

VÝZNAM ALTERACÍ ADHEZIVNÍCH MOLEKUL CD44 V MALIGNÍM CHOVÁNÍ NÁDORŮ

SIGNIFICANCE OF CD44 ADHESION MOLECULES ALTERATIONS IN THE MALIGNANT BEHAVIOUR OF TUMOURS

KUNCOVÁ J., MANDYS V., HERÁČEK J., LUKEŠ M., ZACHOVAL R., URBAN M.

UROLOGICKÁ KLINIKA A ÚSTAV PATOLOGIE 3. LF UK A FNKV PRAHA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY AV ČR PRAHA

Souhrn: V progresi maligních nádorů hrají významnou úlohu změny mezibuněčných interakcí, jež jsou mimo jiné zajišťovány adhezivními molekulami. Proteiny CD44 skupiny jsou buněčné adhezivní molekuly, ubikviterně exprimované na buněčných membránách mnoha tkání organismu. Standardní forma i variantní izoformy CD44 jsou kódovány jedním genem a při jejich vzniku se zásadním způsobem uplatňuje mechanismus variabilního sestřihu. CD44 proteiny zajišťují mezibuněčnou adhezi v embryogenezi, hrají důležitou roli v procesu myelopoese, lymfopoese a angiogeneze, v aktivaci a „homingu“ lymfocytů a účastní se např. i degradace hyaluronátu. V maligních nádorech není význam alterací proteinů skupiny CD44 zcela přesně objasněn, ale jejich exprese a zastoupení variantních izoform v maligních tkáních jsou nepochybně odlišné od tkání nenádorových. V různých typech epitelových nádorů byl kromě up- a down-regulace popsán i změněný vzorec exprese variantních izoform. Předkládaná práce shrnuje současné poznatky o expresi CD44 molekul v nádorové tkáni a uvádí přehled exprese CD44 v karcinomu močového měchýře, ovaria, mléčné žlázy, žaludku, v renálním a v hepatocelulárním karcinomu, v dlaždicobuněčném karcinomu hlavy a krku a v nemalobuněčných karcinomech plic.

Klíčová slova: CD44, adhezivní molekuly, epitelové nádory, progresse nádorů, imunohistochemie.

Summary: Changes of intracellular interactions which are also mediated by the cell adhesion molecules play an important role in the progression of malignant tumours. Proteins of the CD44 family are cell adhesion molecules, which are ubiquitously expressed on cell membranes of a wide range of tissues. The standard form and its variant isoforms are encoded by a single gene. The mechanism of alternative splicing is crucial for formation of different isoforms. CD44 proteins are responsible for maintenance of the cell adhesion during embryogenesis, they play an important role at the process of myelopoiesis, lymphopoiesis and angiogenesis, in lymphocyte activation and homing and also in hyaluronate degradation. Although the expression and occurrence of variant CD44 isoforms in malignant tissues differs obviously from their expression in non-malignant tissues, the significance of alterations of these proteins in malignant tumours has not been clearly established yet. Apart from the up- and down-regulation, changing patterns of variant isoforms expression has been also described in the diverse types of malignant epithelial tumours. This article summarizes recent findings on the expression of CD44 molecules in malignant tissues and reviews CD44 expression in carcinomas of urinary bladder, ovary, mammary gland and stomach, in renal and hepatocellular carcinoma, squamous carcinoma of head and neck and in non-small cell lung carcinomas.

Key words: CD44, adhesion molecules, epithelial tumours, tumour progression, immunochemistry

Úvod

V průběhu posledních desetiletí byly dosaženy významné pokroky v poznání molekulárních mechanismů nádorové transformace buněk. V nádorech byly charakterizovány alterace řady genů, účastnících se regulací základních buněčných funkcí, jako jsou dělení, produkce regulačních a strukturálních proteinů a regulovaná buněčná smrt. Podle teorie vícestupňového průběhu kancerogeneze je nahromadění poruch těchto genů základní podmínkou pro vznik primárního nádoru. Kromě lokálního působení primárních nádorů má pro osud nemocných podstatný význam i progresse nádoru, charakterizovaná jeho prorůstáním do okolních tkání a zakládáním sekundárních ložisek - metastáz. Progrese nádorů, tj. infiltrativní růst a metastazování, jsou hlavními definujícími znaky nádorů maligních. Ve srovnání se šíří poznatků o mechanismech nádorové transformace buňky vedoucí ke vzniku primárních nádorů jsou informace o molekulárních alteracích, které jsou podkladem progresse nádorů, dosud značně omezené. Z tohoto důvodu se značná část onkologického výzkumu soustřeďuje právě na tuto oblast. V současné době je zřejmé, že v progresi nádorů hrají - kromě vlastností nádorových buněk - významnou roli poruchy buněčných interakcí a působení nádorových buněk na extracelulární stromální struktury. Tyto procesy jsou zprostředkovány zejména působením proteáz produkovaných

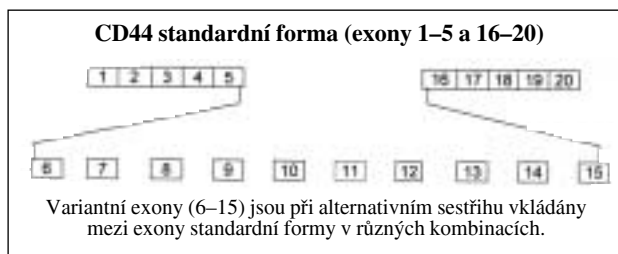
nádorovými buňkami (1) a kvantitativními a kvalitativními změnami adhezivních molekul, lokalizovaných na povrchu buněk (2).

Skupina CD44 molekul

Adhezivní molekuly patřící do skupiny CD44 jsou struktury glykoproteinové povahy, exprimované ubikviterně na povrchu buněk. Podílejí se na zajištění adheze mezi buňkami a extracelulární matrix i mezi buňkami navzájem. Poprvé byly tyto glykoproteiny identifikovány na lymfocytech jako molekuly funkčně významné v procesu buněčné adheze a „homingu“ lymfocytů. S postupujícím výzkumem CD44 molekul byla popsána exprese různých forem CD44 v jednotlivých typech tkání a bylo rozpoznáno mnoho jejich dalších forem a funkcí, významných mimo jiné i v procesu maligního bujení (3-5).

Struktura

Skupinu CD44 tvoří jednak standardní izoforma molekuly - CD44s, jednak variabilní izoformy, jež jsou povšechně označovány CD44v. CD44 protein je kódován genem obsahujícím 2 skupiny exonů, lokalizovaným na 11. chromozomu v lokusu 11p13 (6). Skupina tzv. standardních exonů zahrnuje exony 1-5 a 16-20, které podléhají společnému sestřihu, čímž vzniká transkript, který následně kóduje standardní izoformu CD44s.



Skupina variabilních exonů je složena z exonů 6–15, označovaných také jako v1–v10 (7–9). Vznik variabilních izoforem je zprostředkovan transkripcí, sestřihem a následnou inzercí těchto variabilních exonů mezi standardní exony (Obr. 1). Sestřih variabilních exonů do výsledné mRNA je také označován jako alternativní sestřih. Podle typu zařazeného exonu jsou variabilní izoformy značeny číslem, např. CD44v3, CD44v6, atd. Mechanismus kontroly alternativního sestřihu není dosud znám, uvazuje se například o regulaci CD44 promotoru onkogenem Ras (10,11). Pozoruhodné je, že jednotlivé buňky pravděpodobně vykazují jistou schopnost změnit spektrum exprese CD44 podle svých potřeb.

