

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

DISSERTATION

„Kollagen XIV und CD44 – Einfluss auf Proliferation und
Differenzierung bei mesenchymalen und hämatopoetischen
Zellen“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anita Zeller

aus Nürnberg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Somasundaram
 2. Prof. Dr. med. R. Duchmann
 3. Prof. Dr. med. A. Pezzutto

Datum der Promotion: 04.02.2011

Für Bob

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die extrazelluläre Matrix und Kollagene	7
1.2	Kollagen-Typ XIV (KXIV) und CD44	8
1.3	Proliferation und Differenzierung von Adipozyten und myeloischen Zellen	11
1.3.1	Begriffe	11
1.3.2	Adipozyten	12
1.3.3	Myeloische Zellen	14
1.4	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Geräte	17
2.2	Materialien	18
2.3	Medien, Lösungen und Reagenzien	19
2.4	Bioaktive Proteine	20
2.4.1	Antikörper	20
2.4.2	Kollagene und aus der extrazellulären Matrix abgeleitete Moleküle	21
2.4.3	Umpuffern von Antikörperlösungen durch Gelfiltration	22
2.5	Zelllinien	23
2.6	Zellkultur	24
2.6.1	Medien	24
2.6.2	Standardzellkultur	25
2.6.3	Direkte Bestimmung der Zellzahl und Vitalität im Hämatozytometer	26
2.6.4	Kryopräservierung von Zellen	26
2.6.5	Entzug von Wachstumsfaktoren	27
2.6.6	Zellzyklussynchronisation durch Kälte	27
2.6.7	Beschichtung von Zellkulturplatten	28
2.6.8	Indirekte Bestimmung der Zellzahl über intrazelluläre Esterasen	29

2.7	Zellproliferation durch Einbau von [³ H]-Thymidin	29
2.8	Oil-Red-O-Färbung von Lipidtropfen	31
2.9	Nachweis der Expression des Glukosetransporters GLUT4 im Western-blot	32
2.9.1	Kultivierung und Fraktionierung von 3T3-L1-Zellen	32
2.9.2	Gelelektrophorese	32
2.9.3	Western-blot und Immundetektion	33
2.10	Durchflusszytometrie (FACS)	34
2.11	Statistik	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Biologische Effekte von KXIV und seinem aminoterminalen Fragment KXIV ₂₉₋₁₅₄ auf 3T3-L1-Zellen	37
3.1.1	Serumabhängigkeit der KXIV-Wirkung bei der Proliferation	37
3.1.2	Proliferation mit gelöstem und plastikgebundenem KXIV ₂₉₋₁₅₄	39
3.1.3	Einfluss auf die Zellzahl	40
3.1.4	Nachweis der Differenzierung über die Fetttröpfchenbildung	41
3.1.5	Nachweis der Differenzierung über die Expression von GLUT4	43
3.2	Proliferation von U937 mit KXIV, KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper	44
3.2.1	KXIV und Modifikation der Kulturbedingungen	44
3.2.2	Gelöstes und plastikgebundenes Fragment KXIV ₂₉₋₁₅₄	46
3.2.3	CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8	47
3.2.4	Kombination von KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8	48
3.3	Zellzahl von U937 mit KXIV, KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8	50
3.3.1	KXIV und KXIV ₂₉₋₁₅₄	50
3.3.2	Zellzahl in Gegenwart von CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8	51

3.3.3	Kombination von KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8.....	52
3.4	Expression von Oberflächenantigenen durch U937-Zellen	53
3.4.1	Aus der Standardkultur	53
3.4.2	Wirkung von Phorbolestern.....	55
3.4.3	Wirkung von KXIV und KXIV ₂₉₋₁₅₄	57
3.4.4	Wirkung von CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8.	58
3.4.5	Vergleich: CD44-spezifische monoklonale Antikörper der Klone A3D8 und IM7.8.1	60
3.4.6	Vergleich: KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8	62
3.4.7	Kombination: KXIV ₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8	63
4	Diskussion	65
5	Zusammenfassung	74
6	Abkürzungsverzeichnis.....	76
7	Literaturverzeichnis.....	78

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix und Kollagene

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexes Netzwerk von Struktur molekülen, in denen die Gewebezellen eingebettet liegen. Man unterscheidet bei den einzelnen molekularen Bausteinen vorwiegend zwischen Kollagenen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (GAG). Diese werden in den verschiedenen Geweben unterschiedlich zusammengesetzt und bilden so eine gewebsspezifische Histoarchitektur (Aumailley and Gayraud 1998; Schuppan, Rühl et al. 2001). Die Produktionsstätten der extrazellulären Moleküle sind die Gewebezellen. Ihre Synthesemuster werden nicht nur von der Gewebeat, sondern auch von Außenfaktoren wie beispielsweise mechanischem Stress bestimmt. Der Abbau der Strukturproteine wird ebenfalls durch die eingebetteten Zellen gesteuert, indem sie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bilden und ausschütten, welche die einzelnen Bausteine der EZM proteolytisch spalten (Chiquet 1999; Mott and Werb 2004).

