

Seite 1

Aus der Medizinischen Klinik I – Gastroenterologie, Infektiologie und
Rheumatologie der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifizierung der hepatischen extrazellulären Bindungsstruktur von
biologisch aktivem Keratinozytenwachstumsfaktor**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ines Schönfelder

aus Rostock

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Somasundaram
 2. Prof. Dr. med. B. Wittig
 3. Priv. Doz. Dr. med. T. Zimmer

Datum der Promotion 08.04.11

Für Papa

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
1 Fibrose der Leber.....	1
2 Wundheilung.....	1
3 Proteine der extrazellulären Matrix (EZM).....	3
4 Kollagene.....	3
5 Glykoproteine.....	4
6 Proteoglykane.....	5
7 Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Molekülen der EZM.....	5
8 Keratinozytenwachstumsfaktor- KGF.....	7
9 Ziel und Fragestellung.....	9
10 Material und Methoden.....	10
11 Reagenzien.....	10
12 Materialien und Geräte.....	11
13 Kollagene und Kollagenmimetika.....	12
14 Immunhistologie.....	13
15 Radioaktive Markierung.....	14
16 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE).....	15
17 Bindung von [^{125}J] -KGF an immobilisierte Kollagene und Glykoproteine	16
18 Ligandenblot auf Nitrozellulosemembranen.....	17
19 Dotblot auf Nitrozellulosemembranen.....	18
20 Inhibitionsexperimente.....	19
21 Sättigungsexperimente.....	19
22 Abhängigkeit der Bindung von der Salzkonzentration.....	19
23 Zellkultur.....	19
24 Proliferationsversuche mit HaCat-Zellen und KGF.....	20
25 Mathematische und statistische Auswertung.....	20
26 Ergebnisse.....	22
27 KGF bindet an die EZM humaner zirrhotischer Leber.....	22

<u>28 Bindung von KGF an Kollagene/Analoga.....</u>	<u>22</u>
<u>29 Inhibition der KGF-Bindung durch Kollagene/Analoga.....</u>	<u>25</u>
<u>30 Heparin als Kompetitor der KGF- Kollagen Interaktion, Einfluß der Osmolarität.....</u>	<u>30</u>
<u>31 Sättigbarkeit der Bindung und Affinität der KGF- Kollagen- Interaktion.....</u>	<u>31</u>
<u>32 Kollagen-gebundenes KGF ist biologisch aktiv.....</u>	<u>32</u>
<u>33 Diskussion.....</u>	<u>34</u>
<u>34 Zusammenfassung.....</u>	<u>42</u>
<u>35 Abkürzungen.....</u>	<u>43</u>
<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>45</u>
<u>36 Danksagung.....</u>	<u>50</u>

Einleitung

1 Fibrose der Leber

Die Leberzirrhose beschreibt ein fortgeschrittenes Stadium der Zerstörung der normalen Leberarchitektur und ist durch eine verstärkte Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) mit Ausbildung porto-portaler und porto-zentraler Septen und typischer Regeneratknoten charakterisiert (1, 2). Durch die Septenbildung, die mit einer Kapillarisation der Sinusoide einhergeht, wird ein Großteil des Blutes am noch verbliebenen Leberparenchym vorbeigeleitet, was zu einer Verminderung der Metabolisierungsleistung, der Ausbildung eines Pfortaderhochdrucks und zu den bekannten klinischen Veränderungen (z.B. Ascites, Oesophagusvarizen, Enzephalopathie, Gerinnungsstörungen) bei Leberzirrhose führt (1, 3). Ätiologisch sind es vor allem nutritiv-toxische, virale, autoimmune, metabolische, parasitäre, venös-obstruktive und cholestatische Ursachen, die zu einer chronischen Schädigung des Leberparenchyms und damit zu einer Leberzirrhose führen können (4). Der Leberzirrhose voran geht die Leberfibrose, die per definitionem eine quantitative Vermehrung der EZM ohne endgültige Zerstörung der Leberarchitektur beschreibt und reversibel ist, da die architektonische Umbildung der Leber mit der vermehrten Gefäßbildung noch nicht stattgefunden hat. Die Mehrablagerung von Komponenten der EZM ist dabei die Summe aus vermehrter Synthese (Fibrogenese) und verminderter Auflösung von Matrix. Neben der Bekämpfung der kausalen Ursachen der jeweiligen Lebererkrankung zielt die Entwicklung von Therapien bestehender Zirrhosen/ Fibrosen auf eine Verringerung der Fibrogenese bzw. die Stimulierung der Fibrolyse. Organfibrosen aufgrund von chronischer Schädigung können auch als Narbenbildung einer Wunde verstanden werden. Eine hier zu weit gehende Therapie würde zum Zerfall der Leber führen, welche in ihrem geschädigten Zustand durch das Narbengewebe zusammengehalten wird.

Im Folgenden sollen die für Fibrogenese und Fibrolyse der EZM verantwortlichen zellulären und molekularen Mechanismen kurz und exemplarisch dargestellt werden. Ein besonderer Schwerpunkt soll dabei auf den bisher bekannten Interaktionen von Wachstumsfaktoren allgemein und speziell dem KGF mit einzelnen Komponenten der EZM liegen.

2 Wundheilung

Das Ziel der Wundheilung ist die Wiederherstellung der Integrität des Gewebes nach einer Verletzung. Nach erfolgreicher Blutstillung bei Mitverletzung von Gefäßen, wandern nach kurzer Zeit Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten in das betroffene Gebiet ein und phagozytieren dort Bakterien, Nekrosen und Fremdkörper (5, 6). Die lokale

Einleitung

Gefäßerweiterung, ausgelöst durch u.a. Granulozyten sezerniertes Prostaglandin E2 und Histamin, führt zur Verlangsamung des Blutstroms, wodurch der Durchtritt von weißen Blutkörperchen durch die Kapillarwand weiter begünstigt wird. Als chemotaktische Lockstoffe für diese Zellen sind unter anderem Komplementfaktoren, z.B. C3b, C5-9, und Thrombozytenfaktoren, z.B. Fibrinogen, Fibronectin, v.Willbrand- Faktor, Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) (7), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) (8, 9) und Transformierender-Wachstumsfaktor β (TGF β) identifiziert worden (10, 11).

Nach der Blutstillung und Phagozytose beginnt die eigentliche Wundheilung. Sie ist gekennzeichnet durch die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese), die Vermehrung der Fibroblasten und deren verstärkte Kollagensynthese (5). Normalerweise, d.h. in der unverletzten Haut stehen Matrixsynthese (Fibrogenese) und Auflösung von Matrix (Fibrolyse) im Gleichgewicht (12). Während unter Ruhebedingungen in der Haut der EZM-Umsatz gering ist, kann er im Falle einer Schädigung sehr stark aktiviert werden. Ziel ist dabei eine *restitutio ad integrum* im Rahmen der Wundheilung. Liegt jedoch eine tiefgehende Verletzung vor, dann überwiegt die Fibrogenese mit der Folge einer Narbenbildung.

Die reifen Fibrozyten am Wundgrund produzieren eine Reihe von Faktoren, unter anderem KGF (13), das die epidermalen Keratinozyten, die von den Wundrändern her ins Wundgebiet einwandern, zur Teilung anregt (14-16). In zeitlicher und räumlicher Koordination mit der Fibroblastenproliferation und der Gefäßneubildung wird die Wunde verschlossen. Die Gefäßneubildung wird von dem aus Thrombozyten und Fibrozyten freigesetzten KGF gefördert, das zusammen mit anderen angiogenen Wachstumsfaktoren (Vascular endothelial growth factor; VEGF) (17) die Proliferation und röhrenförmige Anordnung der Endothelzellen in Gang setzt und unterhält (18). KGF hat eine große Bedeutung für die Neovaskularisierung in Geweben mit geringem Defekt bzw. für die Heilung größerer Wunden (19). Die KGF-Expression in Ratten stieg nach Wundsetzung relativ rasch (einen Tag später) um das 160fache an (20). Das Fehlen des FGFR in Keratinozyten von Haut transgener Mäuse (dominant negativer FGFR), führte nach Wundsetzung in atrophischer Epidermis zu abnormen Haarfollikeln und einer ungenügenden Reepithelarisierung (21). Andererseits heilten Wunden bei KGF-knockout-Mäusen normal (13, 22). Das Ergebnis stützt die These, dass andere Wachstumsfaktoren z.B. FGF-10, der ebenfalls an FGFR 2IIIb bindet, ähnliche Aufgaben erfüllen kann und hier KGF ersetzt (23). Zusätzlich zu den spezifischen Liganden-Rezeptorinteraktionen sind aber auch Wechselwirkungen der extrazellulären Matrix mit Wachstumsfaktoren bekannt, was besonders bei Fibrosen mit ihrer verstärkten und veränderten Matrixsynthese relevant wird.

3 Proteine der extrazellulären Matrix (EZM)

Die EZM ist ein fibrilläres Netzwerk von Proteinen, die in einer spezifischen dreidimensionalen Struktur zusammengefügt sind. Die EZM determiniert nicht nur die spezifische Histomorphologie der einzelnen Organe und Gewebe, sondern nimmt über verschiedene Mechanismen funktionellen Einfluss z.B. auf Zellwachstum, -differenzierung, -migration oder Apoptose. Zu den Molekülen der EZM zählen im klassischen Sinne die Kollagene, die nicht-kollagenen Glykoproteine, die Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane und die elastischen Fasern. Jedoch ist die Zuordnung im Rahmen dieser traditionellen Einteilung im Einzelfall sehr schwierig, da Matrixmoleküle Komponenten verschiedener Untergruppen in sich vereinen können. So enthalten beispielsweise bestimmte Kollagene Glykosaminoglykanseitenketten oder große nicht-kollagene (Protein-) Domänen, die z.T. 70- 90% ihres Molekulargewichtes ausmachen (Kollagen VI, XII, XIV). In einer erweiterten Definition der EZM, die den vielfältigen Funktionen der EZM verstärkt Rechnung trägt, werden auch Matrix-assoziierte Moleküle erfasst: Hierzu gehören verschiedene Wachstumsfaktoren, EZM-abbauende Enzyme (Matrixmetalloproteinasen, MMPs), ihre Inhibitoren und Zellrezeptoren für Komponenten der EZM (1). Die Wechselwirkung der EZM mit Zellen kann u.a. über drei verschiedene Prozesse der Informationsweiterleitung geschehen: Zellen können über spezifische Ligandensequenzen auf der EZM Signale über ihre Rezeptoren, z.B. den Integrinen, weiterleiten (1). Außerdem können Signale mittels mechanischer Kraft von der EZM auf die Zellen mittels Mechanotransduktionen transferiert werden und direkt an das Zytoskelett weitergegeben werden (1). Andererseits können EZM-gebundene Wachstumsfaktoren lokal mit Zellen interagieren (12).

4 Kollagene

Schon der Begriff Kollagen, von den griechischen Worten für "Leim erzeugen", weist auf die charakteristischen unlöslichen Fasern mit hoher Zugfestigkeit hin. Quantitativ machen Kollagene den größten Anteil der EZM-Moleküle aus und sind außerdem die am häufigsten vorkommenden Proteine des Organismus (24). Die typische kollagene Tripelhelix setzt sich aus homo- oder heterotrimeren Molekülen zusammen mit der repetitiven Aminosäuresequenz Gly-Xaa-Yaa, wobei in den klassischen, fibrillenbildenden Kollagenen der Glycinanteil ca. 33% der Aminosäuresequenz ausmacht und die Position Xaa/Yaa zu 10- 15% mit Prolin bzw. der Kollagen-spezifischen und posttranslational gebildeten Aminosäure Hydroxyprolin besetzt sind. Für die Stabilität der Tripelhelix ist dabei vor allem der Hydroxilierungsgrad der Prolin von hoher Bedeutung (25, 26). Die 27 bisher bekannten Kollagene können zwei Hauptklassen zugeordnet werden: den Fibrillenbildenden Kollagenen (Kollagen I, II, III, V und XI) oder den sehr heterogenen, nicht-

Einleitung

fibrillären Kollagenen mit verschiedenen nicht-kollagenen Domänen. Im Rahmen einer Leberfibrose werden diese quantitativ bis zu 10fach höher exprimiert aber auch qualitativ durch andere Kollagene ersetzt (27). Die erste Tabelle soll die in der Arbeit verwendeten Kollagene in ihrer Zusammensetzung und Vorkommen vorstellen.

Tabelle 1: Kollagenzusammensetzung der Leber

Kollagen	Zusammensetzung	Vorkommen
I	$(\alpha 1(I))_2, \alpha 2(I)$	grosse interstitielle Fibrillen/ Haut
II	$(\alpha 1(II))_3$	hyaliner Knorpel, Glaskörper
III	$(\alpha 1(III))_3$	grosse interstitielle Fibrillen
IV	$(\alpha 1(IV))_2, \alpha 2(IV)$	Basalmembran
V	$(\alpha 1(V))_2, \alpha 2(V)$ oder $\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Gefässintima
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	interstitielle Mikrofibrillen

Interessanterweise konnte für einige Kollagene gezeigt werden, dass nicht nur die Gesamtmoleküle, sondern auch Fragmente einzelner Kollagene, die beim Kollagenabbau entstehen, biologisch aktiv sind. So zeigen Pepsin-abgebaute Kollagen VI-Fragmente einen Proliferations-fördernden Effekt auf verschiedene mesenchymale Zelllinien (u. a. hepatische Sternzellen) und ein N-terminales Fragment des nicht-kollagenen Anteils von Kollagen XIV bindet an Decorin und Heparin und interagiert hier mit seinem Rezeptor CD44-CS (Chondroitin-Dermatan-Sulfat-Variante) und löst eine Zelldifferenzierung aus (1, 28). Diese wenigen Beispiele verdeutlichen, dass Kollagene bzw. Teilstücke von Kollagenen jenseits der Strukturhaltung der Organe sehr komplexe Funktionen haben bzw. erwerben können.

5 Glykoproteine

Die nichtkollagenen Glykoproteine der EZM zeichnen sich durch ihre multiplen Wirkungen wie z.B. Proliferationsförderung, adhäsive und anti-adhäsive Effekte aus, die sie auf umgebende Zellen ausüben, aber auch durch Wechselwirkungen mit anderen EZM-Komponenten, wodurch sie zu essentiellen Bausteinen der EZM werden. Ein Merkmal der Glykoproteine ist das Vorkommen von repetitiven Domänen in ihrer Aminosäuresequenz und die hierdurch bedingte modulare Struktur (1). Exemplarisch für den strukturellen Aufbau der Glykoproteine sollen hier nur Fibronectin, das mit Wachstumsfaktoren interagiert, Laminin und ein EZM-Rezeptor, das Integrin beschrieben werden.

Fibronectin besteht aus zwei homologen Peptidketten, die am carboxyterminalen Ende über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Es ist Bestandteil des interstitiellen Bindegewebes und besitzt Domänen, welche eine Bindung an Heparin, Fibrin, Glykosaminoglykane, verschiedene Kollagene sowie an Zell-Matrix-Rezeptoren aus der

Einleitung

Klasse der Integrine reversibel ermöglichen. Diese Domänen machen Fibronectin zum idealen Vermittler von Zellmigration und -adhäsion

Laminine sind sehr komplexe Moleküle, die aus einem Trimer, also aus drei Ketten $\alpha 1, \beta 1$ und $\gamma 1$ bestehen und untereinander partiell homolog sind, sie sind Bestandteil der Basalmembranen (1). Laminin 1 bindet an Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan, Heparin sowie verschiedene zelluläre Rezeptoren und beeinflusst die Adhäsion, Differenzierung, Morphologie und das Wachstumsverhalten epithelialer Zellen. Diese Effekte werden über zahlreiche Laminine-bindende Integrin-Rezeptoren vermittelt.

Integrine sind EZM-Rezeptoren und strukturell transmembranäre Heterodimere, welche aus nicht kovalent gebundenen α - und β - Untereinheiten bestehen. Sie durchspannen die Plasmamembran mit einer grossen extrazellulären Domäne, einem transmembranären Segment und einem kurzen, meist weniger als 50 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Teil. Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne, woraufhin eine EZM-vermittelte Signaltransduktion induziert wird.

6 Proteoglykane

Das Bindegewebe ist reich an Proteoglykanen, deren Untereinheiten aus Polysacchariden (95%) und Proteinen (5%) bestehen. Diese sehr grossen Polyanionen binden Wasser und Kationen und bilden die gelartige Grundsubstanz des Bindegewebes, in welche die anderen Proteine der extrazellulären Matrix, z.B. KGF an Heparin, eingebettet sind. Glykosaminoglykane, die Polysaccharidketten der Proteoglykane bestehen hauptsächlich aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, entweder Glukosamin oder Galaktosamin, diese heissen Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Dermatan-sulfat, sind kovalent gebunden an ein Glykoprotein ("core"-Protein, z.B. Decorin, Aggrecan). Hyaluronsäure wiederum ist das einzige Glykosaminoglykan das ohne "core"-Protein in der Leber vorkommt (1). Proteoglykane sind wichtig, weil sie aufgrund ihrer viskoelastischen Eigenschaften in Strukturen vorkommen, die mechanischen Deformationen ausgesetzt sind und mit Kollagenen, Integrinen sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren wechselwirken und auf diese Weise das Verhalten von Zellen beeinflussen.

