 183(5): 1987-94

- 104. Sherman-L; Wainwright-D; Ponta-H and Herrlich-P**  
A splice Variant of CD44 expressed in The apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth  
Genes & Development 1998; 12: 1058-1071
- 105. Morrison-H; Sherman-L; Legg\_J; Banine\_F; Isacke-C; Haipok-C; Gutmann-D; Ponta-H; and Herrlich-P**  
The NF2 tumor suppressor gene product merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44  
Genes & Development 2001; 15: 968-980
- 106. Taher-TE; Smit-L; Griffioen-AW; Schilder-Tol-EJ; Borst-J; Pals-ST**  
Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes.  
J-Biol-Chem. 1996; Feb 2; 271(5): 2863-7
- 107. Ilangumaran-S; Briol-A; Hoessli-DC**  
CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphospholipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood Lymphocytes  
Blood, 1998; May 15; 91 (10): 3901-8
- 108. van-der-Voort\_R; Taher-TE; Wielenga-VJ; Spaargaren-M; Prevo-R; Smit-L; David-G; Hartmann-G; Gherardi-E; Pals-S**  
Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met  
J-Biol-Chem. 1999; mar 5; 274 (10): 6499-506
- 109. Dimitroff-CJ, Lee-JL, Fuhlbrigge-C, Sackstein-R**  
A distinct glycoform of CD44 is an L-Selectin Ligand on human Hematopoietic cells
- 110. Zawadzki-V; Perschl-A; Rosel-M; Hekele-A; Zoller-M**  
Blockade of metastasis formation by CD44-receptor globulin.  
Int-J-Cancer. 1998; Mar 16; 75(6): 919-24
- 111. Sy-MS; Guo-YJ; Stamenkovic-I**  
Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo.  
J -Exp-Med. 1991; Oct 1; 174(4): 859-66
- 112. Kogerman-P; Sy-MS; Culp-LA**  
CD44 protein levels and its biological activity are regulated in Balb/c 3T3 fibroblasts by serum factors and by transformation with the ras but not with the sis oncogene.  
J-Cell-Physiol. 1996; Nov; 169(2): 341-9
- 113. Kogerman-P; Sy-MS; Culp-LA**  
Oncogene-dependent expression of CD44 in Balb/c 3T3 derivatives: correlation with metastatic competence.  
Clin-Exp-Metastasis. 1996; Jan; 14(1): 73-82

**114. Underhill-C**

CD44: the hyaluronan receptor  
J Cell Sci 1992; 103, pp 293-298

**115. Naor-D; Sionov-RV; Shalom-DI**

CD44: structure, function and association with the metastatic process  
Adv Can res 1997; 71, pp 241-319

**116. Hott-JW; Antony-VB**

Mechanism of pleural metastasis: MCF-7 breast adenocarcinoma cell haptotaxis to hyaluronic acid  
Am J Resp Crit care Med 1997; 155, pp180-200

**117. Eliceiri-BP; Cheresch-DA**

The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development.  
J-Clin-Invest. 1999; May; 103(9): 1227-30

**118. Herrlich-P; Pals-S; Ponta-H**

CD44 in colon cancer  
Eur-J-Cancer. 1995; Jul-Aug; 31A(7-8): 1110-2

**119. Mulder-JW; Kruyt-PM; Sewnath-M; Oosting-J; Seldenrijk-CA; Weidema-WF; Offerhaus-GJ; Pals-ST**

Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins  
[see comments]  
Lancet. 1994; Nov 26; 344(8935): 1470-2

**120. Koretz-K; Moller-P; Lehnert-T; Hinz-U; Otto-HF; Herfarth-C**

Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma  
[letter; comment]  
Lancet. 1995; Feb 4; 345(8945): 327-8

**121. Gotley-DC; Fawcett-J; Walsh-MD; Reeder-JA; Simmons-DL; Antalis-TM**

Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer.  
Br-J-Cancer. 1996; Aug; 74(3): 342-51

**122. Kaufmann-M; Heider-KH; Sinn-HP; von-Minckwitz-G; Ponta-H; Herrlich-P**

CD44 isoforms in prognosis of breast cancer  
[letter; comment]  
Lancet. 1995; Aug 19; 346(8973): 502

**123. Tempfer-C; Losch-A; Heinzl-H; Hausler-G; Hanzal-E; Kolbl-H; Breitenecker-G; Kainz-C**

Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer.  
Eur-J-Cancer. 1996; Oct; 32A(11): 2023-5