Abgesehen von der rein mechanischen Schutz- und Gerüstfunktion übernimmt die EZM auch regulatorische Aufgaben. So steuert sie Prozesse wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der darin liegenden Zellen, indem sie einerseits als Speicherort für Zytokine und Wachstumsfaktoren fungiert und andererseits über transmembranäre Adhäsions- und Signalrezeptoren physikalisch die EZM mit dem Zytoskelett verbindet und intrazelluläre Signalketten in Gang setzt. Dabei spielt insbesondere auch das Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und MMP-vermittelter proteolytischer Fragmentierung eine wichtige Rolle (Aumailley and Gayraud 1998; Mott and Werb 2004).

Die regulatorischen Interaktionen von Zelle und EZM bilden somit ein komplexes, aber auch flexibles System. Wird das Gleichgewicht jedoch gestört, treten pathologische Veränderungen auf, wie bei Organfibrosen, Autoimmunerkrankungen, Tumorwachstum und Metastasierung beobachtet werden kann (Trojanowska 2000; Schuppan, Rühl et al. 2001).

Kollagene sind als wesentliche Strukturbestandteile der EZM von besonderem Interesse. Inzwischen wurden mehr als 20 verschiedene Kollagene charakterisiert. Diese werden anhand ihrer Struktur in zwei molekulare Gruppen, gegebenenfalls in Untergruppen eingeteilt (Aumailley and Gayraud 1998; Schuppan, Rühl et al. 2001). Die Tabelle 1 veranschaulicht die gebräuchliche Zuordnung der Kollagene.

Tabelle 1: **Einteilung der Kollagene**

<i>Gruppe</i>	<i>Untergruppe</i>	<i>Vertreter</i>
Fibrillenbildend		I, II, III, V, XI
Keine Fibrillen bildend	Netzwerk bildend	IV, VIII, X
	Perlenartige Mikrofilamente	VI
	An verankernden Filamenten	VII
	Transmembranär	XVII
	Multiplexine	XIII, XV, XVIII
	Fibrillen assoziiert (FACIT)	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX

Fibrillen bildende Kollagene, wie beispielsweise Kollagen-Typ I (KI), haben eine tripelhelikale Struktur, bestehend aus drei α -Ketten mit der sich wiederholenden Abfolge des Peptids Glycin-X-Y. Dabei kann X und Y prinzipiell durch jede Aminosäure besetzt werden, häufig handelt es sich jedoch um die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin. Reife Fibrillen lagern sich zusammen und werden durch kovalente Quervernetzung stabilisiert. In dieser Arbeit dient das annähernd ubiquitär exprimierte KI als Kontrollkollagen (Kadler, Holmes et al. 1996).

Die Gemeinsamkeit der sehr heterogenen, nicht Fibrillen bildenden Kollagene besteht darin, dass sie neben Kollagen-Domänen (COL) auch eine bis mehrere Domänen ohne Kollagenstruktur (NC) besitzen. Dabei kann diese NC den Hauptanteil ihrer molekularen Masse bilden. Die Einteilung in weitere Untergruppen ist aufgrund der Heterogenität nötig (Aumailley and Gayraud 1998).

1.2 Kollagen-Typ XIV (KXIV) und CD44

Wegen seiner Assoziation mit Fibrillen sowie dem Vorhandensein von COL- und NC-Strukturen wurde das früher nach seinen elektronenmikroskopischen Eigenschaften Undulin genannte Kollagen-Typ XIV (KXIV) der FACIT-Gruppe zugeordnet (Schuppan, Cantaluppi et al. 1990; Dublet and van der Rest 1991; Trueb and Trueb 1992).

Analysen der Primärstruktur von KXIV aus Huhn und Mensch brachten sicheren Aufschluss über den genauen Aufbau des Moleküls (Walchli, Trueb et al. 1993; Bauer, Dieterich et al. 1997). Das KXIV ist ein Homotrimer, bestehend aus drei α 1-Ketten mit Molekulargewichten von jeweils 210-220 kDa. Diese sind über kovalente Disulfid-Brücken verbunden. Die Anordnung der Domänen auf einer α 1-Kette wird schematisch in der Abbildung 1 gezeigt.