7 Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Molekülen der EZM

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die speziell der interzellulären Kommunikation dienen (12). Sie können bestimmte Zellen spezifisch zu Wachstum und Vermehrung anregen, meist über einen Rezeptor, der zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört (29). Zusätzlich binden manche Wachstumsfaktoren an einen oder mehrere Komponenten der

Einleitung

extrazellulären Matrix (30). Die EZM-Wachstumsfaktor Wechselwirkung ist für Heparin/Heparansulfat-bindenden Wachstumsfaktoren, zu denen der basische Fibrozytenwachstumsfaktor (31, 32), der Gefäßendothelwachstumsfaktor (33) und der Hepatozytenwachstumsfaktor (34-36) beschrieben und auch für den Keratinozytenwachstumsfaktor, der, wie in unserer Arbeit gezeigt werden konnte, zusätzlich ein Kollagen-bindender Wachstumsfaktor ist. Dass Kollagene, die einen sehr großen Teil der EZM ausmachen, als extrazelluläre Liganden für Wachstumsfaktoren dienen, wurde zuerst für TGF- β 1 gezeigt, dass an Kollagen Typ IV bindet (37). Ähnlich verhalten sich PDGF (AA, BB und AB) und HGF, auch sie interagieren spezifisch mit Kollagenen (10, 34), ohne ihre biologische Aktivität zu mindern. Dies lässt darauf schließen, dass diese gebundenen Proteine einen wichtigen Speicher für biologisch aktive Wachstumsfaktoren darstellen (10, 34, 38). Zusätzlich schützt die EZM-Bindung der Wachstumsfaktoren vor raschem Abbau durch Proteasen. Die Matrix-gespeicherten Wachstumsfaktoren können damit schnell und lokal nach ihrer Freilassung aus der Kollagenbindung aktiviert werden (12). Matrix-gebundene Wachstumsfaktoren enthalten Informationen über die Entstehungsgeschichte zellulärer Organstruktur und -funktion, vorstellbar als eine Art Gedächtnisfunktion der EZM, da zelluläre Strukturen bei einer Schädigung anfälliger sind als die fibrösen Bestandteile des Bindegewebes, instruiert die übriggebliebene Matrix mit daran gebundenen Wachstumsfaktoren umliegende Zellen, wieder die ursprüngliche Struktur zu formen (12). Die letzte zu nennende Funktion der an EZM-gebundenen Wachstumsfaktoren ist die Regulation der Homöostase des Bindegewebes, denn einige Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF) sind in der Lage, die Synthese von Matrixkomponenten zu stimulieren und damit zu einer verstärkten Matrixablagerung bzw. der Fibrogenese beizutragen (25, 39). Andere Wachstumsfaktoren (HGF, KGF) beeinflussen die epitheliale Regeneration, indem sie Zellen zur Teilung und nicht zur Matrixproduktion anregen und wirken damit der Fibrogenese entgegen (40-42). Aktuell wird Freisetzung Matrix-gebundener Wachstumsfaktoren und deren Aktivierung durch folgende Mechanismen diskutiert: Heparin-gebundene Faktoren können durch Heparin-spaltende Enzyme freigesetzt werden. Matrix-gebundene Wachstumsfaktoren können durch Zelloberflächenproteasen oder durch Heparin, das dann als Bindungspartner in Konkurrenz zur Matrix tritt, gelöst werden (41, 43). Beispielsweise binden die FGFs an Heparin, lösen sich dadurch von der Matrix und sind gleichzeitig biologisch aktiv (44). Einige Wachstumsfaktoren liegen in einer latenten Form vor und erfahren erst durch Proteolyse, enzymatische Deglykosylierung oder durch pH-Senkung eine Konformationsänderung (45), wodurch die Affinität zum jeweiligen Rezeptor erhöht wird und damit der Wachstumsfaktor aktiviert wird (12).

8 Keratinozytenwachstumsfaktor- KGF

Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF, FGF-7) wurde zuerst 1989 beschrieben als von M350 Lungenfibroblasten exprimierter Faktor, der ausschließlich parakrin auf epitheliale Zellen wirkt (13, 46). Die FGFs sind heparinbindende Wachstumsfaktoren und bestehen aus strukturell verwandten Polypeptiden. Sie beeinflussen Proliferation und/ oder Differenzierung eines Spektrums von Zellen mesenchymalen, ektodermalen und endodermalen Ursprungs (8, 47, 48). KGF hat ein Molekulargewicht von 26-28 kD. Die Expression von KGF erfolgt ausschließlich über Zellen mesenchymalen Ursprungs, dies sind Fibroblasten aus Lunge, Haut und Gastrointestinaltrakt (13, 46, 49). KGF regt diese Zellen zu Proliferation und Migration an und vermag die Angiogenese zu induzieren und die Endothelbarriere zu stabilisieren (13, 19). Die Induktion der KGF mRNA Expression wird besonders von Interleukin 1 gesteuert (50-53), dessen stimulierender Effekt in Lungen- und Hautfibroblasten gezeigt werden konnte (50); aber auch Tumornekrose-Faktor α (TNF α), IL-6 und TGF- α steigern die KGF Synthese (54).

Vier FGF-Rezeptoren sind beschrieben, an welche die einzelnen Mitglieder mit unterschiedlicher Affinität binden (FGFR 1-4). Der einzige Rezeptor an den KGF mit hoher Affinität bindet, ist der FGFR 2 IIIb (KGFR) (55). FGF 10 wird auch KGF 2 genannt (57% seiner Sequenz sind homolog zu KGF) und bindet, wie KGF, an den FGFR 2 IIIb. Nach der Bindung von KGF erfolgt dessen Aufnahme in die Zelle über Endozytose (56).

Die FGF-Rezeptoren sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (57), deren Signaltransduktion über die mitogen-activated-protein (MAP)-Kinasen läuft (58, 59). Es wird kontrovers diskutiert, wie die Liganden-Rezeptorbindung zustande kommt. Bei einem Modell sind zwei FGF-FGFR Komplexe mit einem Heparinmolekül als Brücke verbunden (60), ein anderes Modell zeigt, dass zwei KGFR ein Molekül KGF nur in Anwesenheit von Heparin binden, welches mindestens sieben Zuckerreste groß ist (55). In hoher Konzentration vermag Heparin die Bindung von KGF an seinen Rezeptor zu verhindern (61), wobei diskutiert wird, ob es überlappende Bindungsstellen am KGF für Heparin und den KGFR gibt. Fest steht, dass das Signal von KGF zur Zellteilung, wenn es einmal seinen Rezeptor erreicht hat, durch Heparin nicht beeinflusst wird (62, 63). Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass sowohl die Konzentration von Heparin, als auch die Größe des einzelnen Moleküls für eine erfolgreiche KGF-KGFR Bindung erforderlich sind, Heparin aber essentiell ist, um einen stabilen KGF-KGFR Komplex zu erhalten (55).

Bei physiologischen Prozessen in der Embryonalentwicklung kommt KGF eine große Bedeutung zu, z.B. wurde in Versuchen mit Ratten mit gezielt dominant negativem KGFR eine dramatische Nichtausbildung der Verzweigungen der Luftwege beobachtet, welche nicht mit dem Leben vereinbar war (64).

Einleitung

In Karzinomen der Bauchspeicheldrüse werden KGF und sein Rezeptor (FGFR 2IIIb) exprimiert. Sowohl in den Tumorzellen als auch im umgebenden Pankreasparenchym wurden KGF und KGFR nachgewiesen und bestätigen damit, dass KGF das Tumorwachstum *in vivo* zu steigern vermag (65).

Im Dünndarm wurde unmittelbar nach einer intraperitonealen KGF-Injektion eine Proliferation von epithelialen Zellen festgestellt. Tägliche KGF-Applikation bewirkte eine selektive Induktion der schleimproduzierenden Zellen im Gastrointestinaltrakt. Gefunden wurde eine Hyperplasie der Gallengänge und der Gänge des Pankreas nach KGF-Gabe bei Ratten, ebenso eine Differenzierung von pankreatischen Stammzellen und epithelialen Zellen der Pankreasgänge (66, 67). Bei kolorektalen Tumoren wurde eine kräftige KGF-Immunreaktion der neuroendokrinen Zellen in der Nähe des Karzinoms gezeigt, während die Tumorzellen selbst und die sie umgebenden Fibroblasten nur eine geringe Reaktion zeigten (68). Die höchsten Konzentrationen von KGF-mRNA und -Protein wurden nach histologischen Analysen in den mesenchymalen Zellen der *Lamina propria* des entzündeten Darms bei Patienten mit *M.Crohn* gefunden und der Gehalt an KGF korrelierte mit dem Ausmaß der Entzündung (54).

In der Leber ist der wachstumsstimulierende Effekt von KGF auf Hepatozyten der Ratte mit dem von HGF zu vergleichen, wobei beide zusammen *in vitro* eine zusätzliche Steigerung im Zellwachstum von ungefähr 20% zeigten (69). Es besteht also nicht eine vollständige Übereinstimmung der aktivierten Signalwege. Der stimulierende Effekt auf Leberzellen wurde anhand der Albuminsynthese nachgewiesen, wobei die eigentliche Zielzelle in der Leber nicht bekannt war, da KGF nicht alle Hepatozyten, sondern nur jene mit hoher Proliferationskapazität stimulierte (70). In der Leberfibrose korreliert die KGF-Expression mit dem Fibrosegrad, der KGFR, der ausschließlich auf Hepatozyten gefunden wird, jedoch wird transient bei Erreichen einer Zirrhose wieder herunterreguliert (71).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der ausschließlich parakrin wirkende KGF eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Differenzierung der Organe und bei Karzinogenese und ev. in frühen Stadien der Fibrose spielt; im erwachsenen gesunden Organismus sorgt es u.a. für die Homöostase der verschiedenen Gewebe.

9 Ziel und Fragestellung

1. Bindet KGF an Kollagene, welche die Hauptbestandteile der EZM darstellen?
2. Über welche kollagenen Domänen bzw. Sequenzen wird diese Bindung vermittelt?
3. Ist der Kollagen-gebundene Wachstumsfaktor KGF biologisch aktiv?

10 Material und Methoden

11 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aceton	J.T.Baker, Deventer, NL
Acrylamid	Merck, Darmstadt, DE
Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (AAP)-Komplex Maus	DAKO, Hamburg, DE
Anti Kollagen I	Schuppan, Berlin, DE
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg, DE
Ammoniumbikarbonat (ABC)	Merck
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Brückenantikörper; Kaninchen anti Maus	DAKO
Brückenantikörper, Maus anti Kaninchen	DAKO
Coomassie Brilliant Blue-G250, Gebrauchslösung	BioRad, München, DE
"Bio-Safe Coomassie Stain"	
Coomassie Brilliant Blue-R250	Merck
Dimethylfluorid	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Elektrophoreseprobenpuffer, dreifach konzentriert	BioRad
Essigsäure	Merck
Fast Red Kit (Flasche A: Tabletten aus Fast Red, Naphtolphosphat, Levamisol; Flasche B: 100 mM Tris- HCl, pH 8,2)	DAKO
Fibronektin	Chemicon
Fluoreszenz-Sekundär Antikörper	Alexis
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, DE
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Grundmedium RPMI 1640 (10x)	Invitrogen, Groningen, NL
Harnstoff	Merck
Kaninchen anti-h-KGF Antikörper	DPC Biermann, Bad Nauheim, DE
Kaninchen-IgG	DAKO
KGF	Biomol, Hamburg, DE
Reagenz	Hersteller
Levamisol	Sigma
Methanol	J.T. Baker
Meyers Hämalaun-Lösung	Merck
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Pharmacia, Gebstedt, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin (TEMED)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma
N-succinimidyl-3-(4-Hydroxy-3-[¹²⁵ I]-iodophenyl) propionate (Bolton Hunter Reagenz), spezifische Aktivität: 2200 Ci/mmol	DuPont NEN, Boston, US
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma

Material und Methoden

Polyoxyethylen-23-Laurylether (Brij 35)	Sigma
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Polyoxyethylenesorbitan Monooleat (Tween 80R)	Sigma
Ponceaurot	Serva
Propandiol	Merck
SRB (Sulforhodamin B)	
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-Base	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma
Triton-X 100	Sigma

12 Materialien und Geräte

Material

Airflow Reinraumtechnik Herasafe
Blotkammer für Proteintransfer "Fastblot"
Brutschrank mit CO₂
Cellophanbögen

Lichtmikroskop
Einwegpipetten; Nennvolumina 5, 10 und 25 ml

Expositionskassette "Hypercassette TM"

Fettstift „DAKO Pen“
Feuchte Kammer „Eigenbau“
Filterpapier für Blot
GELoadertips
Heizplatte, maximale Temperatur 70°C

Kammer für die vertikale Gelelektrophorese „Power Pack

P25“

Kryostat "CM 3050"

Kulturflaschen 80cm², 260cm²

Mikrotiterplatten, 96 wells

Mikrotiterplatten; Polystyrol; Immulon 2HB Removawell

Strips

Oberschalenwaage „VI-4800“

Objektträger und Deckgläser

pH-Meter "Portamess"

Präzisionswaage „BP210D“

Reaktionsgefäße; 1,5 und 2 ml

Röntgenfilm „Biomax MS Film“

Rührer "Reax 2000"

Säule für Gelfiltration mit Sephadex G25, Typ PD-10

Hersteller

Heraeus, Hanau, DE
Biometra, Göttingen, DE
Heraeus, Hanau, DE
Ann Arbor Plastics, Ann

Arbor, US

Zeiss, Jena, DE

BD Biosciences, Heidelberg,

DE

Amersham Pharmacia,

Freiburg, DE

DAKO

Charité, Berlin, DE

Bio-Rad

Eppendorf, DE

Harry Gestigkeit,

Düsseldorf, DE

Biometra

Leica, Bensheim, DE

Falcon, Frankreich

Dynatech, DE

AccuLab, Göttingen, DE

Menzel-Gläser,

Braunschweig, DE

Knick, Berlin, DE

Sartorius, Göttingen, DE

Eppendorf, Hamburg, DE

Kodak, Stuttgart, DE

Heidolph, Schwabach, DE

Pharmacia Biotech Freiburg,

DE

Material und Methoden

Scanner "Studio Scan II si"	Agfa, Köln, DE
Schüttler "TPM-2"	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Spektrophotometer „Uvikon 810“	Kontron
Transfermembran für Western-blot, Nitrocellulose, 0,45 µm	Bio Rad
Verstärkerfolie für Autoradiographie „Biomax Transcreen	Kodak
HE Kodak Intensifying Screens“	
Zähler für γ-Strahlung „γ-Counter“	Berthold, Bad Wildbach, DE
Zentrifuge für Reaktionsgefäße "Biofuge Pico"	Heraeus
Zentrifugenröhrchen; 50 und 15 mL	Nunc, Naperville, US

13 Kollagene und Kollagenmimetika

Die nativen Kollagene der Typen I - VI und XIV, sowie die Einzelketten von KI, hier mit $\alpha 1(I)$ bzw. $\alpha 2(I)$ bezeichnet, wurden in der eigenen Arbeitsgruppe nach Standardprotokollen aus humanen Plazenten isoliert (10, 72-74). Durch Reduktion und Alkylierung (10, 72-74) wurden die nativen Kollagene denaturiert und die einzelnen Ketten isoliert.

Definierte Fragmente von $\alpha 1(I)$ wurden durch Spaltung mit Cyanbromid (CB), welches hinter der Aminosäure Methionin spaltet, ebenfalls nach in der Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokollen hergestellt (75). Abbildung 1 zeigt schematisch die Lage der einzelnen CB-Fragmente der $\alpha 1(I)$ Kette. Das CB1-Fragment befindet sich auf dem Propeptid und ist nicht dargestellt.

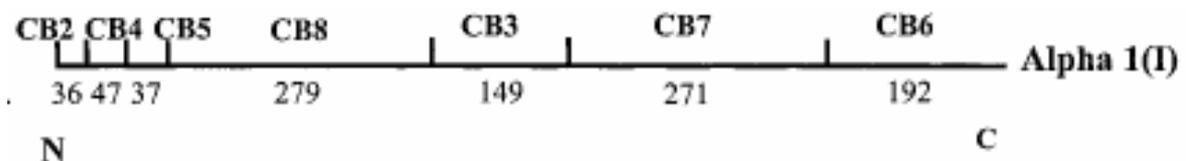


Abbildung 1: Schematische Darstellung der CB-Fragmente von $\alpha 1(I)$.

Die Zahlen in der unteren Reihe stehen für die Anzahl der Aminosäurereste des entsprechenden Fragments. N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus.

Alle Kollagene, die kollagenen Einzelketten und CB-Fragmente wurden mit Konzentrationen von jeweils 2 mg/ml in 150 mM Essigsäure gelöst und bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

In Kooperation mit Dr. R.W. Farndale und Dr. C.G. Knight (Department of Biochemistry, University of Cambridge) wurden synthetische auf der Kollagenstruktur basierende Peptide (Kollagenmimetika), mit den in der Tabelle 2 dargestellten Aminosäuresequenzen hergestellt bzw. eingesetzt (76, 77).

Tabelle 2: Struktur synthetischer Kollagenanaloga (Kollagenmimetika).

Material und Methoden

Dargestellt ist die Kurzschriftweise, die Sequenz/Struktur, die Anzahl der Aminosäurereste (AS), das Molekulargewicht (MW) sowie die Rigidität (T_m $\frac{1}{2}$) der Kollagenmimetika. Die Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstabencode wiedergegeben. O steht für Hydroxyprolin.

Name	Sequenz	AS	MW (g/mol)	T_m (C°)	$\frac{1}{2}$
(GPO) ₁₀	H-GCO-(GPO) ₁₀ -GCOG-NH ₂	37	3291,6	82,3	
(GPP) ₁₀	H-GCP-(GPP) ₁₀ -GCPG-NH ₂	37	3099,6	45,8	
GPP`	H-GPC-(GPP) ₅ -GFOGER-(GPP) ₅ -NH ₂	39	3700,0	43	
GAP	H-GAC-(GAP) ₅ -GFOGER-(GAP) ₅ -NH ₂	42	3389,8	linear	

14 Immunhistologie

Puffer und Lösungen:

PBS/Tween 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS

RPMI-I (zum Verdünnen des 1. Antikörpers und des APAAP-Komplexes)

5 mL RPMI 1640 (10x), 5 mL FKS (hitzeinaktiviert), 50 mg Natriumazid wurden in 40 ml A. bidest. gelöst und der pH-Wert mit 40-50 µL gesättigter NaOH auf 7,4-7,6 eingestellt. Lösung wurde mit A. bidest auf 50 mL aufgefüllt.