Nejrozšířenější formou CD44 glykoproteinů je standardní izoforma, CD44s, která je tvořena 363 aminokyselinami. Molekulová hmotnost jejího proteinového jádra (protein core) je 37 kDa. V důsledku vazby glykosaminoglykanových řetězců (např. chondroitinsulfátu či heparansulfátu) na toto jádro je výsledná molekulová hmotnost CD44s přibližně 80 kDa (12). Základní struktura všech molekul CD44 je shodná. Je tvořena třemi doménami - cytoplazmatickou, transmembránovou a extracelulární. Cytoplazmatická doména tvoří tzv. C-terminální konec molekuly. Je vysoce konzervativní a je složena ze 72 aminokyselin. Druhá, transmembránová, doména sestává z 21 aminokyselin, u savčích druhů je 100% konzervativní. Největší část molekuly CD44 představuje extracelulární doména (tzv. N - terminální konec) tvořená 270 aminokyselinami s konzervativními i variabilními oblastmi. C terminální konec je kódován exonem 19 či 20, transmembránový segment exonem 18. Variabilní část extracelulární domény je dle typu CD44v kódována variantními exony 6–15 (13). Změny struktury i funkce molekul CD44 jsou mimo jiné významně ovlivňovány širokým spektrem posttranslačních úprav, především N- a O- glykosylací, která modifikuje vazebné charakteristiky různých izoforem CD44 (13). Různé izoformy CD44 vykazují rozdílné vzorce glykosylace. Skutečnost, že některé izoformy se vyskytují v glykosylované i neglykosylované podobě nasvědčuje tomu, že část funkcí CD44 nezávisí na vazbě postranních glykosaminoglykanových řetězců. V důsledku glykosylace může hmotnost největších molekul CD44 přesahovat 200 kDa. Isoformy o střední velikosti (110–160 kDa) představují molekuly exprimované především na epiteliálních buňkách (14).

Expres v normálních tkáních

CD44s glykoprotein byl původně izolován na hemopoetických buňkách. S postupujícím věkem bylo však zjištěno, že se nachází na většině buněk různých tkání (15,16). Je exprimován např. na buňkách CNS, epidermis, v játrech, v plicích, pankreatu a na buňkách mnoha dalších tkání (12,13,17–19). Výskyt variabilních izoforem je mnohem méně rozšířený, než zastoupení CD44s (13,20). Například na epiteliálních buňkách, stejně jako na buňkách hemopoetického systému, jsou variabilní izoformy exprimovány podle vzorce specifického pro danou tkáň. Je tedy pravděpodobné, že proces alternativního sestřihu je velmi striktně regulován a že právě variabilní izoformy se specifickými úseky a s omezenou distribucí mají rozdílné, přídatné funkce ve vztahu k CD44s (12,21). Různé formy CD44v jsou nacházeny např. na keratinocytech, urotelu, buň-

kách žaludeční sliznice, na aktivovaných lymfocytech a makrofázích a na buňkách dalších tkání (22,23). CD44 je exprimován i v embryonálních tkáních, kde se účastní procesu organogeneze (3,20,24).

Ligandy a funkce

Nejvýznamnější ligandou molekul CD44 je kyselina hyaluronová (hyaluronát, HA), glykosaminoglykan běžně zastoupený v extracelulární matrix (25). Všechny molekuly CD44 obsahují nejméně 3 vazebná místa pro hyaluronát. Jedním z nich je tzv. CLP doména (cartilage link protein), kódovaná exonem 2, (26) další 2 domény se nalézají v oblasti kódované exonem 5 (27). HA vazebné domény jsou konstantními a vysoce konzervativními částmi extracelulární domény všech molekul CD44. Schopnost buněk vázat hyaluronát prostřednictvím CD44 je podmíněna existencí dalších regulačních mechanismů. To vysvětluje okolnost, že ne všechny buňky exprimující CD44 váží HA (13). Dalšími minoritními ligandami CD 44 jsou osteopontin, serglycin, kolagen, fibronektin a laminin (28–31). Osteopontin je cytokin uvolňovaný různými typy buněk, hrající roli v procesu buněčné chemotaxe. Kolagen, fibronektin a laminin se váží na molekulu CD44 nepřímo, prostřednictvím polysacharidu chondroitinu, navázaného na molekulu CD44 v oblasti exonu 5 (30,32). Rovněž serglycin, patřící do skupiny proteoglykanů pojmenované pro repetitivní Ser-Gly dipeptidové sekvence se váže na molekulu CD44 nepřímo (33).

Vazba HA-CD44 je ovlivněna úrovní glykosylace molekuly CD44 a pravděpodobně i mnoha dalšími mechanismy, které, stejně jako regulace glykosylace, nejsou dosud přesně známy (12,13,20). Je však jisté, že tyto mechanismy významně modifikují i další funkce CD44, uplatňující se v patologických procesech v organismu. Schopnost různých variantních izoforem CD44 vázat HA je různá (34). Zdá se, že ačkoliv CD44v obsahují vazebnou doménu pro hyaluronát, je úroveň vazby HA variantními izoformami nižší, právě díky přítomnosti variantních oblastí (35). Inhibiční efekt variantních úseků molekuly je přídatným jevem, souvisejícím patrně s jejich glykosylací. Vazebné studie ukazují, že ty molekuly CD44v, které nebyly O-glykosylovány, mohou vázat HA stejně efektivně jako CD44s (35). Inhibiční efekt na vazbu HA vykazuje i N-glykosylace. Inhibice N-glykosylace usnadňuje vazbu HA (36). Zůstava glykosylace může díky mutaci na specifických luscích vést ke konverzi ve formu potenciálně vazebně aktivní. Ve vztahu k vazbě na HA jsou tedy molekuly CD44 exprimovány na buňkách v aktivním, inaktivním či indukovatelném stavu. Rozdíly ve vazebném stavu CD44 k HA jsou specifické pro konkrétní buňky a souvisí s typem posttranslačních modifikací molekuly (37). V některých typech buněk může být schopnost původně neaktivní molekuly CD44 vázat HA ovlivněna i interakcí se specifickými protilátkami. Tohoto „aktivního stavu“ může být rovněž dosaženo inkubací buněk se stimulačními činidly, např. forbolestery či interleukiny (38). Pro vysokou vazebnou afinitu CD44 k hyaluronátu je nutná i intaktní cytoplazmatická doména. Stav této domény ovlivňuje vazbu extracelulárního HA pravděpodobně cestou membránových přesunů, dimerizace či shlukování molekul CD44 (13). Cestou detailní mutační analýzy zásaditých aminokyselinových skupin v cytoplazmatické doméně byla definována specifická argininová a lizinová rezidua, pomocí kterých látky stimulující protein kinázu C (PKC) rozdílným způsobem regulovaly vazbu HA (39). Hlavní funkcí cytoplazmatické domény je však přenos signálů z extracelulárního prostředí (40). Tato doména se přímo váže na množství intracelulárních proteinů. Byla v ní identifikována vazebná doména pro ankyrin (41,42), jehož vazba je pravděpodobně usnadňována navázáním palmitoylanu na rezidua aminokyselin obsažená v molekule CD44 (43). Je pravděpodobné, že existuje i souvislost mezi schopností vázat ankyrin a vazbou HA (42,44). Dalšími intracelulárními proteiny, které mají schopnost vaz-

by na cytoplazmatickou doménu CD44, jsou tzv. ERM proteiny (ezrin, radixin, moesin) (27), které se rovněž účastní na přenosu signálů z okolí do buňky. Ankyrin a ERM proteiny propojují složky buněčné membrány se sítí intracelulárních aktinových filament, čímž zprostředkují i kontakt CD44 s cytoskeletální soustavou buňky a tím ovlivňují buněčnou motilitu, migraci a mimo jiné i membránovou lokalizaci CD44 (45). Dosud získané poznatky svědčí tedy pro to, že CD44 glykoproteiny zprostředkují důležité dynamické intra- i extracelulární interakce.