- 124. Friedrichs-K; Franke-F; Lisboa-BW; Kugler-G; Gille-I; Terpe-HJ; Holzel-F; Maass-H; Gunthert-U**  
CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer.  
Cancer-Res. 1995; Nov 15; 55(22): 5424-33
- 125. Dall-P; Hekele-A; Ikenberg-H; Goppinger-A; Bauknecht-T; Pfliederer-A; Moll-J; Hofmann-M; Ponta-H; Herrlich-P**  
Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinogenesis.  
Int-J-Cancer. 1996; Apr 22; 69(2): 79-85
- 126. Mulder-JW; Kruyt-PM; Sewnath-M; Oosting-J; Seldenrijk-CA; Weidema-WF; Offerhaus-GJ; Pals-ST**  
Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6- containing CD44 proteins  
[see comments]  
Lancet. 1994; Nov 26; 344(8935): 1470-2
- 127. Stauder-R; Eisterer-W; Thaler-J; Ghuntert-U**  
CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new Independent prognostic factor  
Blood 1995; 85, pp 2885-99
- 128. Iida-N; Bourguignon-LY**  
Coexpression of CD44 variant (v10/ex14) and CD44S in human mammary epithelial cells promotes tumorigenesis.  
J-Cell-Physiol. 1997; May; 171(2): 152-60
- 129. Iida-N; Bourguignon-LY**  
New CD44 splice variants associated with human breast cancers.  
J-Cell-Physiol. 1995; Jan; 162(1): 127-33
- 130. Dexter-T.M.; Spooncer-E.; Simmons-P.; Allen-T.D.;**  
Long-term marrow culture: An overview of technique and experience. In Wright, D.G., Greenberger, J.S. (eds): "Long-Term Bone Marrow Culture," Kroc Foundation Series 1984; 18. New York, Alan R. Liss, pp. 57-96.
- 131. Whitlock-C.A.; Robertson-D; Witte-O.N.**  
Murine B Cell Lymphopoiesis in Long Term Culture.  
J. Immunol. Methods 1984; 67: 353-369.
- 132. Talmor-M.; Mirza-A.; Turley-S.; Mellman-I.; Hoffman-L.A.; Steinman-RM.**  
Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures  
Eur. J.Immunol. 1998; mar; 28(3):811-7
- 133. Köhler-G.; and Milstein-C.**  
Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.  
Eur. J. Immunol. 1976; 6: 511-519.
- 134. Engvall-E.; Jonsson-K.; and Perlman-P.**  
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G.  
Immunochemistry. 1971; 8:871-874.

**135.Simanis-V.; Lane-D.P.**

An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen.  
Virology 1984; 144, 88-100.

**136.Laemmly-U.K.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
Nature 1970; 227:680-685

**137.Nishimura-A.; Morita-A.; Nishimura-Y.; Sugino-Y.;**

A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells  
Nucleic Acid Res 1996; 18:20, p 6169

**138.Birnboim-H.C.; Doly-J.**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
Nucleic Acids Research 1997; 7, 1513.

**139. Nottenburg-C;Rees-G; St.John-T**

Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA  
Proc Natl Acad Sci USA 1989; Nov; 86(21):8521-5

**140.Hefler-LA. ; Concini-N. ; Mincham-D. ; Thompson-J.; Swarte-NB. van Eijkeren-MA.;**  
**Sie-Go-DM.; Hammond-I.; McCartney-AJ.; Tempfer-CB.; Speiser-P.**

The prognostic value of immunohistochemically detected CD44v3 and CD44v6 expression in patients with surgically staged vulvar carcinoma: a multicenter study.  
Cancer 2002; 1;94 (1): 125-30

**141.Forster-Horvath-C.; Bocsi-J.; Raso-E.; Orban-T.I.; Olah-E.; Timar-J.; Ladanyi-A.**

Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human T-lymphocytes  
Eur. J. Immunol. 2001; 2 : 600-608

**142.Khaldoyanidi-S.; Denzel-A.; Zöller-M.**

Requirement for CD44 in stem cell proliferation and homing  
J Leukoc Biol 1996; 60 :579-592

**143.Kurosaka-D.; LeBien-TW.; Pribyl-JA.**

Comparative studies of different stromal cell microenvironment in support of human B-cell development  
Exp. Hematol. 1999; aug.; 27(8): 127-81

**144.Bourguignon-LY.; Zhu-H.; Zhou-B.; Diedrich-F.; Singleton-PA.; Hung-MC.**

Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth.  
J Biol Chem 2001; 28, 276(52):48679-92

**145.Protin-U.; Schweighoffer-T.; Jochum-W.; Hilberg-F.**

CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets.  
J Immunol 1999; Nov 1;163(9):4917-23