RPMI-II (zum Verdünnen der Brückenantikörper)

1 Teil Humanserum (hitzeinaktiviert), 7 Teile RPMI-I

TBS-Waschpuffer 0,9 g Tris-Base; 6,85 g Tris-HCl; 8,78g NaCl mit A. bidest. ad 1 L

APAAP 14ml Entwicklungspuffer, 5ml Propandiol, 8mg Levamisol in 100µl

Entwicklung Aqua dest., 4mg NaNO₂ in 100 µl Aqua dest., 40µl Neufuchsin, 10mg NABP in 120µl DMF

Proben humaner zirrhotoscher Leberexplantate wurden von Prof. Dr. P. Neuhaus, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abschnitte des Lebergewebes wurden in PBS eingebettet, bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Blöcke bei -80°C aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Proben im Kryostaten 5 µm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden auf silanisierten Objektträgern aufgenommen, 3 min bei 80°C im Wärmeschrank erhitzt und anschließend 1 h an der Luft getrocknet. Die so vorbehandelten Schnitte wurden 10 min in Aceton fixiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen und Trocknen wurden die Gewebeschnitte mit Chloroform nachfixiert, für 30 min in einer 0,1% BSA/ PBS- Lösung blockiert und für 1h bei Raumtemperatur mit 50-100 ng KGF inkubiert, jedoch nur einer von zwei Schnitten pro Objektträger. Zunächst wurde der 1. Antikörper (Polyklonaler Kaninchen Anti-hKGF Antikörper) in 50 µl RPMI-I pro Schnitt gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Als Positivkontrolle diente in diesem Fall ein Antikörper gegen Kollagen VI bzw. -Kollagen I und als Negativkontrolle diente anti-Kaninchen IgG. Es folgten der 1. Brückenantikörper Maus- Anti- Kaninchen, der 2. Brückenantikörper Kaninchen- Anti-Maus in 50 µl RPMI-II pro Schnitt und der monoklonale Maus-APAAP-Komplex in 50 µl RPMI-I pro Schnitt, wobei alle Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten verblieben. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Objektträger in

TBS- Waschpuffer für 1-2 min gewaschen und in diesem belassen. Auf die halbtrockenen Gewebeschnitte wurden 200 µl des APAAP-Entwicklers für 20 min bei Raumtemperatur aufgetragen, mit Wasser gespült, eine Hämalaunkernfärbung für 15 s vorgenommen, abermals gespült und die Gewebeschnitte mit flüssiger Gelatine und je einem Deckglas haltbar gemacht.

15 Radioaktive Markierung

Puffer und Lösungen:

KGF-Lösungen	200 µg/ml KGF in PBS
Boratpuffer	30 mM Borsäure (pH 8,6)
Glycinpuffer	200 mM Glycin in Boratpuffer
PBS/Tween	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
TCA-Lösung	20% (w/v) TCA
PBS/BSA	1% (w/v) BSA in PBS

Die radioaktive Markierung ist eine sensitive und schonende Methode, ein Protein für *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen „sichtbar“ zu machen. Durch die Kopplung, z.B. mit Iod-125, einem γ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 13 Tagen, ändern sich die chemischen Eigenschaften des Proteins bzw. Enzyms nicht oder nur marginal. Mit der Bolton-Hunter-Methode wird ein [¹²⁵I]-markierter Ester unter Bildung eines Säureamids an die entsprechenden Gruppen des Proteins gekoppelt (78, 79). Eine Vorbedingung ist die hohe Reinheit des zu markierenden Proteins, die aus Träger (*Carrier*)-freien KGF Präparationen zur Verfügung standen. Nicht gebundenes radioaktives Material wird mit Hilfe einer Gelfiltration aus dem Reaktionsgemisch entfernt (73).

Die radioaktive Markierung der Proteine erfolgte mit dem Bolton Hunter- Reagenz. Dazu wurde KGF in einer Konzentration von 2 µg in 75 µl Boratpuffer (30 mM, pH 8,6) gelöst. Das Bolton Hunter- Reagenz wurde unter einem 100% igen Stickstoffstrom eingedampft und in 75 µl Boratpuffer gelöst. Davon wurden 25 µl (entsprechen etwa 0,33 mCi) zu dem gelösten KGF gegeben und 45 min bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl Glycin (0,2 M in Boratpuffer) über 15 min bei 4°C gestoppt. Das markierte [¹²⁵I]-KGF lief über eine mit PBS/ Tween 0,05% äquilibrierte Sepharose-G25-Gelfiltrations-Säule, um es von freiem Jod zu trennen. Es wurde mit PBS/ Tween 0,05% in Fraktionen von 500 µl eluiert. 10 µl jeder Fraktion wurden im ψ -Counter gemessen und die [¹²⁵I]-KGF enthaltenden Fraktionen wurden vereint, so dass sich ein Endvolumen von 1-1,5 ml ergab. Die inkorporierte Aktivität lag zwischen 20.000 cpm und 10.0000 cpm/ µl. Die Protein gebundene Aktivität, gemessen mittels Präzipitation mit 10% Trichloressigsäure (200 µl) in Gegenwart von 2%igem BSA 200 µl (Inkubation 30 min bei 4°C) lag immer über 95%. Die Reinheit des markierten Proteins wurde mittels Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie kontrolliert.

16 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE).

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht mit der Möglichkeit der anschliessenden Anfärbung im Gel, autoradiographischer Entwicklung bei vorheriger radioaktiver Markierung der Proteine oder auch Transfer der Proteine auf geeignete Membranen zur weiteren Analyse. Die Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS) startet eine Radikalreaktion, die zu einer Polymerisation der Acrylamid-Monomere führt. Hierbei wirkt Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator. Die Quervernetzung der Polymerketten wird durch das bifunktionelle N', N'- Methylenebisacrylamid bewirkt. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende Methode, in der SDS (engl.: sodiumdodecyl sulfate) alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, indem es an die hydrophoben Regionen bindet, sie auffaltet und einheitlich negativ belädt. Dadurch wandern die Proteine je nach ihrer Masse und nicht aufgrund der Ladung unterschiedlich schnell durch das Gel zur Anode. In Standards enthaltene Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht dienen als Referenzen bei der Molekulargewichtsbestimmung. Man verwendet 15% Gele für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 80 kD und 10% Gele bei einem Molekulargewicht um 100 kD, die 1-2 Tage vor Gebrauch hergestellt wurden. Der Zusammenbau der Gelapparatur, in der die Gele gegossen wurden, erfolgte unter Verwendung dafür vorgesehener Glasplatten, Kunststoffstreifen und -kämme. Die Gele benötigten dann eine Zeit zum Aushärten. Bei Verwendung wurden zunächst die Gelkammern mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. Von jeder Probe wurden 7-10 µl/ Spur mittels einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gegeben, als Standard wurden jeweils 2 µl des Sea-Blue Standards verwendet. Anschliessend wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung (zunächst 80 mV, nach 10 min 180 mV für 50-60 min) durchgeführt. Die Kühlung der Gelkammern erfolgte extern mit Eis. Die Elektrophorese wurde vor dem Auslaufen der niedermolekularen Proteine aus dem Gel bzw. bei Erreichen der bestmöglichen Auftrennung der zu analysierenden Proteine, welche anhand der sichtbaren Markerproteine des Standards während des Laufes abgeschätzt werden konnte, gestoppt. Meist wurde nach dem Lauf das Gel für 20 min in gefilterter Coomassie-Blue Lösung gefärbt und für 4h in 7%iger Essigsäure überschüssige Farbe wieder aus dem Gel entfernt. Alternativ kam die Autoradiographie bei radioaktiv markierten Proteinen oder der Transfer der Proteine zur weiteren Analyse zur Anwendung.

Puffer und Lösungen

Trenngel-Lösung Acrylamid)	(10%	16,2 g Tris-Base, 40,2 g Acrylamid, 540 mg Bisacrylamid, 400 mg SDS, 325 µL TEMED ad 394 ml Aqua dest.; pH 8,3
-------------------------------	------	--

Material und Methoden

Sammelgel-Lösung Acrylamid)	(4% 4,8 g Tris-Base, 9,6 g Acrylamid, 0,13 g Bisacrylamid, 240 mg SDS und 6 µL TEMED ad 231 ml Aqua dest.; pH 6,6
APS-Lösung	80 mg APS ad 10 ml Aqua dest
Elektrophoreselaufpuffer	25 mM Tris-Base (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Tris-Puffer (pH 6,8)	12 g Tris-Base ad 100 mL Aqua dest.; pH 6,8
Probenpuffer 4-fach (nicht reduzierend)	2,08 ml Tris-Puffer (pH 6,8), 3,84 g Harnstoff, 1,2 g SDS, 900 mg Glycerol, 4 mg Bromphenolblau ad 14 mL Aqua dest.
Probenpuffer 4-fach (reduzierend)	10 mL Probenpuffer 4-fach (nicht reduzierend), 150 µL 2-Mercaptoethanol

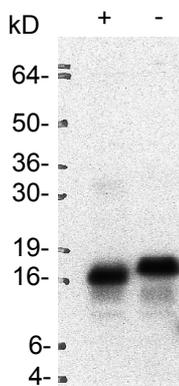


Abbildung 2: Autoradiographie nach Gelelektrophorese einer repräsentativen Markierung von $[^{125}\text{I}]$ -KGF

Die Analyse der Markierung erfolgte über SDS- PAGE und anschließender Autoradiographie. Links ist das Molekulargewicht der globulären Standardproteine (Lactalbumin, Sojabohnen- Trypsininhibitor, Carboanhydrase, Hühnereialbumin) angeführt in kD. (+) reduziertes Protein, (-) nicht reduziertes Protein.

17 Bindung von $[^{125}\text{I}]$ -KGF an immobilisierte Kollagene und Glykoproteine

Ziel dieses Versuches ist es, eine Aussage über die Bindung von KGF an ein zu untersuchendes Protein zu treffen

Bestimmte Plastikmaterialien, wie z. B. Polystyrol, haben auf Grund ihrer Ladungsverhältnisse eine große Bindungskapazität für die ebenfalls elektrisch geladenen Proteine. Diese Eigenschaft macht man sich bei den Bindungs- und Inhibitionsstudien zu nutze. Setzt man Kollagene und Kollagenketten in Mengen von 2 µg/Loch im 96-Loch-Mikrotiterplattenformat ein, liegen die Bindungseffizienzen zwischen 25% und 48% des eingesetzten Gesamtproteins. Für die Bestimmung der Effizienz der Beschichtung wurden 5-10 ng radioaktiv mit der Chloramin-T-Methode $[^{125}\text{I}]$ -markiertes Kollagen zu steigenden Konzentrationen unmarkierten Kollagens in Mikrotitergefäße (Removawells) gegeben und inkubiert. Über die Bestimmung der gebundenen Radioaktivität konnte die Beschichtungseffizienz berechnet werden. Dies ergab für 2 µg eingesetztes Kollagen folgende Werte: Kollagen I 30%, Kollagen III 34%, Kollagen IV 42%, Kollagen VI 40%, $\alpha 1(\text{I})$ 25%, $\alpha 2(\text{I})$ 37%, Kollagen III r.a. 48%, Kollagen IV r.a. 41% und Kollagen VI r.a.

32%. Diese Daten sind Vorarbeiten aus dem Labor aus vorangegangenen Versuchen, die für die vorliegende Arbeit nicht wiederholt wurden (10).

Für die Bindungsuntersuchungen von KGF an kollagene Strukturen wurden Mikrotiterplatten (Removawells) in einer Konzentration von 2 µg für native Kollagene und deren Ketten, bzw. für Cyan- Bromid Peptide je nach Molekulargewicht 600, 400 und 300 ng/ Well/ 100 µl Ammoniumbicarbonat (ABC 50 mM, pH 9,6) für 12h bei 4°C beschichtet. Nach dem Waschen mit PBS/Tween 20 (0,05%) zum Entfernen des nichtgebundenen Proteins wurden die freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatten mit 0,5% BSA für 1h bei Raumtemperatur blockiert, um eine unspezifische Bindung zu vermeiden. Nach erneutem Waschen wurden die Platten mit 1-2 ng [¹²⁵I]- KGF/Loch für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die ungebundene Aktivität durch dreimaliges Waschen mit 0,05% Tween/PBS entfernt. Die verbleibende Aktivität sowie die initial eingesetzte Aktivität wurden mit einem ψ -Zähler ermittelt, ins Verhältnis gesetzt und die Bindung der untersuchten Proteine berechnet. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Gefäße und BSA.

18 Ligandenblot auf Nitrozellulosemembranen

Als Blotting bezeichnet man das Binden von Molekülen auf eine Membran, z.B. Nitrozellulose, mit hoher Bindungskapazität für die entsprechende Substanz. Elektrophoretisch aufgetrennte Moleküle können in einem diskontinuierlichen Puffersystem im elektrischen Feld direkt aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Diese Methode wird auch als Semi-Dry-Blotting bezeichnet. Zwei mit Blotpuffer getränkte Filterpapierstapel liegen an den Elektroden an. Dazwischen liegen die Membran und das Gel. Bei horizontal angeordneten Graphitelektroden wandern die Proteine vertikal aus dem Gel in Richtung der Anode zur Nitrozellulosemembran.

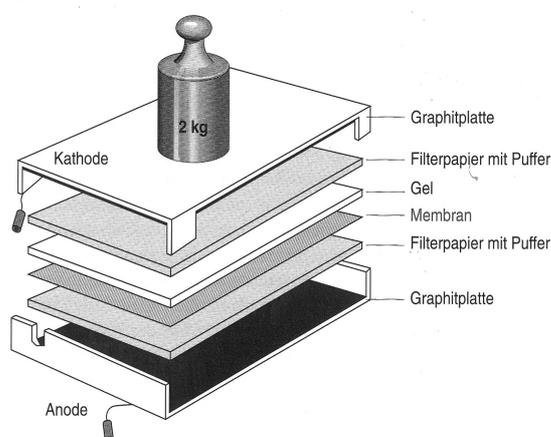


Abbildung 3

Transfereinheit eines Ligandenblots

Da die Proteine dabei unabhängig von Ladung und Größe mit gleicher Geschwindigkeit wandern, ein Effekt, den man als Isotachophorese bezeichnet, ist der

Transfer gleichmäßig (80).

Material und Methoden

Puffer und Lösungen:

Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base (pH 10,4), 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	30 mM Tris-Base (pH 10,4), 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base (pH 9,4), 20% (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-n-Hexanonsäure
Amidoschwarz-Lösung	0,1% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Ponceaurot-Lösung	2% (w/v) Ponceaurot S, 30% (w/v) TCA, 30% (w/v) Sulfosalicylsäure. Unmittelbar vor der Verwendung 1:20 mit A.dest. verdünnt.
Blockierlösung	0,3 % (v/v) Tween 80R in PBS
Waschlösung	0,05 % (v/v) Tween 80R in PBS

Die Transfereinheit wurde zu einem Sandwich aufgebaut: ein zugeschnittenes Filterpapier wurde in Anodenpuffer I getränkt, auf die Anodenplatte platziert. Darauf wurden ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die ebenso behandelte Nitrozellulose und das Gel gelegt. Dieser Stapel wurde durch zwei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere ergänzt. Zwischen allen Schritten wurden die Luftblasen durch Rollen mit einem Glasspatel entfernt. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 3-4 mA/cm² Gelfläche innerhalb von 1-1,5 h transferiert. Bei allen nachfolgenden Schritten durfte die Membran nicht wieder trocken werden. Die Qualität des Transfers wurde durch Färbung der Nitrozellulosemembran für 5 min mit Ponceaurot-Lösung geprüft. Die Spalte mit den Standardproteinen zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde abgeschnitten und separat mit Amidoschwarz gefärbt. Der Rest der Membran wurde 1 h mit Blockierlösung inkubiert, mit reichlich Waschlösung gewaschen und schließlich mit 50 ng [125I]-KGF in 10 mL Waschlösung für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nicht gebundenes KGF wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung entfernt. Für die Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm mit dem Blot und einer Verstärkerfolie in der Expositionskassette bei -80°C über Nacht exponiert. Nach Erwärmung der Kassette auf Raumtemperatur wurde der Film entwickelt und das Bild für die weitere Auswertung gescannt.

19 Dotblot auf Nitrozellulosemembranen

Jeweils 3 µl Lösung mit Kollagenen und daraus abgeleitete Strukturen in ansteigenden Konzentrationen wurden auf eine Nitrozellulosemembran getropft und die Membran anschließend kurz an der Luft getrocknet. Freie Bindungsstellen wurden 1 h mit Blockierlösung geblockt und die Membran zweimal für 5 min in Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde sie mit 6x10⁵ cpm [¹²⁵I]-markiertem KGF in 12 mL Waschlösung 2 h inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen und die gebundene Radioaktivität wurde wie oben beschrieben in einer Autoradiographie visualisiert.

20 Inhibitionsexperimente

Kollagene, abgeleitete Verbindungen und Heparin wurden wie in Konzentrationen von 200 ng/Loch auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Parallel dazu wurden jeweils 2 ng [¹²⁵I]-markiertes KGF in PBS/Tween mit 0, 0,01, 0,1, 1, und 10 µg/ml Kollagenen und abgeleiteten Verbindungen gemischt und 2 h bei 4°C in Lösung vorinkubiert. Anschließend wurden die Gemische auf die vorbehandelte Mikrotiterplatte gegeben und die Platte wie unter Kapitel 10 beschrieben, inkubiert, gewaschen und die gebundene Radioaktivität gemessen.

21 Sättigungsexperimente

Kollagene und abgeleitete Verbindungen wurden in Konzentrationen von 200 ng/Loch auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Eine konstante Menge von 1-2 ng [¹²⁵I]-markierten KGF wurde mit ansteigenden Mengen nicht-markierten KGF, das in bis zu 400 fachem Überschuss vorliegen konnte, gemischt. Anschließend wurden die Gemische auf die vorbehandelte Mikrotiterplatte gegeben und die Platte wie im Kapitel 10 beschrieben, inkubiert, gewaschen und die gebundene Radioaktivität gemessen. Für die Auswertung wurde die eingesetzte freie gegen die gebundene Radioaktivität aufgetragen. Aus den daraus resultierenden Graphen wurde die Stärke der Bindung des KGF an die entsprechende immobilisierte Struktur und die Zahl der Bindungsstellen abgeschätzt (72).

22 Abhängigkeit der Bindung von der Salzkonzentration

Dieser Versuch wurde in Tris- Puffer/0,05% Tween, pH 7,4 wie in Kapitel 10 beschrieben, durchgeführt. Zur Herstellung der NaCl-Konzentrationsreihe wurde der Ausgangspuffer (10 mM Tris) mit 3 M NaCl versetzt und entsprechend verdünnt, sodass folgende Konzentrationen und Osmolaritäten eingesetzt wurden: 1500 mM NaCl=3020 mOsm/ l; 1200 mM NaCl=2420 mOsm/ l; 900 mM NaCl=1820 mOsm/ l; 600 mM NaCl=1220 mOsm/ l; 300 mM NaCl=620 mOsm/ l; 100 mM NaCl= 220 mOsm/ l; 50 mM NaCl=120mOsm/ l; 0 mM NaCl=20 mOsm/ l=Osmolarität des Puffers.