Díky schopnosti vázat významné složky extracelulární matrix se molekuly CD44 podílejí na udržování trojrozměrné struktury tkání, na migraci i agregaci buněk a na vazebných interakcích mezi lymfocyty a endoteliálními buňkami (12,13,20). V proliferujících epitelových buňkách i v dalších buňkách zúčastněných v regeneraci tkání a v reparačních procesech dochází k up-regulaci CD44 i HA, čímž se vytvářejí struktury připomínající lešení, umožňující následnou vazbu dalších buněk během tkáňové expanze (46,47). K akumulaci HA dochází při angiogenezi, hojení ran i během migrace embryonálních buněk (47-49). Vzájemná vazba HA a CD44 může mimo jiné indukovat i změnu genové exprese. Tím se CD44 uplatňuje v regulaci sekrece cytokinů, v aktivaci lymfocytů a buněk monocyto-makrofágového systému a při angiogenezi. Navíc v makrofázích bylo identifikováno množství „zánětlivých genů“, jejichž exprese může být indukována HA oligomery (50). Semi-purifikované, hyaluronidázou rozštěpené fragmenty hyaluronátu mohou stimulovat proliferaci a migraci endoteliálních buněk a urychlovat proces angiogeneze in vivo (51,52).

CD44 je diferenciacním antigenem v procesu myelopoese a lymfopoese, v průběhu embryogeneze umožňuje remodelaci extracelulární matrix. CD44 rovněž umožňuje agregaci buněk, a to multivalentní vazbou hyaluronátu k molekulám CD44 nalézajícím se na okolních buňkách, nebo vzájemnou vazbou mezi molekulami CD44, uskutečňovanou pomocí jejich glykosylovaných částí (53). HA dependentní vazby se účastní zejména agregace makrofágů, lymfocytů a fibroblastů (54). V této souvislosti je důležité, že právě proliferující buňky jsou bohaté na hyaluronát (46).

Molekula CD44 se účastní i degradace hyaluronátu. Komplex CD44-HA je internalizován a následně připojen k lyzozomálnímu kompartmentu, kde je degradován kyselými hydrolázami (55). Výše uvedená funkce CD44 má velký význam vzhledem k možným negativním efektům hromadění hyaluronátu, např. v plicní tkáni, kde interferuje s výměnou plynů (55).

CD44 v procesu maligního nádorového bujení

Zájem o význam CD44 v procesu maligního bujení byl vyvolán zejména po objevu Günthera a kol. (22), kteří v r. 1991 při pokusech s transfekcí CD44v6 do nemetastazujících buněčných linií zjistili, že CD44v6 je nositelem metastatického potenciálu. Po zavedení genu CD44v6 do buněk pomocí plazmidu a jeho následné expresi získaly takto změněné buňky schopnost metastazovat. Množství následných studií provedených na různých typech nádorů prokázalo řadu souvislostí mezi zvýšenou expresí CD44s i CD44v a stupněm diferenciacce nádorů (grade), metastatickým potenciálem, či proliferací aktivitou nádorových buněk (56). Byla rovněž ověřována možnost využití úrovně exprese CD44 jako prognostického faktoru přežití nemocných s různými typy nádorů. Z dosud provedených studií zabývajících se významem exprese CD44 v maligních nádorech vyplývá, že v nádorech je exprese molekul CD44 do různé míry alterována. Tato alterace může spočívat v up-regulaci, down-regulaci, či v přítomnosti jiných variantních izoform CD44, tedy ve změně vzorce exprese CD44 molekul specifického pro danou nenádorovou tkáň (57). Dalšími modifikacemi, které mohou významně ovlivňovat funkci molekul CD44, jsou např. změny v úrovni glykosylace, či ve schopnosti vazby ligandů, které s následnými možnými

změnami intracelulárního mikroprostředí mohou měnit vlastnosti a metastatické chování nádorových buněk. O změnách glykosylace CD44 v nádorových buňkách je dosud známo velmi málo i proto, že dosud není přesně objasněna ani její regulace v buňkách normálních.

Ztráta kontaktů nádorové buňky s okolními buňkami je podstatným krokem v časných fázích procesu metastatické kaskády. K uvolnění mezibuněčných kontaktů je nutná změna adhezivních vlastností buňky, ke které může přispívat změna profilu exprese molekul CD44. Zvýšená exprese CD44 může na jednu stranu usnadňovat vazbu hyaluronátu. Takto vytvořená pericelulární hyaluronátová „matrix“ může interferovat s adhezivními procesy v okolí, snižovat afinitu buňky k okolním hyaluronát-deficitním buňkám a následně vést k jejímu uvolnění z okolních vazeb. Vzhledem k interakcím molekuly CD44 se strukturami cytoskeletu je možné, že se CD44 podílí i na zvýšení motility nádorových buněk a usnadňuje jejich pohyb podél povrchů bohatých na hyaluronát. Na druhou stranu mohou molekuly CD44 svou účastí na degradaci hyaluronátu umožňovat nádorovým buňkám únik z prostředí bohatého na hyaluronát, popřípadě se podílet na procesu invaze do lymfatického či cévního systému. Vzhledem k již zmíněné funkci molekul CD44 v procesu angiogeneze je pravděpodobné, že se tyto molekuly rovněž podílejí na neovaskularizaci nově vzniklých metastatických ložisek (12).

Z dosud získaných poznatků vyplývá, že některých nádorech, např. v kolorektálních tumorech (58,59) v hepatocelulárním karcinomu (60), v adenokarcinomu žaludku (61-64), v maligním melanomu (65,66), v nádorech pankreatu (67) či kostní dřeni (68) souvisí exprese CD44 s horšími biologickými vlastnostmi nádoru i s horší prognózou. Bylo např. prokázáno, že monoklonální protilátka proti CD44s je in vitro schopna kompletně inhibovat vazbu buněk lidského melanomu (z buněčné linie SMMU2) k hyaluronátu a zároveň inhibovat metastatický potenciál nádorových buněk in vivo (65).

Existuje však i skupina nádorů, jako např. karcinomy prostaty (69-72), močového měchýře (73-77), nádory endometria (78) či spinocelulární kožní karcinomy (79), ve kterých je naopak snižená exprese CD44 znakem horších biologických vlastností a agresivnějšího chování nádoru. Po transfekci genu CD44s do buněčné linie krysího vysoce metastazujícího karcinomu prostaty bylo zjištěno snížení metastatického potenciálu, ale tumorigenicita a úroveň růstu nádorové linie in vivo sníženy nebyly (80).