## Abkürzungen

3HTdR	<sup>3</sup> H-Thymidin
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AS	Aminosäure
CD	Cluster of differentiation
Con A	Concanavalin A
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell Sorter
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HBSS	© <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
H+L	Heavy- & Light-chain
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KMZ	Knochenmarkzellen
mAK	monoklonaler Antikörper
MZ	Milzzellen
NP-40	Nonidet P-40
NWS	Nylonwattesäule
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidium Iodid
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
P/S	Penicillin / Streptomycin
PVDF	Polyvenyliden-difluorid
Rgs	Rezeptorglobulin CD44-Standard
Rg3	Rezeptorglobulin CD44-Variante 3
Rg10	Rezeptorglobulin CD44-Variante 10
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylendiamin

# Peter Engel

---

<b>Geburtsdatum</b>	21.02.1965
<b>Geburtsort</b>	Bremerhaven
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Schulbildung</b>	September 1971 - Juli 1978 Grundschule, Bremerhaven September 1978 - Juli 1982 Realschule, Bremerhaven September 1982 - Juni 1985 Gymnasiale Oberstufe Bremerhaven, Abschluß am 13 Juni 1985
<b>Zivildienst</b>	01. Oktober 1985 - 31. Februar 1987
<b>Ausbildung</b>	01. August 1988 - 31 Juli 1991 Ausbildung zum Biologielaboranten
<b>Studium</b>	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Oldenburg ab Wintersemester Oktober 1991
<b>Vordiplom</b>	15. September 1993
<b>Diplom</b>	01. Februar 1996 - 01. März 1997 Forschungszentrum Borstel, In der „Abteilung für Immunologie und Zellbiologie“ von Prof.Dr.A.J. Ulmer ,23854 Borstel. Zum Thema: „Expression und Modulation von CD26 auf humanen T-Lymphozyten“ 05. August 1997 Erhalt des Diplomzeugnisses
<b>Promotion</b>	Seit dem 15.06 1997 im deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, in der Arbeitsgruppe „Tumorprogression und Immunabwehr“ von Frau Professor Dr. Zöller zum Thema „CD44 und Variante Isoformen im murinen System“
<b>Veröffentlichungen</b>	- Buchbeitrag zu Leucocyte Typing VI Modulation of CD26 surface expression T.Mattern, P. Engel, H.-D Flad, and A.J. Ulmer Leucocyte Typing VI

- Dual function of CD44v3 in allergic and delayed type hypersensitivity  
Seiter S, Engel P., Föhr N, and Zöller M.  
J Invest Dermatol, 113; 11-21. 1999

#### **In Press**

- Transient CD44 variant isoform expression and reduction in CD4+/CD25+ regulatory T-cells in C3H/HeJ mice with alopecia areata  
Zöller M.; McElwee KJ.; Engel P.; Hoffma  
J Invest Dermatol

#### **In Vorbereitung**

- Osteopontin binds selectively to the CD44v10 exon Product  
Engel P.; Zöller M.
- Regulation of LFA-1 expression by CD44v3  
Engel P.; Zöller M.

#### **Abstracts**

- Abstract und Posterpräsentation auf der 27 Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hamburg 26-28 September 1996
- Abstract und Posterpräsentation für den 6 Congres of Human Leucocyte Differentiation Antigens, Kobe, Japan 1996 „ Modulation of CD26 on human T-Lymphocytes“
- Abstract und Posterpräsentation auf der 32 Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft für Immunologie Dresden Osteopontin: A specific Ligand for Cd44v10  
Engel P.; Zöller M.
- Abstract und Posterpräsentation auf der 32 Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft für Immunologi, Dresden Upregulation of LFA-1 by CD44variant Isoform Expression

Heidelberg, den 24.1.00



## Erklärung

Hiermit versichere Ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe

Heidelberg März 2002

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Peter Engel', written in a cursive style.

Peter Engel

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof Dr. Margot Zöller, für meine Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas. Ihr Interesse, Ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei vielen Gelegenheiten waren eine große Hilfe.

## **Ich Danke**

Herrn PD Dr. Peter Jaros für seine Bereitschaft sich als Referent zur Verfügung zu stellen und die Geduld mit der er die Verzögerungen die Fertigstellung dieser Arbeit betreffend ertragen hat.

Dirk-Steffen Schmidt, Mikael Herlevsen und Burghard Hassel für Ihre Freundschaft und die Unterstützung bei vielen wissenschaftlichen und alltäglichen Problemen. Niko Föger, Robert Weth und Christoph Claas sowie allen anderen die mit Ihrer Persönlichkeit für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Frau Nicole Föhr, Frau Susanne Hummel und Herrn Mario Vitacolonna danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die engagierte Hilfe bei jeder Gelegenheit die mehr als ein paar Hände verlangte.

Meike für die verhaltene Ungeduld mit der Sie meine Abwesenheit während mancher Wochenenden ertragen hat und aus den übrigen stets etwas ganz besonderes werden ließ