23 Zellkultur

Verwendet wurden HaCat- Zellen, eine humane Keratinozytenzelllinie, die KGF als Wachstumsfaktor benötigen. Diese wurden im angegebenen Nährmedium mit Zusätzen unter standardisierten Bedingungen (bei 37°C, 8% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank in Kultur gehalten. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsfläche mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Zweimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel, bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

Dazu wurden sie nach Abgiessen des Mediums zwei Mal mit PBS-Dulbecco gespült, mit Trypsin/EDTA abgelöst, in neues, vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 in neue Kulturflaschen ausgesät.

24 Proliferationsversuche mit HaCat-Zellen und KGF

Um die biologische Aktivität von kollagengebundenem KGF zu zeigen, wurden die α 1-Kette von Kollagen I in Mikrotiterplatten (Falcon) in einer Konzentration von 2 μ g/ Loch (0,3 cm²) bei 4°C über Nacht immobilisiert, anschliessend mit PBS/ Tween gewaschen und mit PBS/BSA 2% blockiert, es folgte abermals ein gründlicher Waschvorgang. Nun wurde KGF/PBS in verschiedenen Konzentrationen (1 μ g; 500 ng; 250 ng; 125 ng; 62,5 ng; 31,25 ng; 0 ng/ Loch) für 2h bei Raumtemperatur auf dem Kollagen inkubiert. Anschliessend wurde das nichtgebundene KGF durch Waschen mit PBS herausgelöst und die mit Trypsin/ EDTA abgelösten Zellen (100.000/ ml) in die vorbehandelten Mikrotiterwells gegeben. Parallel dazu wurde KGF in Lösung in steigenden Konzentrationen (ng) zusammen mit den Zellen (100.000/ ml) in mit Kollagen-vorbehandelte Wells gegeben. Dieser Ansatz diente als Positivkontrolle für die Effekte von KGF auf die Zellen. Die Zellen wurden für 72h in Minimalmedium inkubiert, unter fortlaufender mikroskopischer Kontrolle, dann mit 50% Trichloressigsäure fixiert, mit PBS gewaschen, anschließend mit dem Sulforhodamin B (SRB) Farbstoff behandelt und im Photometer bei 550/ 450 nm die Zellzahl bestimmt (81).

25 Mathematische und statistische Auswertung

Die Bindung von KGF an plastikgebundene Proteine wurde aus den Verhältnissen freien und gebundenen [¹²⁵I]-KGFs nach der folgenden Formel ermittelt:

gemessene counts (nach Waschen) / eingesetzte counts [Formel 1]

Die nach Waschen verbliebene Radioaktivität in den KGF-Bindungsversuchen wurde Varianzanalysen (one way Anova) unterzogen und anschliessend paarweise verglichen (pairwise comparison, Tukey Test). Daraus ergaben sich zwei signifikant unterschiedliche Gruppen von KGF-Liganden mit hoch- und niedrig-bindenden Eigenschaften (vergl. Kapitel 26).

In Sättigungsexperimenten zur Abschätzung der Stärke der Interaktion von KGF mit immobilisierten Kollagenen und daraus abgeleiteten Verbindungen wurden die Ausgleichsgeraden und -kurven mit dem Programm DeltaGraph (Version 3.5 für Windows; Red Rock, Salt Lake City, US) berechnet.

Material und Methoden

Alle Untersuchungen erfolgten in experimentellen Gruppen von drei bis sechs Einzelbestimmungen und wurden mindestens zweimal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Version 2.0; Jandel Scientific, San Rafael, US).

Die Mittelwerte aus den Gruppen wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Mittelwert} = \sum X_i / n \quad [\text{Formel 2}]$$

n - Anzahl paralleler Ansätze, X_i - individueller Messwert

Die Standardabweichungen (SD) in den Gruppen mit mindestens drei vergleichbaren experimentellen Ansätzen wurden nach der folgenden Formel abgeschätzt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad [\text{Formel 3}]$$

n - Anzahl paralleler Ansätze, X_i - individueller Messwert, \bar{X} - Mittelwert

26 Ergebnisse

27 KGF bindet an die EZM humaner zirrhotischer Leber

Ausgehend von der extrazellulären Bindung von KGF an Heparan-/Dermatansulfat in der Haut und der bekannten 10fach gesteigerten Expression von Dermatansulfat in zirrhotischer Leber wurde die *in situ* Lokalisation von KGF in humaner zirrhotischer Leber mittels Immunhistochemie untersucht.

Aceton und Chloroform fixierte 5 µm-Kryostat-Schnitte humaner zirrhotischer Leber wurden mit einem polyklonalen anti hKGF Antikörper aus Kaninchen behandelt und mit zwei weiteren Brückenantikörpern und dem abschliessenden APAAP Komplex die Immunfärbung vollendet. Eine KGF-Immunlokalisation gelang perizellulär in Regeneratknoten zirrhotischer, menschlicher Leberschnitte und minimal auch in den fibrotischen Septen (Abbildung 4A). Die Matrixbindung und Bindung von KGF vermutlich an Hepatozyten-KGF-Rezeptoren im Regeneratknoten wurde nach Vorinkubation der Schnitte mit 25 ng KGF deutlicher (Abbildung 4B).

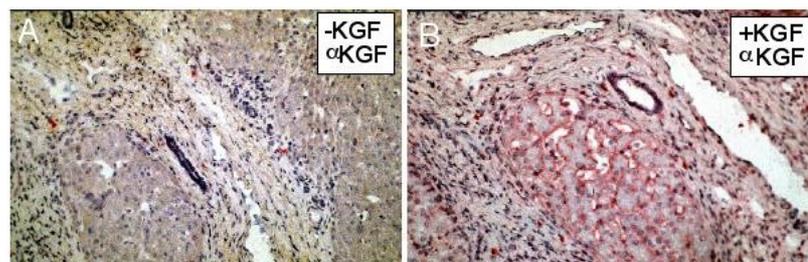


Abbildung 4: KGF bindet extrazellulär an die fibrotischen Septen humaner zirrhotischer Leber

KGF wurde mittels eines polyklonalen KGF-Antikörpers dargestellt. Kryostat-Schnitte humaner Leber wurden mit Aceton und Chloroform fixiert. KGF wurde vorgebunden bzw. nicht angeboten, mit einem Kaninchen polyklonalen anti- hKGF Antikörper detektiert, mit zwei Brückenantikörpern und dem abschliessenden APAAP Komplex wurde die Immunfärbung vollendet. Eine Inkubation mit Kaninchen IgG diente als Kontrolle (nicht gezeigt). Vergrößerung: 40x.

28 Bindung von KGF an Kollagene/Analoga

Ausgehend von der gefundenen extrazellulären Speicherung von KGF in fibrotischen Kollagen-haltigen Septen sollten Bindungsliganden für KGF auf Kollagenebene gesucht und die Bindungssequenz mittels fragmentierten Kollagenen und synthetischen Analoga eingegrenzt werden. In Mikrotiterwells wurden 2 ng/Loch Kollagene I, II, III, IV, VI, deren Ketten und CB-Peptide, synthetische Analoga GPP, GPP', GPO, GAP sowie die Glykoproteine Lam, Fn, und KXIV immobilisiert und mit 1-2 ng [¹²⁵I]-KGF für 2 h inkubiert und die nach Waschen gebundene Radioaktivität vermessen (Abbildung 5). Mit Hilfe der Kollagenketten und -fragmente sollte untersucht werden, ob auf den Kollagenen eine

Ergebnisse

oder mehrere Bindungsstellen für KGF vorhanden sind (Konsensusbindungssequenz) und mit Hilfe der synthetischen Analoga, die eine unterschiedlich stark ausgebildete Tripelhelix ohne Glykanreste besitzen, untersucht werden, was einen starken Bindungsliganden von KGF ausmacht. Die Bindung von KGF an Kollagen könnte auch zusätzlich zur Tripelhelix über eine weitere kollagene Struktur erfolgen. Die Mittelwerte aus den Festphasenbindungsversuchen wurden einer Varianzanalyse (one way Anova) unterzogen und anschliessend paarweise verglichen (pairwise comparison, Tukey Test). Daraus ergaben sich zwei signifikant unterschiedliche Gruppen von KGF-Liganden mit hoch- und niedrig-bindenden Eigenschaften, in die sich die verwendeten Kollagene, -einzelketten und -fragmente einteilen lassen (die Bindungsstärke jedes Mitglieds der einen Gruppe ist signifikant unterschiedlich zu allen Mitgliedern der anderen Gruppe, aber innerhalb einer Gruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede). Die Grenzen für die stark-bindende Gruppe I liegen bei 14,5-30,5% und für die schwach-bindende Gruppe II bei 9-14,4%. Die Prozentangaben beziehen sich auf den gebundenen Anteil von KGF am Kollagen im Verhältnis zum insgesamt eingesetzten KGF, unter Berücksichtigung der Effektivität der Markierung. Zur Gruppe I gehören CB6, CB7, CB8 von $\alpha 1(I)$, KIII, KVI, KVI r.a., $\alpha 1-3(VI)$, GPO, GPP', GPP, Lam, Fn, KXIV. Zur Gruppe II gehören KI, $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(I)CB$, CB3 von $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)CB$, KII, KIII r.a., KIV, KIV r.a. Jeder einzelne Bindungsversuch zeigte eine deutlich höhere Bindung von KGF an Kollagene als an die Kontrolle. Als Kontrollen dienten BSA und das synthetische nicht-tripelhelikale Kontrollpeptid GAP, die in der obengenannten Gruppeneinteilung nicht berücksichtigt werden. Eine graphische Zusammenfassung zeigt (Abbildung 5).

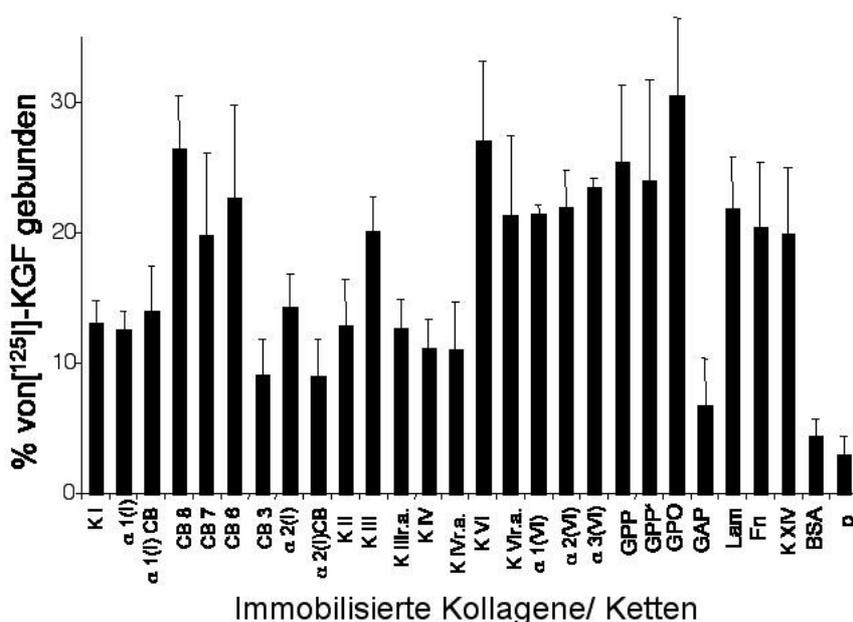


Abbildung 5: $[^{125}I]$ -KGF bindet an immobilisierte Kollagene und Kollagenfragmente

Ergebnisse

Abszisse: Native Kollagene (K), Kollagenketten ($\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$); reduziert und alkylierte Kollagenketten (r.a.), Cyanbromid-abgebaute Kollagenfragmente bzw. -Peptide von Kollagen I, sowie die sythetischen Peptide GPO, GPP, GPP', GAP und die Vergleichsproteine wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen mit Detergenz (PBS/Tween 0,05%) blockiert und mit [125 I]-KGF inkubiert. Unbeschichtete, aber blockierte wells dienten als Kontrolle (P).

Sowohl im Liganden-Blot (SDS-PAGE und Transfer der Kollagenpeptide auf Nitrocellulose) (Abbildung 6) als auch im Dot-Blot (Abbildung 7), bei welchem die einzelnen Komponenten direkt auf die Nitrozellulose aufgetropft werden, konnte das Bindungsverhalten bestätigt werden. Darüberhinaus konnte mit Hilfe des Dot-Blots die Bindungspräferenz für KGF an das synthetische tripelhelikale Kollagenpeptid (GPO) $_{10}$ und (GPP) $_{10}$ gezeigt werden, wohingegen das Kontrollpeptid GAP und BSA nur eine geringe bzw. keine eindeutige Bindung zeigen. Ausserdem lassen sich Kollagengemische im Liganden-Blot gut auftrennen und mit Hilfe der Proteinfärbung lässt sich der gleichmässige Transfer der Proteine nachweisen. Nach dem Transfer der Kollagene vom SDS-Gel auf Nitrozellulose, der Inkubation von [125 I]-KGF mit diesen und anschliessender Autoradiographie, bestätigte sich die Bindung von KGF an die kollagenen Strukturen der Gruppe I: die $\alpha 1$ Kette von Kollagen I, die $\alpha 1(I)$ CB Peptide CB8, CB7 und CB6 sowie eine Bindung an Kollagen VI r.a., CB3 von $\alpha 1(I)$ aus der Gruppe II der schwachbindenden Kollagene bindet KGF schwach bis gar nicht. Der Liganden-Blot unterstützt damit bildlich die Resultate der Festphasenassays und zeigt, dass die KGF-Bindungsliganden nicht durch die Methode der Immobilisierung maskiert werden.

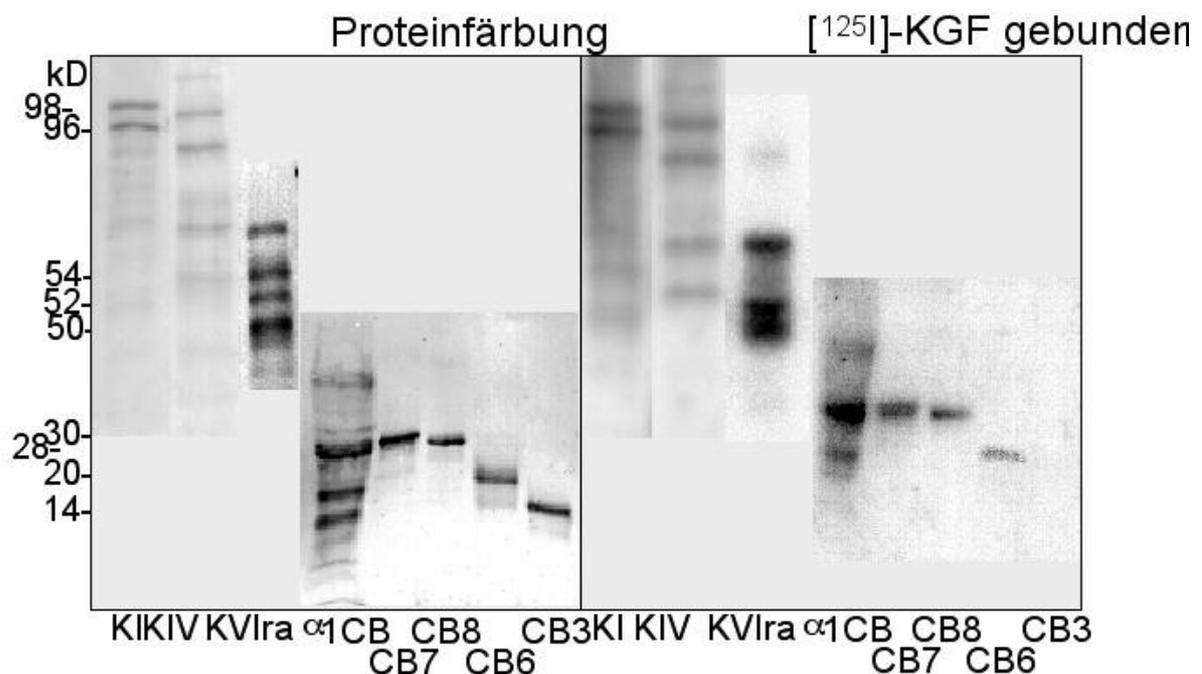


Abbildung 6: Liganden Blot Darstellung von KI, KIV, KVI, $\alpha 1(I)$ CB (Fragmente gesamt), CB8, CB7, CB6 und CB3 (alle $\alpha 1(I)$) mittels Proteinfärbung bzw. Filmschwärzung durch gebundenes [^{125}I]- KGF

Nach SDS-PAGE erfolgte der Proteintransfer auf Nitrozellulose, dann wurde diese mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [^{125}I]-KGF 2 h inkubiert und per Autoradiographie sichtbar gemacht. Rechts ist das Ergebnis der Autoradiographie zu sehen, links Färbung der Nitrozellulose mit Amidoschwarz als Kontrolle und unten die Beschriftung der Kollagene, seitlich links das Molekulargewicht in kD.

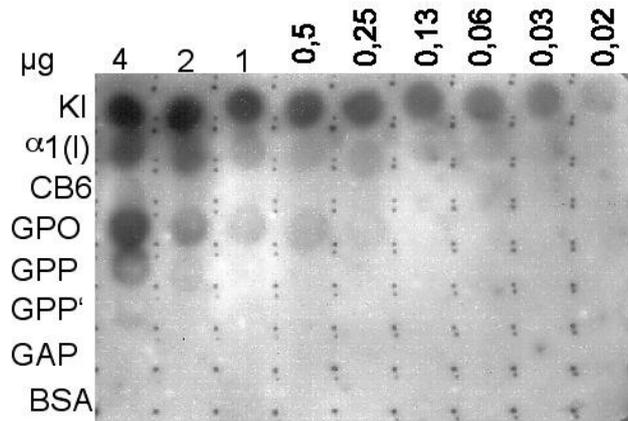


Abbildung 7: Dot Blot Darstellung der Bindung von [^{125}I]-KGF an KI, $\alpha 1(I)$, CB6 von $\alpha 1(I)$, GPO, GPP, GPP', GAP und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Proteine und Peptide wurden direkt auf die Nitrozellulose aufgetragen, mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [^{125}I]-KGF inkubiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Links: Bezeichnung der verwendeten Kollagene und Peptide, oben: Konzentrationen von [^{125}I]- KGF in μg .