Význam CD44 ve vybraných epitelových nádorech

Uroteliální karcinom močového měchýře

V uroteliálním karcinomu byly studovány zejména CD44s a variantní izoforma molekuly CD44v6 (73,75) ale i exprese dalších variantních izoform, např. CD44v3,5 a 10 (74) nebo CD44v2,5 a 6 (77). Přítomnost CD44 (resp. CD44 mRNA) byla zjišťována zejména v biotických vzorcích uroteliálních karcinomů i nenádorového urotelu pomocí širokého spektra metod, především imunohistologie, RT-PCR, Southern blotu či in-situ hybridizace. Použity byly i buňky definovaných buněčných linií získaných z karcinomů močového měchýře s rozdílnými biologickými vlastnostmi (74). Pozornost byla zaměřena především na korelaci exprese CD44 se stadiem nádoru hodnoceným podle TNM klasifikace, histologickou stavbou a stupněm diferenciacce nádorů, s biologickými charakteristikami buněčné nádorové populace, jako jsou proliferací aktivita nádorových buněk, DNA ploidie, či mitotický index a s prognózou nádorů (73-77).

V normálním urotelu je CD44s silně exprimován na membránách buněk a vykazuje výraznou stratifikaci, tzn. že je nejintenzivněji a nejvíce homogenně exprimován na vrstvách přiléhajících k bazální membráně, směrem k povrchovým vrstvám urotelu pak dochází k progresivnímu snížení exprese CD44s. Povrchové vrstvy buněk vykazují negativitu tohoto anti-

geny. Obdobná, i když o něco méně intenzivní, je pozitivita CD44v6 (event. CD44v3, v5 a v10).

Z výsledků většiny dosud provedených prací vyplývá, že v buňkách uroteliálního karcinomu je exprese CD44s i CD44v6 významně alterována. Přitom intenzita exprese uvedených molekul negativně koreluje se stupněm diferenciaci (grade) nádoru a s jeho progresí (stage), s vyšší úrovní buněčné proliferace a s metastazováním nádoru. V diferencovaných superficiálně rostoucích uroteliálních karcinomech jsou intenzita i obraz exprese CD44 prakticky stejné jako v normálním urotelu, často však dochází ke ztrátě stratifikace positivity. Nádory s nižším stupněm diferenciaci a nádory s pokročilou progresí vykazují nápadné alterace exprese CD44s i CD44v6, charakterizované především fokálními, popřípadě až úplným vymizením positivity, či výrazně heterogenní distribucí pozitivit (73,76). Ve špatně diferencovaných nádorech („high grade“) je exprese CD44 významně snížena, až negativní. (74,77). Nádory ploché či primárně invazivní vykazují častěji fokální ztrátu exprese CD44 molekul v porovnání s nádory papilárními (77). Nejednoznačný zůstává prognostický význam uvedených změn. Někteří autoři prokazují souvislost mezi down-regulací CD44s a CD44v6 a progresí onemocnění, časnou rekurencí či špatnou prognózou (75,76). Výsledky jiných studií však tento vztah nepotvrzují. Otázkou zůstává, do jaké míry souvisejí zjištěné alterace s metastatickým potenciálem nádorových buněk a do jaké míry může být úroveň exprese CD44 významným prognostickým ukazatelem uroteliálních karcinomů.

Karcinom ovaria

Karcinomy ovarii tvoří významnou skupinu nádorů ženského reprodukčního systému. K charakteristickým vlastnostem těchto karcinomů patří peritoneální diseminace. Je vysoce pravděpodobné, že v rozsevu nádorových buněk po mezotelu peritonea, tedy v progresi ovariálních karcinomů, hrají významnou roli adhezivní molekuly, včetně rodiny CD44. Výsledky studií zabývajících se významem těchto molekul jsou však velmi nejednoznačné, někdy dokonce protichůdné. Bylo např. zjištěno, že v iniciálních stadiích ovariálních karcinomů dochází k up-regulaci CD44s a CD44v3 a v6 forem ve srovnání s nenádorovou tkání. S postupující progresí nádoru však dochází k významnému snížení exprese uvedených molekul (81). V pokročilých stadiích karcinomu ovaria byla pak pozorována nízká úroveň exprese CD44s, CD44v3 a v6. Snížení exprese až úplná ztráta CD44v3 se jeví jako jednoznačně negativní prognostický ukazatel (81). V jiném souboru bylo popsáno u karcinomů vyššího stupně malignity (grade II, III) a u karcinomů se vzdálenými metastázami zvýšení exprese CD44s oproti nenádorovému epitelu. Pozitivita exprese CD44s byla signifikantně spojena s kratším intervalem přežití bez projevů nádorového onemocnění i celkového přežití (82). Zajímavé výsledky přinesla studie hodnotící expresi CD44s a β 1-integrinu v buněčných liniích normálního ovariálního epitelu a ovariálních karcinomů. Protilátka proti CD44s, ale nikoliv proti β 1-integrinu, inhibovala vazbu nádorových buněk k buňkám mezotelu in vitro (83). I v modelu na „nahých“ myších (nude mice) s implantovanými buňkami ovariálního karcinomu bylo zjištěno výrazné snížení počtu buněčných implantátů nádoru po aplikaci protilátky proti CD44s (84). Výsledky dosud provedených studií svědčí pro významnou roli molekul CD44 v progresi ovariálních karcinomů.

Karcinom mléčné žlázy

Karcinom mléčné žlázy je druhou nejvýznamnější malignitou u žen středního věku. Stejně jako v jiných maligních nádorech je i u tohoto karcinomu nádorová transformace epitelových buněk provázána změnami adhezivních funkcí. Normální nenádorové epitelové buňky mléčné žlázy nevykazují (dle převážné většiny studií) expresi většiny CD44 antigenů. Přítomnost variantních molekul CD44v5, v6 a v9 byla

však v nenádorovém epitelu popsána. Myoepitelie naopak exprimují jak CD44s, tak i variantní izoformy. V buňkách stromálních je popisována exprese pouze CD44s, nikoliv jeho variantních izoform (85,86,87).

Nádorové buňky karcinomu mléčné žlázy vykazují zvýšenou expresi CD44, zejména variantních izoform. Zvýšená exprese CD44s a CD44v3, v5, v6, v9 a v10 byla zjištěna ve tkáni nemetastazujícího (88) i metastazujícího karcinomu (89). Zvýšená exprese CD44v3, v5 a v6 byla přítomna i na buňkách tvůrčích metastatická ložiska v lymfatických uzlinách (88). Na základě uvedených pozorování byly CD44v3 a v4 označeny za možné markery malignity. Výsledky všech dosud provedených studií se sice shodují v nálezech zvýšené exprese různých forem molekul CD44 v souvislosti s progresí nádorového onemocnění, zároveň však naznačují, že exprese CD44 sama o sobě nemůže být pokládána za faktor upřesňující prognózu onemocnění (90).