29 Inhibition der KGF-Bindung durch Kollagene/Analoga

Im Hinblick auf eine eventuelle therapeutische Anwendung von Inhibitoren der Bindung von KGF an Kollagene und damit Induktoren einer KGF Freisetzung wurden lösliche kollagene Bindungsstrukturen als Bindungs-Kompetitoren eingesetzt. In diesen Versuchen konnte auch der Unterschied zwischen den immobilisierten und löslichen Kollagenfragmenten abgeschätzt werden. Die aus den Inhibitionskurven ermittelte halbmaximale Inhibitorkonzentration wurde in einer Abbildung zusammengefaßt (s. Abbildung 12) und erschließt damit die Potenz eines löslichen Inhibitors.

Dazu wurden Kollagene I, IV und VI bzw. große Ketten und Fragmente dieser Kollagene als immobilisierte Liganden mit je 200 ng/Loch eingesetzt. Inhibitoren in steigenden Konzentrationen waren zum einen wiederum die großen Kollagene I und VI (Abbildung 8), zum anderen die von $\alpha 1(I)$ abgeleiteten CB-Peptide (Abbildung 9), die kleinen synthetischen Kollagenanaloga (Abbildung 10, Abbildung 11) und der bekannte Ligand Heparin sowie steigende Salzkonzentrationen (Abbildung 13). KGF und der Inhibitor in steigenden Mengen bis zu 10 ng/Loch wurden für 2 h auf dem jeweiligen Liganden inkubiert. Die Bindung ohne Inhibitor wurde 100% gesetzt.

Ergebnisse

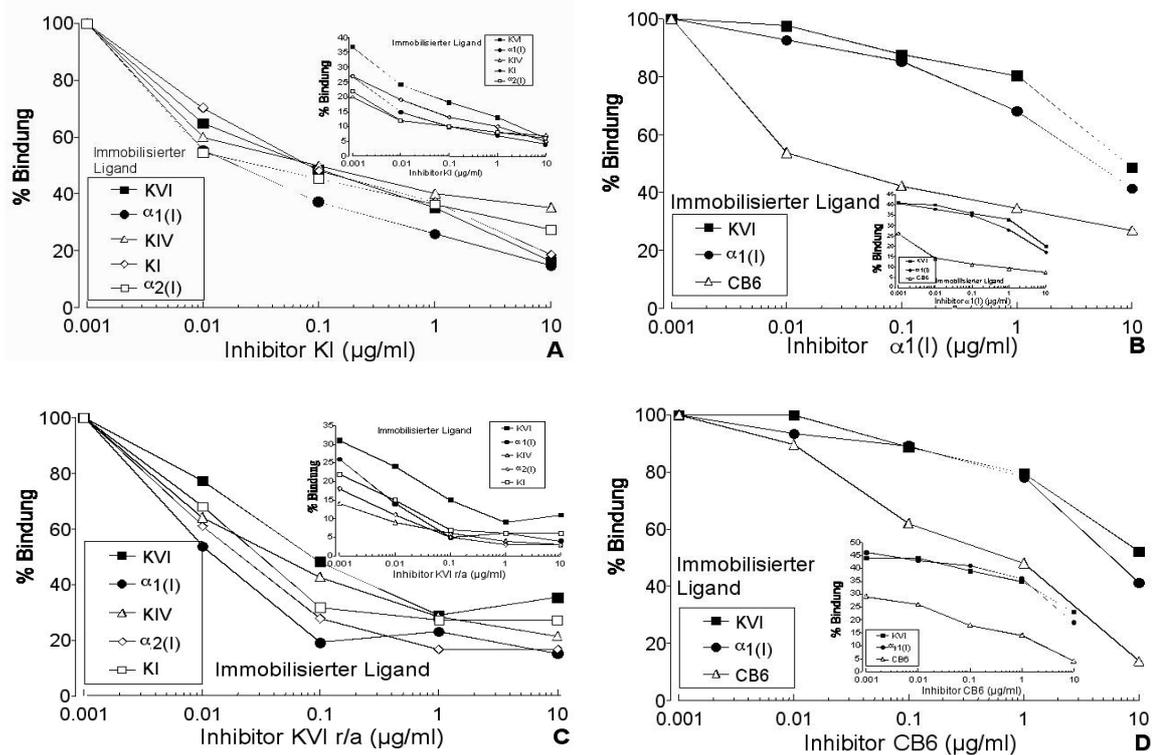


Abbildung 8: Bindungskompetition von löslichen Kollagenen/Fragmenten einer Bindung von KGF an ähnliche immobilisierte Liganden.

Polystyrol- Mikrotiterplatten wurden mit Kollagen I, seinen Ketten $\alpha 1(I)$ und $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(I)$ CB6, Kollagen IV und VI beschichtet je 200 ng/well und mit dem Gemisch aus [125 I]-KGF 1-2 ng/Loch und Kollagen I, $\alpha 1(I)$, KVI r/a und $\alpha 1(I)$ CB6 (A-D) in Lösung als Inhibitor für 2h inkubiert bevor die Mischung dem immobilisierten Liganden für 2h im Loch angeboten wurde. Die Restbindung von KGF wurde nach Waschen im γ -counter bestimmt. Die einzelnen Diagramme zeigen die Bindungsdaten, wobei die Bindung in Abwesenheit des Inhibitors zu 100% gesetzt wurde. In den Inserts sind die Rohdaten gezeigt in % der eingesetzten cpm.

KI, KVIr.a. inhibieren Bindung von KGF an alle Liganden gut, obwohl KI zu Gruppe II und KVIr.a. zu Gruppe I gehören.

Kleinere Inhibitoren ($\alpha 1(I)$ und CB6 von $\alpha 1(I)$) sind schlechte Inhibitoren der Bindung von KGF an große Liganden. Da $\alpha 1(I)$ die Bindung an CB6 und CB6 die Bindung an sich selber gut inhibieren, könnte eine primäre Bindungsstelle auf CB6 liegen.

Ergebnisse

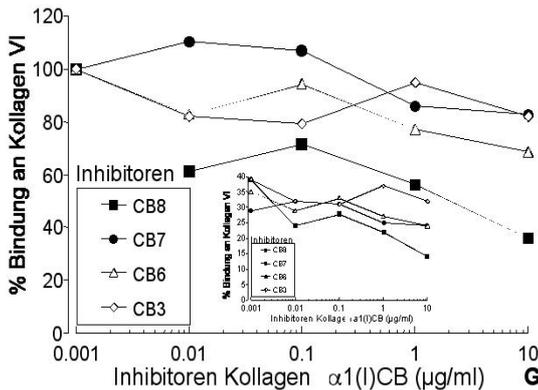
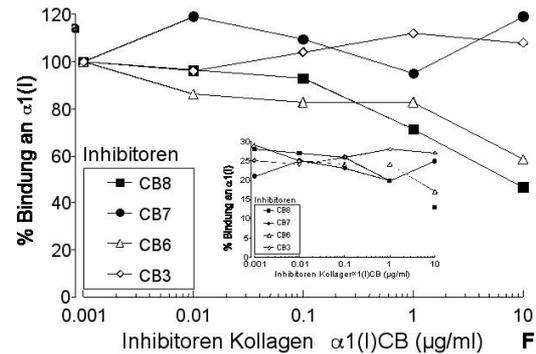
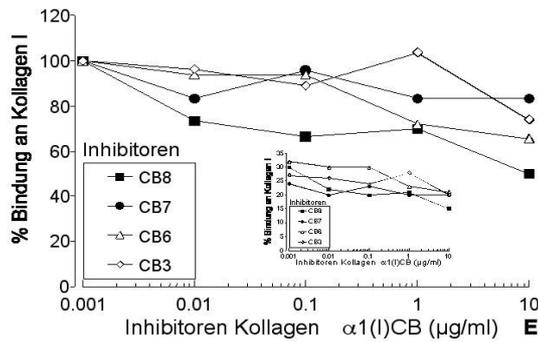


Abbildung 9:
Bindungskompetition von CB-Peptiden der $\alpha 1(I)$ Kette einer Bindung von KGF an die immobilisierten Kollagene I, $\alpha 1(I)$ und VI.

Polystyrol- Mikrotiterplatten wurden mit Kollagen I, $\alpha 1(I)$ und Kollagen VI beschichtet je 200 ng/well und mit dem Gemisch aus ^{125}I -KGF 1-2 ng/Loch und $\alpha 1(I)CB_{3,6,7,8}$ (E-G) in

Lösung als Inhibitor für 2h inkubiert bevor die Mischung dem immobilisierten Liganden für 2h im Loch angeboten wurde. Die Restbindung von KGF wurde nach Waschen im γ -counter bestimmt. Die einzelnen Diagramme zeigen die Bindungsdaten, wobei die Bindung in Abwesenheit des Inhibitors zu 100% gesetzt wurde. In den inserts sind die Rohdaten gezeigt in % der eingesetzten cpm.

Die Bindung von KGF an die großen Kollagene KI und KVI vermögen CB3, CB7 und CB6 von $\alpha 1(I)$ in allen angebotenen Konzentrationen nicht zu beeinflussen (Abbildung 9E und G). CB6 kann aber die Bindung von KGF an die kleineren Kollagenfragmente, immobilisiertes CB6 und an $\alpha 1(I)$ beeinflussen. Im Gegensatz dazu inhibiert CB8 von $\alpha 1(I)$ die Bindung von KGF an große Kollagene (I und VI) und an $\alpha 1(I)$ stark (Abbildung 9F). Die Fragmente CB6, CB7 und CB8 von $\alpha 1(I)$ gehören zur stark bindenden Gruppe I, CB3 von $\alpha 1(I)$ gehört zur schwach bindenden Gruppe II. Erstaunlich ist daher, dass CB7 keinen kompetitiven Einfluß auf die KGF-Bindung zeigt.

Ergebnisse

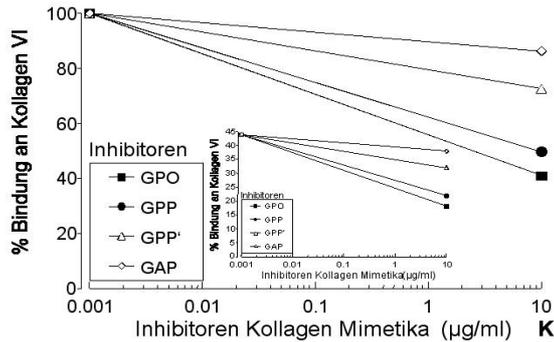
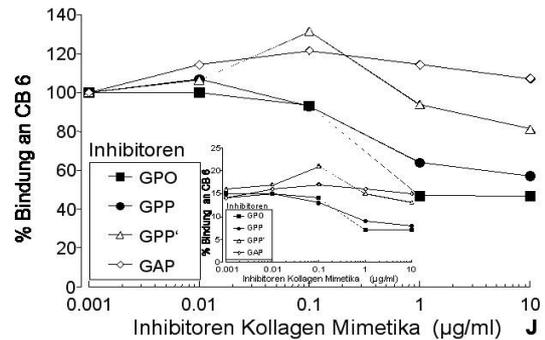
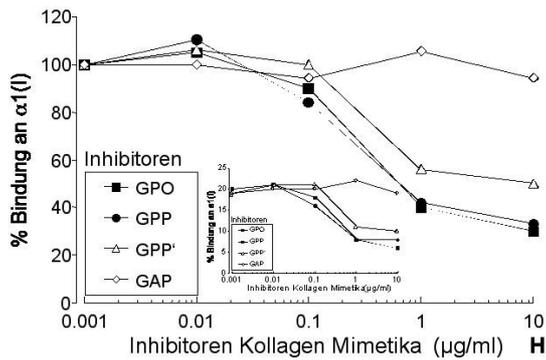


Abbildung 10: Bindungskompetition von synthetischen Kollagenanaloga einer Bindung von KGF an die immobilisierten Kollagene $\alpha 1(I)$, CB6 und VI.

Polystyrol- Mikrotiterplatten wurden mit Kollagen $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(I)$ CB6 und Kollagen VI beschichtet -je 200 ng/well- und mit dem Gemisch aus ^{125}I -KGF 1-2 ng/Loch und GPO, GPP, GPP' und GAP (H-K) in Lösung als Inhibitor für 2h inkubiert bevor die Mischung dem immobilisierten Liganden für 2h im Loch angeboten wurde. Die Restbindung von KGF wurde nach Waschen im γ -counter bestimmt. Die einzelnen Diagramme zeigen die Bindungsdaten, wobei die Bindung in Abwesenheit des Inhibitors zu 100% gesetzt wurde. In den Inserts sind die Rohdaten gezeigt in % der eingesetzten cpm.

GPO, GPP und GPP' gehören zur Gruppe I der stark bindenden Peptide, GAP ist ein Kontrollpeptid.

^{125}I -KGF gebunden an natives Kollagen VI, an $\alpha 1(I)$ und an CB6 von $\alpha 1(I)$ wird alleine durch GPO stark inhibiert, Peptid GPP' und Peptid GAP inhibiert diese Bindung schwach oder gar nicht und das Analog GPP mit mittlerer Tripelhelizität vermag die Bindung von KGF an die $\alpha 1(I)$ -Kette stark und die Bindung an $\alpha 1(I)$ CB6 und Kollagen VI sehr schwach zu stören (Abbildung 10).

Zusätzlich wurde die Bindung von Peptid GPO und KGF an immobilisiertes GPO und GAP untersucht.

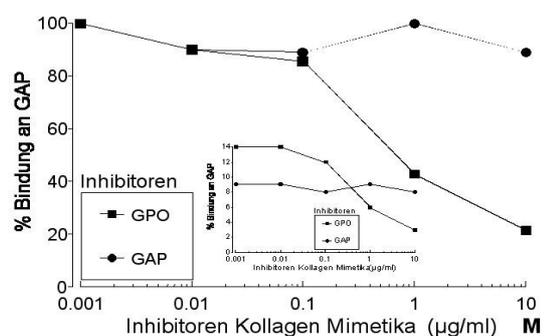
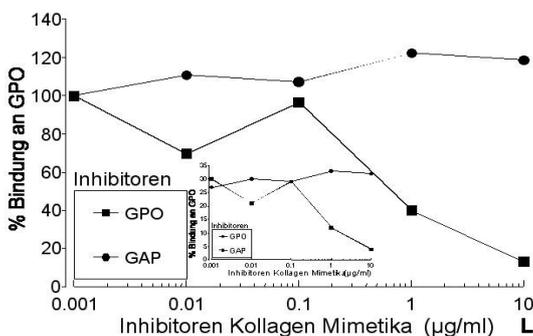


Abbildung 11: Bindungskompetition von synthetischen Kollagenanaloga GPO und GAP einer Bindung von KGF an dieselben immobilisierten Kollagenanaloga

Ergebnisse

Polystyrol- Mikrotiterplatten wurden mit Kollagenanaloga GPO und GAP beschichtet je 200 ng/well und mit dem Gemisch aus [¹²⁵I]-KGF 1-2 ng/Loch und GPO und GAP (L-M) in Lösung als Inhibitor für 2h inkubiert bevor die Mischung dem immobilisierten Liganden für 2h im Loch angeboten wurde. Die Restbindung von KGF wurde nach Waschen im γ -counter bestimmt. Die einzelnen Diagramme zeigen die Bindungsdaten, wobei die Bindung in Abwesenheit des Inhibitors zu 100% gesetzt wurde. In den Inserts sind die Rohdaten gezeigt in % der eingesetzten cpm.

Peptid GPO vermag die Bindung zwischen sich selbst und KGF fast komplett zu inhibieren, während Peptid GAP darauf keinen Einfluss hat. Die Bindung von KGF an Peptid GAP ist sehr gering und wird von GPO sehr stark und von GAP nicht inhibiert (Abbildung 11). GPO gehört zur stark bindenden Gruppe I und GAP ist ein lineares Kontrollpeptid.

Bestimmung der Inhibitorstärke von Kollagen/fragmenten und -analoga mit verschiedenen KGF-Liganden

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche (Kapitel 26) mit den zugrundeliegenden Konzentrationen der Inhibitoren für eine halbmaximale Inhibition der Bindung von KGF (in $\mu\text{g/ml}$) sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.

Liganden	Inhibitoren											
	KI	$\alpha 1(I)$	CB3	CB6	CB7	CB8	KVira	GPO	GPP	GPP'	GAP	Heparin
KI	0.1		20	20	20	10	0.03					10
$\alpha 1(I)$	0.02	5	20	6	20	8	0.015	0.7	0.7	10	20	
$\alpha 2(I)$	0.03						0.02					
CB6		0.025		0.7				1	13	20	20	
KIV	0.1						0.045					20
KVI	0.1	10	20	10	20	2	0.1	2.5	10	20	20	10
GPO								0.7			20	
GAP								0.7			20	

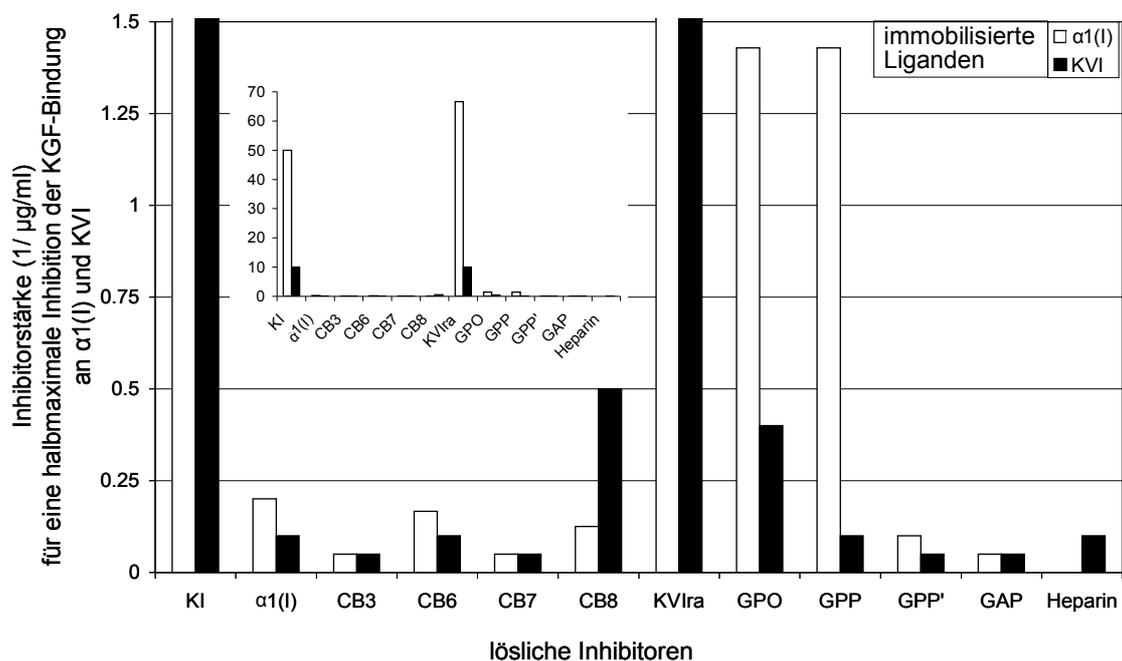


Abbildung 12: Inhibitorstärken löslicher Kollagene/Analoga der Bindung von KGF auf verschiedene immobilisierte Liganden (Daten aus Kapitel 26)

Es wurden verschiedene Kollagene/Analoga immobilisiert (hier als Liganden bezeichnet). Die Bindung von KGF an diese immobilisierten Liganden wurde mit steigenden Konzentrationen an löslichen Kollagenen/Analoga inhibiert und eine halbmaximale Inhibitorkonzentration bestimmt, bei der die Bindung nur noch halbmaximal (bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor) war (in $\mu\text{g/ml}$, Tabelle zu Abbildung 12). Zur Verdeutlichung wurden zwei Liganden ausgesucht, $\alpha 1(\text{I})$ und KVI. Für diese Liganden sind die verwendeten löslichen Inhibitoren als Inhibitorstärke, definiert als die reziproke halbmaximale Inhibitorkonzentration ($1 / \mu\text{g/ml}$), dargestellt (Diagramm). In dem eingefügten Diagramm ist die Ordinate nicht verkürzt, so dass die beiden sehr guten Inhibitoren KI und KVIra dargestellt werden können. Je größer der Wert in dieser Darstellung, desto stärker inhibiert der jeweilige lösliche Inhibitor die Bindung von KGF an $\alpha 1(\text{I})$ bzw. KVI.

Während KI und KVIra sehr gute Inhibitoren der Bindung von KGF an kollagene Strukturen waren, konnten $\alpha 1(\text{I})\text{CB3}$ und CB7 sowie GPP' und das nicht-tripelhelikale Kontrollpeptid GAP die Bindung von KGF an kollagene Strukturen nicht beeinflussen (Abbildung 12). Die löslichen Inhibitoren CB8 und GPP zeigten je nach immobilisiertem Liganden gute Beeinflussung der KGF-Bindung, wobei besonders die Bindung an KVI relativ stark durch CB8 und GPO blockiert wurde und GPO zusätzlich ein guter Inhibitor der $\text{KGF-}\alpha 1(\text{I})$ Bindung ist.

30 Heparin als Kompetitor der KGF- Kollagen Interaktion, Einfluß der Osmolarität

Die Bindung von KGF an seinen Rezeptor (KGFR) ist durch Heparin beeinflussbar und KGF bindet an Heparin, welches als Inhibitor der Bindung von KGF an Kollagene I, IV und VI eingesetzt wurde. Um die Bindung von $[^{125}\text{I}]\text{-KGF}$ an Kollagene weiter zu charakterisieren, wurde zusätzlich die Abhängigkeit der Bindung von der Osmolarität untersucht.

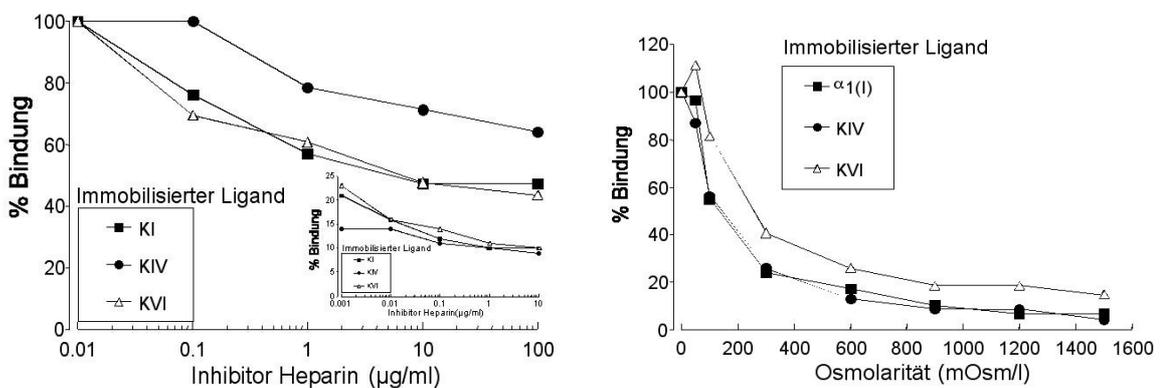


Abbildung 13: Heparin hemmt die Interaktion von [¹²⁵I]-KGF mit den Kollagenen I, IV und VI, die Bindung von KGF an Kollagene und –fragmente ist abhängig von der Salzkonzentration

Auf Mikrotiterplatten wurden Kollagene α1(I), I, IV, VI immobilisiert und mit [¹²⁵I]-KGF allein bzw. in Gegenwart von ansteigender Konzentration von Heparin (links)/ NaCl (rechts) inkubiert. Die Ordinate zeigt prozentual die gebundene Aktivität zur gesamt eingesetzten Aktivität. Die Abszisse beschreibt die eingesetzte Inhibitorkonzentration, wobei der linke äußere Punkt der Abwesenheit des Inhibitors entspricht (Insert nur für Heparin).

Die Bindung von KGF an Kollagen IV wurde durch Heparin schwach inhibiert, die Bindung von KGF an die Kollagene I und VI wurde mittelstark inhibiert. Eine halbmaximale Inhibition der KGF-Bindung wurde für α1(I) bei 100-150 und für die Kollagene IV und VI bei 250 mOsm/l erreicht (Abbildung 13). Heparin kann die Bindung von KGF an Gykanreste enthaltende Kollagene beeinflussen. Die Abnahme der Bindung von KGF bei hohen Salzkonzentrationen weist auf die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen hin.

31 Sättigbarkeit der Bindung und Affinität der KGF- Kollagen- Interaktion

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der KGF-Kollagen Interaktion wurden Sättigungsstudien durchgeführt. Steigende Konzentrationen von unmarkiertem KGF wurden mit konstanten Konzentrationen von [¹²⁵I]- KGF (1 ng = 0,04 pmol/well) inkubiert (s. Methoden).

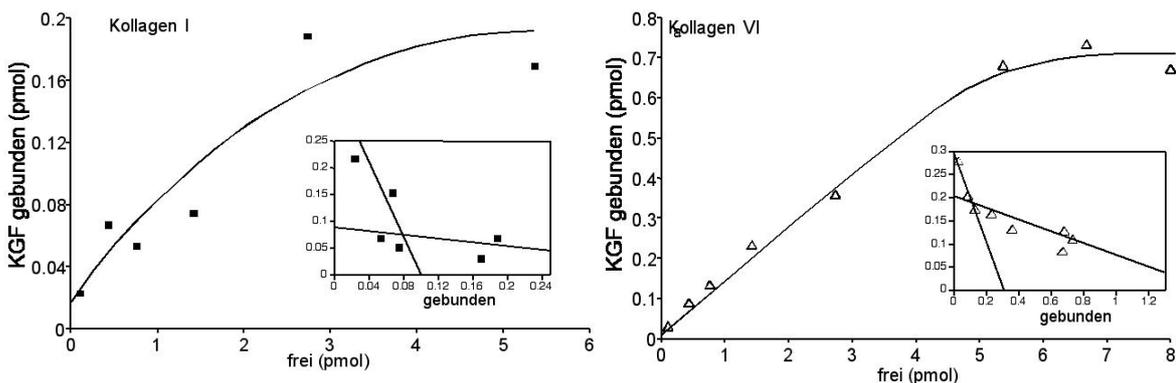


Abbildung 14: Die Bindung von KGF an immobilisiertes Kollagen folgt einer Sättigungskinetik.

Es wurden Kollagen I und VI je 200 ng/Loch immobilisiert. Einer konstanten Menge von [¹²⁵I]- KGF wurde eine steigende Menge von unmarkiertem KGF und dieses Gemisch dem immobilisierten Kollagen zugegeben und die Restbindung am γ-counter bestimmt. Die Dissoziationskonstante (K_D) der KGF-Kollagen Interaktion wurde graphisch mit der Scatchard Methode (Insert) ermittelt und ergibt eine K_D von rund 10⁻⁸ und 10⁻⁹ mol. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Experimenten mit jeweils 3fach Werten.

Ergebnisse

Die Sättigung wird bei 5-7 pmol des zugefügten KGF/100µl auf 200 ng/Well (ca. 0,65 pmol) für immobilisiertes Kollagen I (MW ca. 300.000) und für Kollagen VI (MW ca. 320.000) mit einer vorbeschriebenen Beschichtungseffizienz zwischen 30-40% erreicht. Die Scatchard- Analyse der getesteten Kollagene ergibt Bindungsstellen für KGF mit vergleichbarer Affinität, mit einer Dissoziationskonstante (K_D) zwischen 10^{-8} und 10^{-9} mol/l. Basierend auf diesen Daten ergibt sich, dass 1 mol immobilisiertes, natives Kollagen I ca. 1 mol und das mikrofibrillenbildende Kollagen VI ca. 3 mol KGF zu binden vermag.

32 Kollagen-gebundenes KGF ist biologisch aktiv

Die biologische Aktivität von Kollagen-gebundenem KGF wurde mit Hilfe der Keratinocyten-Zelllinie HaCaT (von N. Fusening, Heidelberg) untersucht. Diese Zelllinie kann durch KGF stark in ihrer Proliferation angeregt werden.

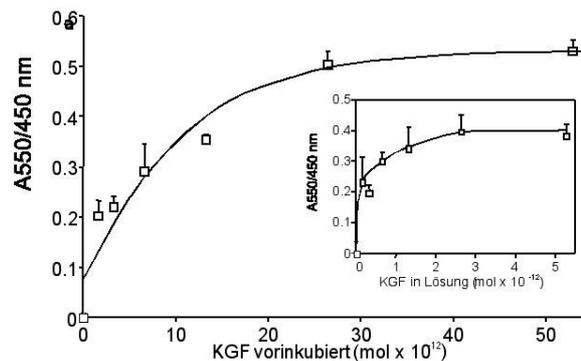


Abbildung 15: Kollagen-gebundenes KGF stimuliert das Wachstum von HaCaT-Zellen

Die biologische Aktivität von Kollagen-gebundenem KGF wurde im Zellversuch bestimmt. Dazu wurden, ähnlich den Bindungsstudien 2 µg/100µl/well $\alpha 1$ von Kollagen I immobilisiert, mit steigenden Mengen KGF inkubiert und gewaschen, bevor 100.000 HaCat Epithelzellen/ml für 72 h in Minimalserum ausgesät wurden. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mit SRB wurde deren Zahl im Photometer bei 550/450 nm bestimmt. Parallel dazu wurde die Proliferation der Zellen nach Zugabe von löslichem KGF bestimmt (Insert).

Kollagen I und $\alpha 1(I)$ gehören beide in Gruppe II der schwach-KGF bindenden Liganden. Für Kollagen I ist in Abbildung 14 eine Sättigung der Bindung im Bereich von 5 pmol freiem KGF erreicht, wobei in dem linearen Bindungsbereich vorher ungefähr 10% der Moleküle binden. Zum anderen können die Zellen nur bis zu einer Konzentration von 2 pmol KGF linear in ihrer Proliferation stimuliert werden. Die beobachtete Sättigung der Proliferation nach KGF-Vorinkubation bei angebotenen freien KGF-Mengen > 20 pmol könnte also durch den Effekt der Bindungssättigung aber auch durch die nicht mehr

Ergebnisse

steigerbare Proliferationssättigung zustande kommen. Auf jeden Fall scheint das gebundene KGF zu 100% aktiv zu sein.

33 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Bindung von KGF an Kollagen. Ausgehend von der Beobachtung, dass KGF in der fibrotischen Leber an fibrilläre Kollagene band, wurden Konsensusbindungssequenzen auf Seite der Kollagene gesucht. Die Bindungsstärken wurden in Festphasenassays mit immobilisierten Kollagenen, -fragmenten und kollagenen Analoga abgeschätzt und die Zahl der KGF-Moleküle pro Kollagenkette bestimmt. Zusätzlich wurde die biologische Aktivität von KGF im freien und gebundenen Zustand untersucht. Die Modulation der Verfügbarkeit und Aktivität von KGF, welches in der Leber gespeichert an Kollagen vorliegt, könnte zukünftig im Rahmen einer Fibrosetherapie den epithelialen Umbau und die Hepatozytenregeneration positiv beeinflussen. Als wichtigstes und bisher nicht beschriebenes Ergebnis konnte in dieser Arbeit die Tripelhelizität der Kollagenhelix sowie die spezifische Aminosäure Hydroxyprolin als wichtig für einen extrazellulären KGF-Bindungspartner identifiziert werden (72).

Immunlokalisierung von KGF in fibrotischer Leber

Zu Beginn der Arbeit konnte gezeigt werden, dass KGF zum einen perizellulär, Hepatozyten-assoziiert, aber auch in fibrotischen Septen gebunden wird (Abbildung 4). Es ist bekannt, dass KGF parakrin wirkt und von mesenchymalen Zellen (hepatische Sternzellen, Myofibroblasten) exprimiert während der Rezeptor für KGF von epithelialen Zellen (Hepatozyten) exponiert wird (71). Wie in Abbildung 4 ersichtlich, konnte KGF stark perizellulär, aber auch Fibrillen-assoziiert in hepatischen fibrotischen Septen angefärbt werden und die Vorinkubation des Leberschnitts mit KGF führte zu einer starken Anfärbung im Parenchym (Hepatozyten im Regeneratknoten, ev. Rezeptorassoziation).

Screening der Bindungsliganden von KGF mittels Festphasenbindungsassay

Über die nicht-zelluläre Lokalisation war bekannt, dass Mitglieder der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) über Fibronectin, Heparansulfate/Heparin, SPARC, Fibrinogen und Vitronectin an die EZM assoziiert sind.

Tabelle 3: Interaktion von Wachstumsfaktoren mit extrazellulärer Matrix

Wachstumsfaktor	Moleküle in der perizellulären Matrix, die mit WF interagieren	Moleküle in der interstitiellen EZM, die mit WF interagieren
TGF-β	Betaglycan Biglycan Kollagen IV Decorin Fibronectin SPARC	Betaglycan Decorin Fibronectin Thrombospondin Vitronectin
PDGF	Collagen IV, V Fibronectin	Kollagen I, II, III, IV Fibronectin

Diskussion

	SPARC	Vitronectin
	Hyaluronan	
VEGF	Fibronectin	Fibronectin
	Heparansulfat/Heparin	Heparansulfat/Heparin
	Hyaluronan	
	SPARC	
TNF- α	Biglycan	Fibronectin
	Fibronectin	Decorin
HGF	Fibronectin	Kollagen
	Heparansulfat/Heparin	Fibronectin
	Vitronectin	
FGF	Heparansulfat/Heparin	Fibronectin
	SPARC	Vitronectin
IGF	Fibronectin	Decorin
		Fibronectin
IL		Vitronectin
		Fibrin(ogen)
		Versican

nach (30, 82, 83)

Wie in der Tabelle 3 aber auch ersichtlich ist, war die Lokalisation von KGF an Kollagene bisher nicht untersucht worden. In der eigenen Arbeitsgruppe waren diesbezüglich HGF, PDGF, IL-2 und OSM untersucht und diese Wachstumsfaktoren als Kollagen-assoziiert identifiziert worden (10, 34, 73, 84).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass KGF (FGF-7) *in vitro* an immobilisierte Glykoproteine wie Laminin, Fibronectin und Kollagen XIV aber auch an fibrilläre Kollagene, deren Fragmente und an tripelhelikale Kollagenanaloga mit unterschiedlicher Affinität bindet (Abbildung 5). Die Bindungsstärken der einzelnen Komponenten ließen sich in zwei Gruppen unterteilen (vergl. Kapitel 26). Die Mittelwerte der Einzelversuche wurden einer Varianzanalyse unterzogen (One way Anova) und anschließend paarweise verglichen (pairwise comparison- Tukey Test). Statistisch ergaben sich damit signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen, wobei die Wahrscheinlichkeit von Überschneidungen ($p < 0,05$) offengehalten wurde. Damit gehören die untersuchten Glykoproteine sowie KIII und KVI und die größeren CB-Fragmente von $\alpha 1(I)$ und alle tripelhelikalen Kollagenanaloga zu den KGF-bindenden „starken“ Liganden. Insgesamt konnte man aber ausgehend von diesen Versuchen, nicht eine primäre Konsensusbindungssequenz annehmen, da verschieden Kollagene und deren Fragmente als KGF-Liganden fungierten, sondern musste davon ausgehen, dass ev. Sekundärstrukturmerkmale wie eine starke Tripelhelix und -wie schon bekannt- Zuckerrreste auf den oben genannten Glykoproteinen für die Bindung verantwortlich waren.

Screening der Bindungsliganden von KGF mittels Ligandenblot

Auf der Suche nach Konsensusbindungsstrukturen wurden die Ketten von KI, KIV, KVI und die CB-Peptide der $\alpha 1(I)$ -Kette gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und radioaktives KGF gebunden (Abbildung 6). Es zeigte sich, dass alle Ketten und Fragmente KGF gut banden mit Ausnahme der $\alpha 1(VI)$ -Kette und dem kleinen CB3(I). Dies könnte durch einen hohen Glykolisierungsgrad der $\alpha 1(VI)$ -Kette und der geringen Tripelhelizität des CB3-Fragmentes erklärbar sein (85). Ähnlich wie bei den Festphasenbindungsversuch zeigte sich auch hier, dass keine Primärminosäuresequenz für die Bindung an KGF verantwortlich ist, sondern eher die Sekundärstruktur und ev. kollagenspezifische Merkmale wie Hydroxyprolinegehalt und der Glykolisierungsgrad der Kollagene.

Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von KGF an Kollagen I/Fragmente und Analoga

Zur Untersuchung von kleinen Peptiden und Fragmenten ist der Ligandenblot nicht geeignet. In der Dot-Blot Analyse der Bindungsliganden von KGF wurde gefunden, dass besonders die stark tripelhelikalen und Hydroxyprolin-haltigen Proteine (KI, GPO) gute Liganden von KGF sind (Abbildung 7). Das tripelhelikale, aber kein Hydroxyprolin-enthaltende GPP war hier ein mittelguter Ligand, während das lineare Kontrollpeptid GAP keine Interaktion mit KGF zeigte. Wie schon beim Ligandenblot beobachtet, konnte also keine Primär-Konsensussequenz nachgewiesen werden; gemeinsame Eigenschaften der guten Bindungspartner sind dagegen hohe Tripelhelizität und hoher Hydroxyprolinegehalt.

KI

Kollagen I bindet KGF schwach (Abbildung 5), inhibiert aber die Bindung von KGF an allen getesteten immobilisierten Liganden, KI, $\alpha 1$, $\alpha 2(I)$, KIV und KVI, (Abbildung 12) sehr stark. Dies könnte Hinweis darauf sein, dass offensichtlich mehr Bindungsstellen für KGF zugänglich sind, wenn KI in Lösung vorliegt bzw. könnten Bindungsstellen durch das Immobilisieren verdeckt werden. Die Bindung von KGF an KI konnte von dem sehr guten löslichen Inhibitor KVI, aber auch durch CB8(I) und Heparin in hohen Konzentrationen beeinflusst werden (Abbildung 12). Die nur mäßige Inhibition der KGF-KI Bindung durch Heparin spricht dafür, dass die Bindungsstellen auf KGF für kollagene Strukturen und für Heparin nicht vollständig überlappen bzw. getrennt vorliegen und/ oder durch die Bindung z.B. von Heparin an KGF eine zuvor beschriebene Konformationsänderung induziert wird, die auch die KI-Bindung beeinflusst (55, 61, 86).

CB-Peptide

Die definierten Cyanbromid-Spaltprodukte der $\alpha 1(I)$ -Kette (CB3, CB6, CB7 und CB8, mit 149, 264, 271 und 279 Aminosäuren) haben Schmelztemperaturen von 23.9, 26.7, 28.1 und 28.0 °C (75, 87). Je höher die Schmelztemperatur ist, desto stabiler ist ein Molekül, im Falle der CB-Peptide ist für die Stabilität die kollagene Tripelhelix verantwortlich. Der große Anteil der GPP oder GPO Motive in CB6, CB7, CB8 zeigt, dass in den längeren CB Peptiden eine minimale Anzahl aufeinanderfolgender GPO/GPP Triplets zusätzlich zu einer tripelhelikalen Struktur und der kollagenspezifischen Aminosäure Hydroxyprolin vorhanden sein muss, um als guter Bindungsligand für KGF zu fungieren. Eine Untersuchung der Sequenz von CB3 ergab, dass sie vier isolierte GPP oder GPO Triplets umfasst, andererseits die Cyan Bromid Peptide CB6, CB7 und CB8 12, 12 und 9 Triplets in ihrer Sequenz aufweisen (88). CB6 enthält eine ununterbrochene Folge von mehr als zwei Triplets GPO oder GPP (insgesamt 5 in der Sequenz), während CB7 und CB8 ein oder zwei aufeinanderfolgende Triplets enthalten. Die vorgestellten Bindungs- und Inhibitionsdaten unterstützen die These, dass KGF an tripelhelikale, Hydroxyprolin-haltige Strukturen bindet: CB3 mit der geringsten Tripelhelizität bindet KGF schlecht (Kapitel 26) und inhibiert die Bindung von KGF an Kollagene nur schwach (Abbildung 9). CB6 von $\alpha 1(I)$ bindet KGF sehr gut (Kapitel 26) und inhibiert die Bindung von KGF an sich selbst sehr gut. Im Vergleich von CB7 und CB8 ist CB8 ein stärkerer Inhibitor der KGF-Bindung an kollagene Strukturen. CB7 zeigte im Festphasenbindungsassay eine gute Bindung von KGF war aber als Inhibitor wirkungslos (Abbildung 12).

Bindung an KVI

Kollagen VI bzw. sein Kettengemisch KVIra ist ein starker Inhibitor der Bindung von KGF an alle getesteten immobilisierten Liganden (Abbildung 12, eingefügtes Diagramm) und bindet KGF auch immobilisiert im Gefäß sehr gut (Abbildung 5), sodass Kollagen VI wahrscheinlich eine Bindungsstruktur aufweist, die durch das Immobilisieren nicht verändert bzw. abgedeckt wird. Da bei der Isolierung von dem hier verwendeten KVI aus Plazenta mittels Pepsinsolubilisierung nur der tripelhelikale Anteil der Kollagene übrig bleibt, was im Fall von KVI den Verlust von 2/3 der Masse bedeutet, muss die KGF-Bindungsstruktur sich auf den kurzen Tripelhelix-Abschnitt beschränken. In einer neueren Arbeit der Arbeitsgruppe konnte der tripelhelikale Anteil der $\alpha 2(VI)$ -Kette als Ligand für Kollagenasen in der fibrotischen extrazellulären Lebermatrix identifiziert werden, der als Speicher für die inaktiven Proformen dieser Proteasen dient (89). Dieser enthält aber auch Glykanreste an die KGF binden kann, wobei bekannt ist, dass KGF an Glykane von anderen Proteoglykanen bindet (85). Dies wird auch durch die Inhibition der KGF-Bindung durch Heparin bestätigt (vergl. Kapitel 26). Kürzlich wurden drei neue Ketten von KVI

Diskussion

beschrieben, wobei die Expression nur Organ-spezifisch stattfindet und z.B. nur die $\alpha 6(\text{VI})$ in Leber exprimiert wird (90). Diese neuen Ketten wurden aber im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht.

Kollagenanaloga

Die bevorzugte Bindung von KGF an GPO noch vor GPP weist darauf hin, dass die Tripelhelizität, die sich in hohen Schmelztemperaturen zeigt bzw. die Hydroxylgruppe des Hydroxyprolins eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 5). Die Stärke des Bindungsmotivs aufeinanderfolgender GPO/GPP-Triplets unterstreichen auch Bindungs- und Inhibitionsversuche mit den verwendeten synthetisch hergestellten Peptiden, die aus einer Aminosäuresequenz bestehen, deren Triplets sich zehnmal wiederholen (Abbildung 10) (76, 77). Die Bindung von KGF an CB6 konnte nur durch GPO und nicht durch die anderen Kollagenanaloga inhibiert werden. GPO inhibiert stärker als GPP die Bindung von KGF an Kollagen VI (Abbildung 10), welches ein sehr starker Bindungspartner für KGF ist (Abbildung 5). Die schwächere Bindung an GPP (enthält kein Hydroxyprolin) und GPP' (Abbildung 5, Abbildung 7), einem tripelhelikalen Peptid mit Anteilen von 10 hintereinander folgenden GPP-Triplets, unterbrochen von einem Integrin-bindenden Motiv (76, 77) zeigt, dass ein Minimum von fünf aufeinander folgenden GPO-Molekülen notwendig für die KGF- Kollagen Interaktion ist. Eine Bindung kommt nicht zustande mit dem analogen, jedoch nicht helikalen Peptid GFOGER-GAP.

Heparin

KGF, als ein Mitglied der FGF Familie, bindet an Heparin und Heparinsulfat (61, 91, 92). Die Interaktion von KGF und seinem Rezeptor FGFR2-IIIb (55, 93) kann durch Heparin teilweise verhindert werden, teilweise wird Heparin benötigt, um einen stabilen KGF-KGFR Komplex zu erhalten (55, 94). Die Bindung von KGF an Kollagene kann durch Heparin nicht komplett verhindert werden (Abbildung 13). Wir deuten dies als ein weiteres Indiz dafür, dass die tripelhelikale Struktur in der KGF-Kollagen Interaktion eine entscheidende Rolle spielt. Für KGF wurde gezeigt, dass zwei räumlich entfernt liegende Bindungsdomänen für Heparin und gleichzeitig den Rezeptor existieren (86). Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mit Heparin und den synthetischen Kollagenanaloga zeigen aber, dass entweder Kollagene ebenfalls an diese Bindungsstellen auf dem KGF binden, wobei Heparin dann in Konkurrenz zu Kollagen tritt, oder aber es eine weitere Heparin-unabhängige Kollagenbindungsstelle auf dem KGF gibt. Dass es sich dabei um dieselbe Bindungsstelle am KGF für Heparin und Kollagen handelt, muss ausgeschlossen werden, da die Inhibition von KGF am Kollagen durch Heparin nicht vollständig war. Auch die Anwesenheit von nur locker assoziierten Glykanen/Proteoglykanen an unseren

Diskussion

Kollagenpräparationen kann ausgeschlossen werden aufgrund der mehrfach gezeigten Reinheit unserer Kollagenpräparation durch Pepsinverdau und rigide Salzfällungen (72). Wie später bekannt wurde, enthält Haut einen weiteren wichtigen Kofaktor für KGF, Heparin und auch Dermatan-sulfat, welches aber hier in meiner Arbeit nicht als Inhibitor der Kollagenbindung eingesetzt wurde (95). Interessanterweise sind beide Glykane an KVI assoziiert und ermöglichen damit eine zusätzliche Tripelhelix/(Hydroxyprolin)-unabhängige Bindung von KGF an KVI (85). Heparin inhibiert die Bindung von KGF an Kollagen I nur halbmaximal. Die Cyanbromidpeptide von $\alpha 1(I)$ und besonders CB6 werden an einigen Hydroxylysinresten glykolysiert (Glukose-Galaktose) (96). Diese Glykanreste könnten für die Inhibitionswirkung von Heparin bezüglich der Bindung von KGF an Kollagen I verantwortlich sein. Ein weiterer bzw. alternativer Mechanismus wäre die Inhibition der Bindung über ionische Wechselwirkungen. Dies wurde durch Erhöhung der Salzkonzentration im Bindungsassay auch gezeigt.

Salz

Das die Bindung von KGF an die Kollagene durch eine ansteigende Osmolarität verhindert werden kann, zeigt, dass die Verbindung hauptsächlich ionischen Charakter hat, welcher schon für andere Kollagen-Wachstumsfaktoren-Interaktionen gezeigt werden konnte (Abbildung 13)(10, 34). Im Kontext der Möglichkeit der nichtkovalenten Bindungen, als da wären ionische-, dipol-, v.d. Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen, konnten wir zeigen, dass aufgrund des ionischen Charakters (Salzabhängigkeit) es sich um eine ionische und damit mittelstarke Bindung handeln muss.

KGF-HGF

Nun stellt sich die Frage, gibt es noch andere Faktoren, die an Kollagene binden und wie ist diese Bindung beschaffen? Dazu wurde ausserhalb meiner Doktorarbeit aber im Rahmen der Veröffentlichung ein weiteres Heparin-bindendes Zytokin, nämlich HGF, getestet in Konkurrenz zur KGF Bindung an Kollagen Typ I, III und VI (72). Eine maximale Inhibition der KGF Bindung an Kollagen I und III wurde bei einem 120 fachen molaren Überschuss von dazugegebenem HGF beobachtet. Bei Kollagen VI war ein 140 facher molarer Überschuss notwendig, um eine nur halbmaximale Inhibition zu erreichen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass beide Wachstumsfaktoren (KGF, HGF) auf Kollagen I und III mutmaßlich die gleiche Bindungsstelle haben müssen, hingegen es auf KVI für KGF zusätzliche Bindungsstellen – z.B. die oben beschriebenen Zuckermoleküle - gibt. In neueren Arbeiten werden unsere Ergebnisse bestätigt, insoweit das HGF und KGF überlappende Bindungsstrukturen auf Zuckermolekülen (Heparin-, Chondroitin-, Dermatan-sulfatoligosaccharide) aufweisen (97).

Diskussion

Sättigung

Von einer spezifischen Bindung, im Gegensatz zu einer unspezifischen Bindung, wird nach dem pharmakologischen Prinzip der Liganden-Rezeptoren-Interaktion gefordert, dass die Bindung des Liganden, hier KGF, an den Rezeptor, in dem Fall die Kollagene, antagonisiert werden kann und sättigbar ist (57). Eine unspezifische Bindung, wie die von KGF an Polystyrol, die als Kontrolle diente, weißt diese Eigenschaften nicht auf.

Sättigungsstudien der KGF-KollagenI/ VI Bindung (Abbildung 14) ließen uns Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-8} M - 10^{-9} M abschätzen und entsprechen damit dem Wert, den auch andere Wachstumsfaktoren-Kollagen Bindungen aufweisen (10, 34, 73, 84). Dieser Wert (10^{-8} , 10^{-9} M) entspricht der Affinität von KGF zu seinem Rezeptor (55, 98).

Die Abschätzung der Bindungsmolariäten von Ligand und KGF mittels Scatchard- Analyse ergab 1 Mol immobilisiertes placentales tripelhelikales Kollagen I und III-Fragment binden schätzungsweise 1 Mol, Kollagen VI-Fragment dagegen bindet 3 Mol KGF (72). Da bei einer spezifischen Bindung nur eine bestimmte Anzahl Bindungsstellen zur Verfügung steht, nähert sich die Menge des gebundenen Liganden asymptotisch einem Maximum, während eine unspezifische Bindung linear mit der Menge des angebotenen Liganden ansteigt. Diese Zahlen sind als Minimum anzusehen, da davon auszugehen ist, dass die räumliche Konformation der, auf Polystyrol immobilisierten, Kollagene im Reaktionsgefäß die Freilegung aller Bindungsstellen nicht zulässt.

Biologische Funktion von KGF in der Wundheilung

Die gezeigten Ergebnisse bezüglich Bindung von KGF am Kollagen der extrazellulären Matrix, gezeigt in *in vitro* Experimenten und der biologischen Aktivität von matrixgebundenem KGF, gezeigt in einem Bioassay mit Keratinozyten einer Melanomzelllinie (Abbildung 15), legen den Schluß nahe, dass diese Assoziation wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Speicherung, der lokalen Verfügbarkeit und Aktivität dieses Wachstumsfaktors spielt.

Die Wundheilung wird durch die koordinierte Freisetzung vieler verschiedener Polypeptide kontrolliert. KGF ist in mesenchymalem Gewebe (Muskel, Gefäße), welches sich unter einer verletzten epithelialen Schicht befindet, hochreguliert. KGF findet sich nach Hautverletzung, bei Erkrankungen im Intestinaltrakt und bei Hepatitis, es fördert die Reepithelisation von Haut, Interstitium und Leber und damit deren Regeneration (13, 70, 99, 100). Lokal oder systemisch produziertes KGF, wird an Kollagene der extrazellulären Matrix gebunden und gespeichert. Damit ist aber ein Teil des vorhandenen KGFs in der Matrix versteckt, nicht direkt für Zellen zugänglich, und kann erst mit seinen Zielzellen, den Keratinozyten oder den Hepatozyten, in Kontakt treten. Bei Matrixverringern

Diskussion

(Fibrolyse), durch Zellmigration oder therapeutisch über eine Freilassung von KGF von der extrazellulären Matrix durch Konkurrenzproteine (GPO) könnte also KGF mit seinen Zielzellen interagieren. Des Weiteren könnten die Ergebnisse in die Entwicklung eines Kollagenvliesses einfließen, bestehend aus Fragmenten von Kollagen VI, das selbst proliferativ auf adhärente mesenchymale und epitheliale Zellen wirkt (101). Das Vlies könnte mit KGF beimpft und auf die Wunde aufgebracht werden. Das therapeutische Feld dafür wäre sehr groß, angefangen vom postoperativen Einsatz um die Wundheilung zu forsieren und kostensparend zu behandeln, über die Möglichkeit auch sekundär heilende Wunden günstig zu beeinflussen, bis hin zur Stabilisierung ausgeprägter, großflächiger Wunden beispielsweise nach Verbrennungen mit all ihren Komplikationen.

KGF in der Leberfibrose

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass KGF an Kollagen bindet, welches sich in den fibrotischen Strängen einer alkoholgeschädigten Leber zwischen den Regeneratknoten befindet, wobei KGF auf Kryoschnitten mittels eines polyklonalen Antikörpers zur Darstellung kam (Abbildung 4). Kürzlich konnte in humaner Leber gezeigt werden, dass KGF die Hepatozytenproliferation und damit die Leberregeneration verstärkt (71). Um die regenerative Fähigkeit des KGFs therapeutisch nutzen zu können, wäre denkbar, dass das kleine Kollagenfragment CB8, oder synthetische Analoga der Struktur von GPO und in hohen Konzentrationen auch Heparin bzw. Heparinanaloga die Bindung von KGF an die fibrotischen Septen beeinflussen könnte. Inwieweit auch kleinere Fragmente der KVIra-Ketten dies tun, muss in weiteren Versuchen gezeigt werden. Bei chronischen Lebererkrankungen wurde eine erhöhte KGF-Expression in hepatischen Sternzellen beobachtet, wobei die streng parakrine Wirkungsweise von KGF auch in der Leber dadurch gezeigt wurde, dass der KGF-Rezeptor ausschließlich auf Hepatozyten gefunden wurde (102). Therapeutisch könnte man durch Einsatz von GPO, versuchen, das Kollagen-gebundene KGF freizusetzen, und damit die Fibrosierung bzw. eine Carcinogenese (der Hepatozyten) zu unterbinden (103).

34 Zusammenfassung

Kollagene gehören zur extrazellulären Matrix (EZM), die in Wechselwirkung mit den umgebenden Zellen steht und dabei nicht nur ein mechanisches Gerüst für deren Anheftung und Wanderung, sondern ein komplexes Netzwerk darstellt. Die EZM besteht neben den Kollagenen aus Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und assoziierten Faktoren. Die EZM kommuniziert mit den Zellen ihrer Umgebung teilweise über definierte Sequenzen von Oligopeptiden und strukturellen Domänen ihrer Moleküle und bewirkt im Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren eine koordinierte Signaltransduktion. Bei der Leberfibrose besteht ein Ungleichgewicht von Matrixsynthese und -abbau sowie auch ein qualitativer Unterschied bez. ihrer Bestandteile. Ausgelöst durch schädigende Noxen kann man sich die Fibrose als einen kontinuierlichen Wundheilungsprozess vorstellen, der mit einer Narbenbildung einhergeht. Aufgrund der Chronifizierung des Prozesses, der später auch ohne Entzündungsreaktionen abläuft, muss sich neben der Änderung der Bindegewebsbestandteile auch die Menge und Art der assoziierten Wachstumsfaktoren ändern. In dieser Arbeit wurde diesbezüglich der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) untersucht und als Matrix-assoziiert klassifiziert wurde. Mit Hilfe von synthetisch hergestellten Kollagenmimetika konnten wir das tripelhelikale, Hydroxyprolin-haltige Molekül (Gly- Pro- Hyp)₁₀ als potenten Inhibitor der Kollagenbindung von KGF identifizieren und damit auch die eigentliche Bindungssequenz auf der Matrix definieren. Wir konnten zeigen, dass der von mesenchymalen Zellen stammende und epitheliale Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregende KGF an die Kollagene I, III und VI bindet. Die Interaktion ist spezifisch und durch eine definierte Anzahl von Bindungsstellen pro Kollagenmolekül charakterisiert. KGF ist in dieser gespeicherten Form biologisch aktiv, es stimuliert z.B. die Proliferation einer transformierten Keratinozyten (HaCat) Zelllinie. Die Modulation von fibrosierenden und regenerativen Prozessen über die Beeinflussung der Speicherung und lokalen Aktivität von Wachstumsfaktoren in der extrazellulären Matrix könnte durch inhibitorische Peptide oder Analoga gelingen, was ein perspektivisch ergänzendes Konzept in der Behandlung einer Fibrosierung ist.