Hepatocelulární karcinom

Normální nenádorové hepatocyty neexprimují žádnou z forem molekul CD44 (91-93). Ve tkáni hepatocelulárního karcinomu je však popisována exprese CD44s a CD44v6, jakož i dalších variantních izoform, např. CD44v3, v5 a v8-v10. Opakovaně byla popsána souvislost mezi zvýšenou expresí CD44s, CD44v3, v6 a v10 a úrovní nádorové angioin vazby (60,92,94), ale nebyla prokázána korelace se stupněm malignity nádoru, či s úrovní proliferace nádorových buněk (92). Ze závěrů většiny prováděných studií vyplývá, že nejnižší expresi CD44 antigenů vykazují dobře diferencované nádory, s dediferenciací nádoru stoupá i úroveň exprese těchto antigenů. Špatně diferencované nádory exprimují sledované molekuly CD44 velmi výrazně. Dosud se však nepodařilo určit, které z molekul CD44 skupiny nejvýznamněji ovlivňují adhezivní vlastnosti buněk hepatocelulárního karcinomu a tím i jejich metastatický potenciál. K velmi zajímavým patří zjištění, že v jaterní tkáni postižené cirrhózou či chronickou hepatitidou je možné identifikovat nečetné hepatocyty vykazující pozitivitu CD44v5, v7, a v8-v10 (60). Chronická hepatitida i cirrhóza jsou považovány za prekancerózní stavy předcházející hepatocelulárnímu karcinomu, a proto se nabízí otázka, zda a jakým způsobem se molekuly CD44v podílejí na časně fázi procesu karcinogeneze.

Využití hodnocení úrovně exprese molekul CD44 pro určení prognózy hepatocelulárního karcinomu je nejednoznačné, i když může existovat i souvislost mezi výší exprese CD44s a délkou přežívání pacientů. Bylo např. zjištěno, že vyšší exprese CD44s je spojena s kratším intervalem přežití nemocných (93). Podle Terrise et al (94) úroveň exprese CD44s sice pozitivně koreluje s vaskulární invazí v nádoru, ale nikoliv s délkou přežívání pacientů.

Adenokarcinom žaludku

Výskyt exprese molekul CD44 v epitelových nádorech žaludku je předmětem studií od r. 1993, kdy Hieder et al. (95) prokázali významný rozdíl v expresi CD44v izoform v nenádorové tkáni a v adenokarcinomu žaludku. Pomocí analýzy CD44v RNA byla v nenádorové tkáni zjištěna jen nízká přítomnost CD44v6 a v5, zatímco v adenokarcinomu intestinálního typu byl detegován mnohem komplexnější vzorec exprese amplifikačních produktů, které hybridizovaly s exony v5 a v6. Ve vzorcích nádorů difuzního typu byla zachycena exprese v5, ale nikoliv v6 izoformy (95). Up-regulace CD44v5 a v6 izoform v karcinomu žaludku byla zjištěna i imunohistochemicky a pomocí Northern-blottingu. Ve špatně diferencovaných nádorech a v uzlinových metastázách převažovala zejména CD44v5 izoforma (96). Intenzivně byla ve sliznici žaludku za normálních i patologických okolností sledována exprese CD44v9. V nenádorovém epitelu žaludeční sliznice byla zastížena jen slabá pozitivita CD44v9, a to pouze v bazolaterálních úsecích buněk pylorických žlázek, ostatní epitelové buňky uve-

dený antigen neexprimovaly. V ložiscích intestinální metaplasie, jež je považována za preneoplastickou lézi, byla zjištěna slabá exprese CD44v9, ale častější než v nenádorovém epitelu. CD44v9 exprimující buňky byly lokalizovány v dolní třetině metaplastických žlázoých struktur. V adenomech, které jsou rovněž řazeny k prekancerózním lézím, byla ve 20% zjištěna relativně slabá pozitivita CD44v9. Naopak silná exprese tohoto antigenu byla zjištěna u 28% adenokarcinomů žaludku. Expresce CD44v9 pozitivně korelovala s vyšším stupněm malignity nádorů i s hloubkou jejich invaze. Nádory se založenými metastázami do lymfatických uzlin exprimovaly CD44v9 silněji než nádory bez metastáz (63). Z dalších variantních izoforem CD44 byly v karcinomech žaludku sledovány CD44v8-10. V intestinálním typu adenokarcinomu byla popsána zvýšená exprese těchto izoforem. Zvýšená exprese korelovala s vaskulární invazí a hematogenním šířením nádoru (97). V experimentálních in vitro podmínkách byla porovnáována vazebná aktivita CD44v5 a v6 negativních a pozitivních buněk SC-M1 linie adenokarcinomu žaludku pro hyaluronát. Buňky exprimující uvedené antigeny vykazovaly výrazně nižší vazebnou aktivitu, než buňky negativní. Po inkubaci s protilátkami proti CD44v5 a v6 antigenům došlo ke zvýšení vazebné aktivity v5 a v6 pozitivních buněk. Po transfekci vektoru obsahujícího CD44v5 a v6 do buněk negativních pro uvedené antigeny poklesla jejich vazebná kapacita pro HA na úroveň buněk CD44v5 a v6 pozitivních (98). Uvedené výsledky jsou v souladu se zjištěním, že jedním z mnoha mechanismů, jimiž může být regulována buněčná adheze, související s vazbou hyaluronátu, může být alternativní sestřih CD44 variantních izoforem (98).

Renální karcinom

Renální karcinom z jasných buněk, konvenční renální karcinom (KRK), je nejčastější tumor postihující ledviny dospělých osob. Studie věnované expresi CD44s a variantních forem ukazují, že zvyšující se exprese CD44s i variantních izoforem souvisí s horšími klinickopatologickými charakteristikami renálního karcinomu. Dosud nejednoznačné jsou však názory na význam exprese jednotlivých variantních izoforem v biologickém chování těchto nádorů. V normálním nenádorovém epitelu ledviny ani v dobře diferencovaných nádorech nebyla zjištěna přítomnost CD44v6 (99,101). Naopak v dediferencovaných KRK s vysokým TNM stagingem byla exprese CD44v6 popsána (102,103). Pozitivita CD44s byla zjištěna pouze sporadicky v buňkách distálních tubulů ledviny, a to zejména v oblastech atrofické tkáně přiléhající k nádoru. S vyšší gradingu nádoru i „nukleárního gradingu“ dle Fuhrmanové byl pozorován nárůst positivity CD44s. Vysokou intenzitu exprese CD44s vykazovaly velké nádory, jejichž průměr přesahoval 7 cm a také primární nádory pacientů, u kterých došlo v průběhu sledování k založení metastáz (101). Byla popsána i korelace vysoké exprese CD44s s prorůstáním KRK přes poudro, ve srovnání s nádory omezenými pouze na renální parenchym, kde byla úroveň exprese CD44s nízká (104). V experimentálních pracích byl potvrzen vliv CD44s molekul na adhezivní vlastnosti buněk a invazivitu KRK. Po inkubaci s antiCD44s došlo k významnému snížení invazivity nádorových buněk, zvýšení exprese CD44s bylo spojeno se zvýšením růstu a metastatického potenciálu nádorových buněk několika buněčných linií renálního karcinomu (105). Z uvedených výsledků je zřejmé, že proteiny CD44, zejména pak CD44s a v6, významně modifikují vlastnosti nádorových buněk RK a zvyšují jejich schopnost agresivního chování. Většina dosud publikovaných prací se shoduje v tom, že zvýšená exprese molekul skupiny CD44 je spojena s horším biologickým chováním nádorů.

Dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku

Dlaždicový nenádorový epitel silně exprimuje CD44s a CD44v6, vyjma keratinizované horní vrstvy epidermis. Dermální fibroblasty exprimují CD44s, jsou však prakticky negativní pro CD44v6. Ve vlasových folikulech a v potních žlázách je silná exprese CD44s i CD44v6 (79). I v různých benigních lézích dlaždicového epitelu byla zjištěna silná pozitivita CD44s i CD44v6, a to i v těch afekcích, které se vyznačují zvýšenou proliferací aktivitou epitelových buněk, např. v oblastech, ve kterých probíhalo hojení ran. V maligních nádorech bylo pozorováno snížení positivity CD44s a CD44v6 v souvislosti s dediferenčním nádoru. Nejvyšší úroveň exprese byla pozorována karcinomu G1, nádory G2 a G3 vykazovaly postupně slábnoucí expresi CD44s a CD44v6. Imunohistochemické stanovení exprese CD44s a CD44v6 a experimentální studie prováděné různými autory ukazuje, že snížení exprese CD44s a CD44v6 je obecně spojeno s maligní transformací dlaždicového epitelu a s horšími vlastnostmi spinocelulárních nádorů orofaciální oblasti (106-109). Souvislost mezi úrovní exprese CD44s a v6 a délkou přežívání pacientů je nejednoznačná (79), pouze ve studii Spafforda et al (106) byl nález snížené exprese CD44v6 u karcinomu laryngu spojen s kratší dobou přežívání nemocných.

Nemalobuněčné plicní karcinomy

Expresce CD44s, CD44v6 a dalších variantních izoforem, např. CD44v3, v4, v5, v7 a v10 byla v nemalobuněčných plicních karcinomech sledována mnoha autory. Nejvíce studovány byly standardní forma CD44s a izoforma CD44v6. Výsledky dosud provedených studií jsou však značně konfliktní. Zatímco někteří autoři popisují korelaci zvýšené exprese CD44v6, popřípadě i CD44s a CD44v3 s horším chováním karcinomu, např. se zvýšenou proliferací aktivitou, s kratší dobou přežívání, s vyšší incidencí metastáz, s vyšším TNM stagingem, s velikostí nádoru apod. (110-114), jiní prokázali korelaci exprese uvedených antigenů pouze s typem nádoru (117-118) (vyšší exprese CD44v6 u spinocelulárních nádorů, nižší až negativní u adenokarcinomů či anaplastických nádorů). Vzhledem ke značně rozporuplným výsledkům dosud provedených studií není využití CD44s či variantních izoforem v diagnostice a určení prognózy nemalobuněčných plicních karcinomů zatím možné.

Závěr

Na základě dosud získaných znalostí lze shrnout, že funkční vlastnosti CD44s a variantních izoforem CD44v v nádorových buňkách závisí zejména na typu exprimované izoformy, na úrovni glykosylace a na buněčném mikroprostředí, ve kterém se buňka nachází. Navíc vazebná role molekul CD44 je různá v různých typech epitelových buněk normálních tkání. U epitelových nádorů způsob exprese molekul CD44 nesporně souvisí s jejich histogenezí a se stupněm diferenciací nádorových buněk. Komplexnost exprese CD44 a pravděpodobnost, že neexistuje univerzální „metastatická“ nebo „infiltrativní“ izoforma, anebo alespoň určitý omezený počet izoforem, jejichž exprese predisponuje k metastatickému chování, může snížit přímou použitelnost analýzy exprese CD44 pro účely rutinní diagnostiky nebo pro určení prognózy nádorů. Pro objasnění role alterací molekul CD44 ve vzniku, progresi a biologickém chování maligních nádorů je nezbytný další výzkum, který pomůže vysvětlit rozdílné výsledky dosud provedených studií, a určit případný prognostický význam změn exprese těchto molekul.

Poděkování: Práce byla sestavena s podporou grantového projektu GAUK 30/2001/C.