35 Abkürzungen

AK	Antikörper
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Arg	Arginin
bFGF	basic fibroblast growth factor (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor)
BSA	Bovines Serumalbumin
CPM	counts per minute (Zerfallsereignisse pro Minute)
CTGF	connective tissue growth factor (Bindegewebe-Wachstumsfaktor)
Cys	Cystein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fötales Kälberserum
Fn	Fibronectin
Glu	Glukosamin
Gly	Glycin
HGF	hepatocyte growth factor (Hepatozytenwachstumsfaktor)
HSC	hepatische Sternzelle
Hyp	Hydroxyprolin
Ile	Isoleucin
kD	Kilodalton
kDa	Kilo-Dalton
KGf	keratinocyte growth factor (Keratinozytenwachstumsfaktor)
KGFR	Keratinozytenwachstumsfaktor-Rezeptor
KI	Kollagen I
KII	Kollagen II
KIII	Kollagen III
KIV	Kollagen IV
KV	Kollagen V
KVI	Kollagen VI
Lam	Laminin
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“ (= erk)
MMP	matrix metalloproteinase (matrixabbauendes Enzym)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	„platelet-derived growth factor“ (Plättchenwachstumsfaktor)
Pro	Prolin
SDS	<i>Sodiumdodecylsulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TC	total counts (Gesamtzählereignisse)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase (MMP Inhibitor)
Tris	Trishydroxyethylaminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der CB-Fragmente von $\alpha 1(I)$	12
Abbildung 2: Autoradiographie nach Gelelektrophorese einer repräsentativen Markierung von 125I-KGF.....	16
Abbildung 3.....	17
Abbildung 4: KGF bindet extrazellulär an die fibrotischen Septen humaner zirrhotischer Leber	22
Abbildung 5: 125I-KGF bindet an immobilisierte Kollagene und Kollagenfragmente.....	23
Abbildung 6: Liganden Blot Darstellung von KI, KIV, KVI, $\alpha 1(I)$ CB (Fragmente gesamt), CB8, CB7, CB6 und CB3 (alle $\alpha 1(I)$) mittels Proteinfärbung bzw. Filmschwärzung durch gebundenes 125I- KGF	25
Abbildung 7: Dot Blot Darstellung der Bindung von 125I-KGF an KI, $\alpha 1(I)$, CB6 von $\alpha 1(I)$, GPO, GPP, GPP', GAP und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen.	25
Abbildung 8: Bindungskompetition von löslichen Kollagenen/Fragmenten einer Bindung von KGF an ähnliche immobilisierte Liganden.	26
Abbildung 9: Bindungskompetition von CB-Peptiden der $\alpha 1(I)$ Kette einer Bindung von KGF an die immobilisierten Kollagene I, $\alpha 1(I)$ und VI.	27
Abbildung 10: Bindungskompetition von synthetischen Kollagenanaloga einer Bindung von KGF an die immobilisierten Kollagene $\alpha 1(I)$, CB6 und VI.	28
Abbildung 11: Bindungskompetition von synthetischen Kollagenanaloga GPO und GAP einer Bindung von KGF an dieselben immobilisierten Kollagenanaloga	28
Abbildung 12: Inhibitorstärken löslicher Kollagene/Analoga der Bindung von KGF auf verschiedene immobilisierte Liganden (Daten aus Kapitel 26).....	30
Abbildung 13: Heparin hemmt die Interaktion von 125I-KGF mit den Kollagenen I, IV und VI, die Bindung von KGF an Kollagene und -fragmente ist abhängig von der Salzkonzentration.....	31
Abbildung 14: Die Bindung von KGF an immobilisiertes Kollagen folgt einer Sättigungskinetik.	32
Abbildung 15: Kollagen-gebundenes KGF stimuliert das Wachstum von HaCaT-Zellen...	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kollagenzusammensetzung der Leber.....	4
Tabelle 2: Struktur synthetischer Kollagenanaloga (Kollagenmimetika).	12
Tabelle 3: Interaktion von Wachstumsfaktoren mit extrazellulärer Matrix.....	34

Literaturverzeichnis

1. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372.
2. Onori P, Morini S, Franchitto A, et al. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol* 2000;33:555-563.
3. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
4. Friedman SL. Liver fibrosis: from mechanisms to treatment. *Gastroenterol Clin Biol* 2007;31:812-814.
5. Klinke R, Silbernagel S: Wundheilung. In: Thieme, ed. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003.
6. Schmidt RF, Lang F, Thews A: Wundheilung. In: Springer J, ed. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Berlin: Springer, 2000.
7. Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor: its potential roles in wound healing, atherosclerosis, neoplasia, and growth and development. *Ciba Found Symp* 1985;116:98-112.
8. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
9. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-544.
10. Somasundaram R, Schuppan D. Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem* 1996;271:26884-26891.
11. Mooradian DL, Lucas RC, Weatherbee JA, et al. Transforming growth factor-beta 1 binds to immobilized fibronectin. *J Cell Biochem* 1989;41:189-200.
12. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *Faseb J* 1997;11:51-59.
13. Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:153-165.
14. Ristow HJ, Messmer TO. Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. *J Cell Physiol* 1988;137:277-284.
15. Varani J, Nickoloff BJ, Riser BL, et al. Thrombospondin-induced adhesion of human keratinocytes. *J Clin Invest* 1988;81:1537-1544.
16. Nickoloff BJ, Mitra RS, Riser BL, et al. Modulation of keratinocyte motility. Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors. *Am J Pathol* 1988;132:543-551.
17. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326.
18. Montesano R, Pepper MS, Orci L. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 1993;105 (Pt 4):1013-1024.
19. Gillis P, Savla U, Volpert OV, et al. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci* 1999;112:2049-2057.
20. Werner S, Peters KG, Longaker MT, et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6896-6900.
21. Werner S, Smola H, Liao X, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 1994;266:819-822.
22. Guo L, Degenstein L, Fuchs E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 1996;10:165-175.

23. Lu W, Luo Y, Kan M, et al. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate [published erratum appears in J Biol Chem 1999 Sep 24;274(39):28058]. J Biol Chem 1999;274:12827-12834.
24. Schuppan D, Riecken EO. Molecules of the extracellular matrix: potential role of collagens and glycoproteins in intestinal adaptation. Digestion 1990;46 Suppl 2:2-11.
25. Schuppan D, Ruhl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. Braz J Med Biol Res 1994;27:2125-2141.
26. Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. Cellular sources of extracellular matrix proteins in normal and fibrotic liver. Studies of gene expression by in situ hybridization. J Hepatol 1995;22:71-76.
27. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. J Cell Mol Med 2007;11:1031-1051.
28. Ruehl M, Erben U, Schuppan D, et al. The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. J Biol Chem 2005;280:38537-38543.
29. Stryer L: Tyrosinkinaserzeptoren. In: Spektrum, ed. Biochemie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
30. Macri L, Silverstein D, Clark RA. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2007;59:1366-1381.
31. Kanematsu A, Marui A, Yamamoto S, et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. J Control Release 2004;99:281-292.
32. Brown KJ, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4 mask heparan sulfate proteoglycans recognized by acidic and basic fibroblast growth factor. Biochemistry 1994;33:13918-13927.
33. Goerges AL, Nugent MA. pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. J Biol Chem 2004;279:2307-2315.
34. Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, et al. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. Gastroenterology 1998;114:139-152.
35. Rahman S, Patel Y, Murray J, et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. BMC Cell Biol 2005;6:8.
36. Matsuoka H, Sisson TH, Nishiuma T, et al. Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;35:705-713.
37. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. Dev Biol 1991;143:303-308.
38. Schonherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. Dev Immunol 2000;7:89-101.
39. Raines EW, Ross R. Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences. J Cell Biol 1992;116:533-543.
40. Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. J Cell Biol 1994;127:1783-1787.
41. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. J Biol Chem 1996;271:3615-3618.
42. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. Embo J 1992;11:4825-4833.
43. Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, et al. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. J Cell Biol 1996;133:709-718.

44. Flaumenhaft R, Rifkin DB. The extracellular regulation of growth factor action. *Mol Biol Cell* 1992;3:1057-1065.
45. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 1998;75:87-134.
46. Rubin JS, Osada H, Finch PW, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:802-806.
47. Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, et al. Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7537-7541.
48. Walicke P, Cowan WM, Ueno N, et al. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3012-3016.
49. Finch PW, Cheng AL. Analysis of the cellular basis of keratinocyte growth factor overexpression in inflammatory bowel disease. *Gut* 1999;45:848-855.
50. Brauchle M, Angermeyer K, Hubner G, et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 1994;9:3199-3204.
51. Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, et al. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem* 1994;269:10753-10757.
52. Tang A, Gilchrist BA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1996;11:41-50.
53. Weng J, Mohan RR, Li Q, et al. IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea* 1997;16:465-471.
54. Brauchle M, Madlener M, Wagner AD, et al. Keratinocyte growth factor is highly overexpressed in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1996;149:521-529.
55. Hsu YR, Nybo R, Sullivan JK, et al. Heparin is essential for a single keratinocyte growth factor molecule to bind and form a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. *Biochemistry* 1999;38:2523-2534.
56. Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, et al. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:246-250.
57. Mutschler E: Arzneimittelwirkung. In: Mutschler, ed. *Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt. Basiswissen Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin: Wissenschaftliche Verlagsges., 2005.
58. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15292-15297.
59. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993;60:1-41.
60. Wen J, Hsu E, Kenney WC, et al. Characterization of keratinocyte growth factor binding to heparin and dextran sulfate. *Arch Biochem Biophys* 1996;332:41-46.
61. Berman B, Ostrovsky O, Shlissel M, et al. Similarities and differences between the effects of heparin and glypican-1 on the bioactivity of acidic fibroblast growth factor and the keratinocyte growth factor. *J Biol Chem* 1999;274:36132-36138.
62. Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, et al. Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int* 1995;19:399-411.
63. Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, et al. Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction. *Exs* 1995;74:191-214.
64. Mason CM, Guery BP, Summer WR, et al. Keratinocyte growth factor attenuates lung leak induced by alpha-naphthylthiourea in rats. *Crit Care Med* 1996;24:925-931.

65. Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, et al. Characterization of keratinocyte growth factor and receptor expression in human pancreatic cancer. *Am J Pathol* 1998;153:213-222.
66. Yi ES, Yin S, Harclerode DL, et al. Keratinocyte growth factor induces pancreatic ductal epithelial proliferation. *Am J Pathol* 1994;145:80-85.
67. Krakowski ML, Kritzik MR, Jones EM, et al. Pancreatic expression of keratinocyte growth factor leads to differentiation of islet hepatocytes and proliferation of duct cells. *Am J Pathol* 1999;154:683-691.
68. Watanabe M, Ishiwata T, Nishigai K, et al. Overexpression of keratinocyte growth factor in cancer cells and enterochromaffin cells in human colorectal cancer. *Pathol Int* 2000;50:363-372.
69. Itoh T, Suzuki M, Mitsui Y. Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary culture of rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:1011-1015.
70. Housley RM, Morris CF, Boyle W, et al. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 1994;94:1764-1777.
71. Otte JM, Schwenger M, Brunke G, et al. Differential regulated expression of keratinocyte growth factor and its receptor in experimental and human liver fibrosis. *Regul Pept* 2007;144:82-90.
72. Ruehl M, Somasundaram R, Schoenfelder I, et al. The epithelial mitogen keratinocyte growth factor binds to collagens via the consensus sequence glycine-proline-hydroxyproline. *J Biol Chem* 2002;277:26872-26878.
73. Somasundaram R, Ruehl M, Tiling N, et al. Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. *J Biol Chem* 2000;275:38170-38175.
74. Somasundaram R, Ruehl M, Schaefer B, et al. Interstitial collagens I, III, and VI sequester and modulate the multifunctional cytokine oncostatin M. *J Biol Chem* 2002;277:3242-3246.
75. Rossi A, Zuccarello LV, Zanaboni G, et al. Type I collagen CNBr peptides: species and behavior in solution. *Biochemistry* 1996;35:6048-6057.
76. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, et al. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res* 1999;41:450-457.
77. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, et al. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem* 2000;275:35-40.
78. Bolton AE, Hunter WM. A new method for labelling protein hormones with radioiodine for use in the radioimmunoassay. *J Endocrinol* 1972;55:xxx-xxxi.
79. Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem J* 1973;133:529-539.
80. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203-209.
81. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107-1112.
82. Upton Z, Cuttle L, Noble A, et al. Vitronectin: Growth Factor Complexes Hold Potential as a Wound Therapy Approach. *J Invest Dermatol* 2008.
83. Clark RA. Synergistic signaling from extracellular matrix-growth factor complexes. *J Invest Dermatol* 2008;128:1354-1355.
84. Somasundaram R, Ruehl M, Schaefer B, et al. Interstitial collagens I, III, and VI sequester and modulate the multifunctional cytokine oncostatin M. *J Biol Chem* 2002;277:3242-3246.
85. Ricard-Blum S, Dublet B, Van der Rest M: Collagen VI: A beaded filament-forming collagen. In: Sheterline P, ed. *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX*. Oxford: Oxford University Press, 2000; 4-24.

86. Kim PJ, Sakaguchi K, Sakamoto H, et al. Colocalization of heparin and receptor binding sites on keratinocyte growth factor. *Biochemistry* 1998;37:8853-8862.
87. Rossi A, Zanaboni G, Cetta G, et al. Stability of type I collagen CNBr peptide trimers. *J Mol Biol* 1997;269:488-493.
88. Fietzek PP, Kuhn K. The primary structure of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res* 1976;7:1-60.
89. Freise C, Erben U, Muche M, et al. The alpha 2 chain of collagen type VI sequesters latent proforms of matrix-metalloproteinases and modulates their activation and activity. *Matrix Biol* 2009;28:480-489.
90. Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH, et al. Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *J Biol Chem* 2008;283:20170-20180.
91. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:115-165.
92. Faham S, Linhardt RJ, Rees DC. Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:578-586.
93. Jang JH, Wang F, Kan M. Heparan sulfate is required for interaction and activation of the epithelial cell fibroblast growth factor receptor-2IIIb with stromal-derived fibroblast growth factor-7. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33:819-824.
94. Zang XP, Nguyen TN, Pento JT. Specific and non-specific KGF inhibition of KGF-induced breast cancer cell motility. *Anticancer Res* 2002;22:2539-2545.
95. Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, et al. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* 2002;277:42815-42820.
96. Lehmann HW, Bodo M, Frohn C, et al. Lysyl hydroxylation in collagens from hyperplastic callus and embryonic bones. *Biochem J* 1992;282 (Pt 2):313-318.
97. Yamaguchi K, Tamaki H, Fukui S. Detection of oligosaccharide ligands for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7), RANTES and heparin cofactor II by neoglycolipid microarrays of glycosaminoglycan-derived oligosaccharide fragments. *Glycoconj J* 2006;23:513-523.
98. Bottaro DP, Fortney E, Rubin JS, et al. A keratinocyte growth factor receptor-derived peptide antagonist identifies part of the ligand binding site. *J Biol Chem* 1993;268:9180-9183.
99. Finch PW, Pricolo V, Wu A, et al. Increased expression of keratinocyte growth factor messenger RNA associated with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:441-451.
100. Bajaj-Elliott M, Breese E, Poulosom R, et al. Keratinocyte growth factor in inflammatory bowel disease. Increased mRNA transcripts in ulcerative colitis compared with Crohn's disease in biopsies and isolated mucosal myofibroblasts. *Am J Pathol* 1997;151:1469-1476.
101. Atkinson JC, Ruhl M, Becker J, et al. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1996;228:283-291.
102. Steiling H, Muhlbauer M, Bataille F, et al. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 2004;165:1233-1241.
103. Rotolo S, Ceccarelli S, Romano F, et al. Silencing of keratinocyte growth factor receptor restores 5-fluorouracil and tamoxifen efficacy on responsive cancer cells. *PLoS ONE* 2008;3:e2528.

36 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Rühl und Prof. Dr. Rajan Somasunderam, die maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Vielen Dank an Monika Schmidt und Renate Ackermann für ihre unendliche Geduld.

Dankeschön an Hilmar, Noah, Jakob, Simon und Doris, ihr habt mich arbeiten lassen und mich motiviert.

Die Veröffentlichung des Lebenslaufes ist in der elektronischen Version der Dissertation aus Datenschutzgründen nicht gestattet.

Publikationsliste

1. Ruehl, M., Somasundaram, R., Schoenfelder, I., et al., Preferential binding of connective tissue growth factor to liver collagens type I, III and VI. *Hepatology*, 1999; 30: 493A.
2. Ruehl, M., Schoenfelder, I., Farndale, R., et al., Keratinocyte growth factor binds to collagens of the gastrointestinal tract: identification of the collagen binding structure. *Gastroenterology*. 2001; 120(S1):A694.
3. Ruehl, M., Somasundaram, R., Schoenfelder, I., et al., The epithelial mitogen keratinocyte growth factor binds to collagens via the consensus sequence glycine-proline-hydroxyproline. *J Biol Chem*, 2002; 277(30): 26872-8.

Erklärung

Ich, Ines Schönfelder erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Identifizierung der hepatischen extrazellulären Bindungsstruktur von biologisch aktivem Keratinozytenwachstumsfaktor‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ines Schönfelder

Berlin, den 10. März 2011