Jitka Kuncová, Urologická klinika FNKV a UK-3.LF Praha, e-mail: kuncova@fnkv.cz

Literatura

1. Šedo, A., Mandys, V., Křepela, E.: Cell membrane-bound proteases: Not „only“ proteolysis. *Physiol. Res.*, 1996; 45: 169-176
2. Cavallaro, U., Christofori, G.: Cell adhesion in tumour and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1552: 39-45
3. Wilson, G. A.: *Cell Adhesion Molecules, Fundamental Facts. R&D Systems*; 1996,
4. Marečková, Z., Heller, S., Horký, K.: Buněčné adhezivní molekuly a jejich úloha v patofyziologických dějích. *Vnitřní lékařství*, 1999; 45: 1: 46-50
5. Koukolis, G. K., Patriarca, C., Gould, V. E.: Adhesion molecules and tumor metastasis. *Hum. Pathol.*, 1998; 9: 889-892
6. Goodfellow, P.N., Banting, G., Wiles, M. V., et al.: 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; 12: 659-663
7. Dougherty, G. J., Lansford, P.M., Cooper, D.L., Humphries, R. K.: Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte homing receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.*, 1991; 174: 1-5
8. Sreanion, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I., Jackson, D.G.: 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; 268: 12 235
9. Tolg, C., Hofmann, H., Herrlich, P., Ponta, H.: Splicing choice from 10 variant exons establishes CD44 variability. *Nucl. Acids. Res.*, 1993; 21: 1225-1229
10. Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M. et al.: CD44 splice variants confer metastatic behaviour in rats : homologous sequences are expressed in human tumour cell lines. *Cancer. Res.*, 1991; 51: 5292-7
11. Gallagher, T.: The protein and proteoglycan guises of Hermes/CD44. *Glycobiology*, 1991; 6: 861-70
12. Sneath, R. J. S., Mangham, D. C.: The normal structure and function of CD 44 and its role in neoplasia. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, 1998; 51: 191-200
13. Goodison, S., Urquidí, V., Tarin, D.: CD44 cell adhesion molecules. *J. Clin. Pathol.:Mol.Pathol.*, 1999; 52: 189-196
14. Brown, T., Buouchar, T., St. John, T., et al.: Human keratinocyte express a new CD44 core protein as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell. Biol.*, 1991; 113: 207-21
15. Trowbridge, I., Lesley, J., Schulte, R. et al.: Biochemical characterisation and cellular distribution of a polymorphic murine cell surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. *Immunogenetics*, 1982; 15: 299-312
16. Hughes, E., Mencod, G., Aucrust, T.: Murine cell surface glycoproteins. Characterisation of a major component of 80,000 daltons as a polymorphic differentiation antigen of mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 7023-7
17. Cooper, D., Dougherty, G., Harn, H., et al.: The complex CD44 transcriptional unit: Alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 182: 569-78
18. Fox, S., Fawcett, J., Jackson, D., et al.: Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res.*, 1994; 54: 4539-46
19. Mackay, C., Terpe, H.-J., Stauder, R., et al.: Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J. Cell. Biol.*, 1994; 124: 71-82
20. Borland, G., Ross, J., A., Guy, K.: Forms and functions of CD44. *Immunology*, 1988; 93: 139-148
21. Sleeman, J., Moll, J., Sherman, L., et al.: The role of the CD44 splice variants in human metastatic cancer. In: *Cell adhesion and human disease*. Chichester: Wiley, 1995: 142-156
22. Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., et al.: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 1991; 65: 13-24
23. Fox, S., Gatter, K., Jackson, D., et al.: CD44 and cancer screening. *Lancet*, 1993; 342: 548-9
24. Wirth, K., Arch, R., Somasundaram, C., et al.: Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats. *Eur. J. Cancer.*, 1993; 294: 1172-7
25. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., et al.: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, 1990; 61: 1303
26. Yang, B., Yang, B.L., Savani, R.C., et al.: Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.*, 1994; 13: 286-96
27. Peach, R.J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., et al.: Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell. Biol.*, 1993; 122: 257-64
28. Weber, G., F., Ashkar, S., Glimcher, M., J., et al.: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 1996; 271: 509-12
29. Faassen, A. E., Schraeger, J., A., Klein, D., J., et al.: 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; 116: 521-31
30. Jalkanen, S., Jalkanen, M.: Lymphocyte CD44 binds the COOH terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.*, 1992; 116: 817-25
31. Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., et al.: A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell adherence-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 7437-44
32. Knutson, J. R., Iida, J., Fields, G., B., et al.: CD44/chondroitin sulfate glycoproteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol. Biol. Cell.*, 1996; 7: 383-96
33. Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M.: A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int. Immunol.*, 1994; 6: 655-60
34. Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., et al.: The haematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.*, 1991; 10: 343-8
35. Bennet, K., Modrell, B., Greenfield, K., et al.: Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variable spliced exons. *J. Cell. Biol.*, 1995; 131: 1623-33
36. Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., et al.: Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J. Exp. Med.*, 1995; 182: 419-29
37. Lesley, J., English, N., Perschl, A., et al.: Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronate receptor CD44 show differences in glycosylation. *J. Exp. Med.*, 1995; 182: 431-7
38. Lesley, J., Hyman, R., Kincaid, P.W.: CD44 and its interactions with extracellular matrix. *Adv. Immunol.*, 1993; 54: 271-335
39. Liu, D., Liu, T., Sy, M. S.: Identification of two regions in the cytoplasmic domain of CD44 through which PMA calcium, and forskolin differentially regulate the binding of CD44 to hyaluronic acid. *Cell. Immunol.*, 1998; 190: 132-40
40. Bourguignon, L., Y., W., Zhu, D., Zhu, H.: CD44isoform- cytoskeleton interaction in oncogenic signalling and tumor progression. *Front. Biosci.*, 1998; 3: D637-49
41. Lokeshwar, V., B., Fregien, N., Bourguignon, L., Y., W.: Ankyrin binding domain of CD44 (GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell. Biol.*, 1994; 126: 1099-109
42. Zhu, D., Bourguignon, L., Y., W.: The ankyrin binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumour cell transformation. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 1998; 39: 209-22
43. Bourguignon, L., Y., W., Gunja-Smith, Z., Iida, N., et al.: 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; 176: 206-15
44. Liu, D., Sy, M.S.: A cysteine residue located in the transmembrane domain of CD44 is important in binding of CD44 to hyaluronic acid. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 1987-94
45. Peach, R., J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I., et al.: Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell. Biol.*, 1993; 122: 257-64
46. Alho, A., M., Underhill, C., B.: The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, 1989; 108: 1557-65
47. Jain, M., He, Q., Lee, W., S., et al.: Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 877
48. Trochon, V., Mabilat, C., Bertrand, P., et al.: Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis *in vitro*. *Int. J. Cancer.*, 1996; 66: 664-8
49. Sherman, L., Sleeman, J., Dall, P., et al.: The CD44 protein in embryonic development and in cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996; 213: 249-69
50. McKee, C., M., Penno, M., B., Cowman, M., et al.: Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 2403-13
51. West, D., Kumar, S.: The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp. Cell. Res.*, 1989; 183: 179-96
52. Lees, V., Fan, T., West, D.: Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab. Invest.*, 1995; 73: 259-66
53. Cooper, D., L., Dougherty, G. J.: To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat. Med.*, 1995; 1: 635-7
54. Green, S., J., Tarone, G., Underhill, C., B.: Aggregation of macrophages and fibroblasts is inhibited by a monoclonal antibody to the hyaluronate receptor. *Exp. Cell. Res.*, 1988; 178: 224-32
55. Underhill, C.: CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell. Sci.*, 1992; 103: 293-8
56. Gunthert, U.: CD44 in malignant disorders. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996; 312: 271-285
57. Goodison, S., Tarin, D.: Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia. *Front. Biosci.*, 1998; 3: 89-100
58. Choi, S., H., Takahashi, K., Eto, H., et al.: CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int. J. Cancer*, 2000; 85: 523-526
59. Isozaki, H., Ohyama, T., Mabuchi, H., et al.: Expression of cell adhesion molecule CD44 and sialyl Lewis A in gastric carcinoma and colorectal carcinoma in association with hepatic metastases. *Int. J. Oncol.*, 1998; 13: 935-942
60. Endo, K., Terada, T.: Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J. Hepatol.*, 2000; 32: 78-84
61. Mayer, B., Jauch, K., Gunthert, U., et al.: De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet*, 1993; 342: 1019-22
62. Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T., et al.: Expression of a CD44 variant exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14: 1122-7
63. Yasui, W., Kudo, Y., Naka, H., et al.: Expression of CD4 containing variant exon 9 (CD44v9) in gastric adenomas and adenocarcinomas: Relation to the proliferation and progression. *Int. J. Oncol.*, 1998; 12: 1253-8
64. Hsieh, H., F., Yu, J., C., Ho, L., I., et al.: Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer. *J. Clin. Pathol.:Mol. Pathol.*, 1999; 52: 5-28

65. Guo, Y., Ma, J., Wang, J., et al.: Inhibition of human melanoma growth and metastasis *in vivo* by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 1994; 54: 1561-5
66. Manten, H., E., Danen, E., H., J., Smit, L., et al.: Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int. J. Cancer*, 1995; 64: 182-8
67. Gansauge, F., Gansauge, S., Zobywalski, A., et al.: Differentiation expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5499-503
68. Bendall, L., J., Bradstock, K., F., Gottlieb, D., J.: Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells. *Leukemia*, 2000; 14: 1239-46
69. De Marzo, A., M., Bradshaw, C., Sauvageot, J., et al.: CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. *Prostate*, 1998; 34: 162-8
70. Miyake, H., Hara, U., Okamoto, I., et al.: Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J. Urol.*, 1998; 160: 1562-6
71. Aaltoma, S., Lipponen, P., Ala-Opas, M., et al.: Expression and prognostic value of CD44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. *Eur. Urol.*, 2001; 39: 138-44
72. Aaltoma, S., Lipponen, P., Viitanen, J., et al.: Prognostic value of CD44 standard, variant isoforms 3 and 6 and catenin expression in local prostate cancer treated by radical prostatectomy. *Eur. Urol.*, 2000; 38: 555-62
73. Hong, R., L., Pu, Y., S., Hsieh, T., S., et al.: Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J. Urology*, 1995; 153: 2025-8
74. Southgate, J., Trejdosiowicz, L., K., Smith, B., et al.: Patterns of splice variants of CD44 expression by normal human urothelium *in situ* and *in vitro* and by bladder-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 1995; 62: 449-456
75. Lipponen, P., Aaltoma, S., Kosma, V., M., et al.: Expressions of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J. Pathol.*, 1998; 186: 157-164
76. Toma, V., Hauri, D., Schmidt, U., et al.: Focal loss of CD44 variant protein expression is related to recurrence in superficial bladder carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 1999; 155: 1427-1432
77. Sugino, T., Gorham, H., Yoshida, K., et al.: Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am. J. Pathol.*, 1996; 149: 873- 882
78. Ayhan, A., Tok, E., C., Bildirici, I., et al.: Overexpression of CD44 variant 6 in human endometrial cancer and its prognostic significance. *Gynecol. Oncol.*, 2001; 80: 355-8.
79. Soukka, T., Salmi, M., Joensuu, H., et al.: Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res.*, 1997; 57: 2281-89
80. Gao, A., Lou, W., Dong, J., T., et al.: CD44 is a metastasis suppressor gene located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.*, 1994; 54: 1561-5
81. Saegusa, M., Machida, D., Hashimura, M., et al.: CD44 expression in benign, premalignant and malignant ovarian neoplasms: relation to tumour development and progression. *J. Pathol.*, 1999; 189: 326-337
82. Kayastha, S., Freedman, A., N., Piver, M. S., et al.: Expression of the hyaluronan receptor, CD44s, in epithelial ovarian cancer is an independent predictor of survival. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 1073-76
83. Cannistra, S., A., Kansas, G., S., Niloff, J., et al.: Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro* is partly mediated by CD44H. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3830-38
84. Strobel, T., Swanson, L., Cannistra, S., A.: *In vivo* inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer Res.*, 1997; 57: 1228-32
85. Dall, P., Heider, K., H., Sinn, H., P., et al.: Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 1995; 60: 471-77
86. Sinn, H., P., Heider, K., H., Skroch – Angel, P., et al.: Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1995; 6: 307-13
87. Bankfalvi, A., Terpe, H., J., Breukelmann, D., et al.: Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumour progression. *Histopathology*, 1998; 33: 107-16
88. Kaufmann, M., Heider, K., H., Sinn, H., P., et al.: CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet*, 1995; 34: 615-619
89. Friedrichs, K., Franke, F., Lisboa, B., W., et al.: CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5424-33
90. Jansen, R., H., Joosten-Achjanie, S., R., Arends, J., et al.: CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann. Oncol.*, 1998; 9: 109-11
91. Ashida, K., Terada, T., Kitamura, Y., et al.: Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology*, 1998; 27: 974-82
92. Mathew, J., Hines, J., E., Obafunwa, J., O., et al.: CD44 is expressed in hepatocellular carcinoma showing vascular invasion. *J. Pathol.*, 1996; 179: 74-9
93. Washington, K. Telen, M., J., Gottfried, M., R.: Expression of cell adhesion molecule CD44 in primary tumors of the liver? an immunohistochemical study. *Liver*, 1997; 17: 17-23
94. Terris, B. Puig, P., L., Belghiti, J., et al.: Prognostic influence of clinicopathological features, DNA-ploidy, CD44H and p53 expression in a large series of resected hepatocellular carcinoma in France. *Int. J. Cancer*, 1997; 74: 614-9
95. Heider, K., H., Dammrich, J., Skroch-Angel, P., et al.: Differentiation expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinoma and normal gastric mucosa. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4197-203
96. Harn, H., J., Ho, L. I., Chang, J., Y., et al.: Differentiation expression of human metastasis adhesion molecule CD44 in Chinese stomach carcinoma. *Cancer*, 1995; 75: 1065-71
97. Yamaguchi, A., Saito, M., Goi, T., et al.: Expression of CD44 variant exons 8-10 in gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995; 86: 1166-71
98. Harn, H., Shen, K., L., Liu, C., A., et al.: Hyaluronate binding assay study of transfected CD44v4-7 isoforms into human gastric carcinoma cell line SC-M1. *J. Pathol.*, 1998; 184: 291-6
99. Heider, K., H., Ratschek, M., Zatloukal, K., et al.: Expression of CD44 isoforms in human renal cell carcinomas. *Virchows. Arch.*, 1996; 428: 267-273
100. Kennel, S., J., Lankford, T., K., Foote, L., J., et al.: CD44 expression in murine tissues. *J. Cell. Sci.*, 1993; 104: 33-382
101. Daniel, L., Lechevalier, E., Giorgi, R., et al.: CD44s and CD44v6 expression in localized T1-T2 conventional cell carcinomas. *J. Pathol.*, 2001; 193: 345-49
102. Paradis, V., Ferlicot, S., Ghannam, E., et al.: CD44 is an independent prognostic factor in conventional renal cell carcinomas. *J. Urol.*, 1999; 198: 84-87
103. Terpe, H., J., Storckel, S., Zimmer, U., et al.: Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. *Am. J. Pathol.*, 1996; 148: 453-63
104. Gilcrease, M., Z., Truong, L., Brown, R., W.: Correlation of very late activation integrin and CD44 expression with extrarenal invasion and metastasis of renal cell carcinomas. *Hum. Pathol.*, 1996; 27: 1355-60
105. Koga, H., Naito, S., Nakashima, M., et al.: A flow cytometric analysis of the expression of adhesion molecules on human cell carcinoma cells with different metastatic potentials. *Eur Urol.*, 1997; 31: 86-91
106. Spafford, M., F., Koeppel, J., Pan, Z., et al.: Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal cell squamous carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head&Neck Surg.*, 1996; 122: 627-32
107. Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., et al.: Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J. Cell. Biol.*, 1993; 122: 431-42
108. Hudson, D., L., Speight, P., M., Watt, F., M.: Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int. J. Cancer*, 1996; 66: 457-463
109. Seelentag, W., K., F., Gunthert, U., Saremaslani, P., et al.: CD44 standard and variant isoform expression in human epidermal skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulated during proliferation and tumor de-differentiation. *Int. J. Cancer*, 1996; 69: 218-224
110. Miyoshi, T., Kondo, T., Hino, N., et al.: The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *clin. Cancer Res.*, 1997; 3: 1289-97
111. Hirata, T., Fukuse, T., Naiki, H., et al.: Expression of the CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res.*, 1998; 1108-10
112. Tran, T., A., Kallakury, B., V., Sheehan, C., E., et al.: Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum. Pathol.*, 1997; 28: 809-14
113. Wimmel, A., Schilli, M., Kaiser, U., et al.: Preferential histiotypic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer*, 1997; 16: 151-172
114. Givechian, M., Woerner, S., Lacroix, J., et al.: Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and bronchial carcinomas: No evidence for altered CD44 splicing in metastasis. *Oncogene*, 1996; 12: 1137-44
115. Fasano, M., Sabatini, M., T., Wieczorek, R., et al.: CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: A role in histogenesis? *Cancer*, 1997; 80: 34-41
116. Fukuse, T., Hirata, T., Naito, H., et al.: Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant isoforms in the primary and metastatic sites of non-small cell lung carcinoma with intrapulmonary metastases. *Cancer*, 1999; 86: 1174-81
117. Sasaki, J., I., Tanabe, K., K., Takahashi, K., et al.: Expression of CD44 splicing isoforms in lung cancers: Dominant expression of CD44v8-10 in non-small cell lung carcinomas. *Int. Oncol.*, 1998; 12: 525-33
118. Carbone, P., Spaggiari, L., Romani, A., et al.: Expression of human CD44v6 in non-small cell lung cancer. *Eur. Surg. Res.*, 1998; 30: 403-408