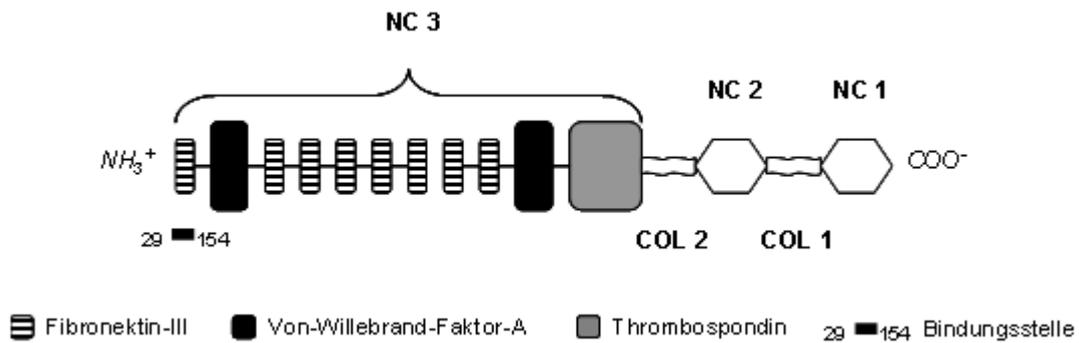


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Anordnung struktureller und funktioneller Domänen einer α 1-Kette von KXIV.** Ein rekombinantes Protein, das die Aminosäurereste 29-154 einer verlängerten N-terminalen Fibronektin-Typ-III-Domäne enthält, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht und ist hier dargestellt.

Jede Kette besteht aus zwei C-terminalen COL, die insgesamt etwa 14% der Kette ausmachen, und aus drei NC. Der längste globuläre Anteil NC3 liegt N-terminal und enthält eine Thrombospondin, zwei von-Willebrand-Faktor-A und 7,25 Fibronektin-Typ-III-Domänen (Ricard-Blum, Dublet et al. 2000).

Auch bei der Maus wurde mittlerweile die komplette KXIV-Primärstruktur entschlüsselt. Auf Aminosäureebene gibt es 88% Übereinstimmung mit der humanen Sequenz. Die Struktur der auf der α 1-Kette enthaltenen Domänen ist analog (Gerecke, Meng et al. 2003).

Der Genort für KXIV liegt beim Mensch auf Chromosom 8q23 (Schnittger, Herbst et al. 1995). Das KXIV wird vor allem von Fibroblasten, aber auch von Fettzellen und Endothelzellen synthetisiert. Während der Embryonalentwicklung ist KXIV erst in einem späten Stadium nachweisbar. Mit fortschreitender Differenzierung ersetzt KXIV das bis dahin gebildete Kollagen XII, ein FACIT-Kollagen mit starker Homologie zu KXIV. Bei Adulten wird KXIV ebenfalls insbesondere in ausdifferenziertem Gewebe exprimiert. Dabei findet man es extrazellulär assoziiert mit KI in dichten, kollagenreichen Geweben. In proliferierendem Gewebe, Tumorstroma oder Regionen mit mechanischem Stress fehlt KXIV hingegen fast vollständig (Walchli, Koch et al. 1994; Ricard-Blum, Dublet et al. 2000).

Abgebaut wird KXIV über MMPs und Kollagenasen. Insbesondere die Gelatinasen MMP-9 und MMP-2, Enzyme mit Molekulargewichten von 72 bzw. 92 kDa sowie die Kollagenase 3 (MMP-13) spielen dabei eine wichtige Rolle (Ricard-Blum, Dublet et al. 2000).

Die globuläre NC3-Sequenz gilt als Domäne der Zelladhäsion und Matrixinteraktion. In der N-terminalen Fibronektin-Typ-III-Region, zwischen den Aminosäureresten 29 und 115,

binden neben Heparin das Proteoglykan Decorin sowie eine Chondroitin/Dermatansulfat-Variante von CD44 (Ehnis, Dieterich et al. 1996; Ehnis, Dieterich et al. 1997; Ehnis, Dieterich et al. 1998). Eine weitere Heparin-Bindungsstelle, deren Funktionsweise bisher noch ungeklärt ist, wurde in der NC1-Sequenz lokalisiert (Giry-Lozingue, Aubert-Foucher et al. 1998).

Ein möglicher zellulärer Rezeptor von KXIV ist eine Chondroitin/Dermatansulfat-Variante von CD44 (Ehnis, Dieterich et al. 1996). Der Begriff CD44 fasst eine Reihe transmembranäre Glykoproteine bestehend aus einer einzigen Kette mit extrazellulärem N-terminalen Anteil zusammen (Abbildung 2). Sie werden ubiquitär auf der Zelloberfläche exprimiert und sind sowohl für Zell-Zell- als auch für Zell-Matrix-Kontakte verantwortlich (Ponta, Sherman et al. 2003).

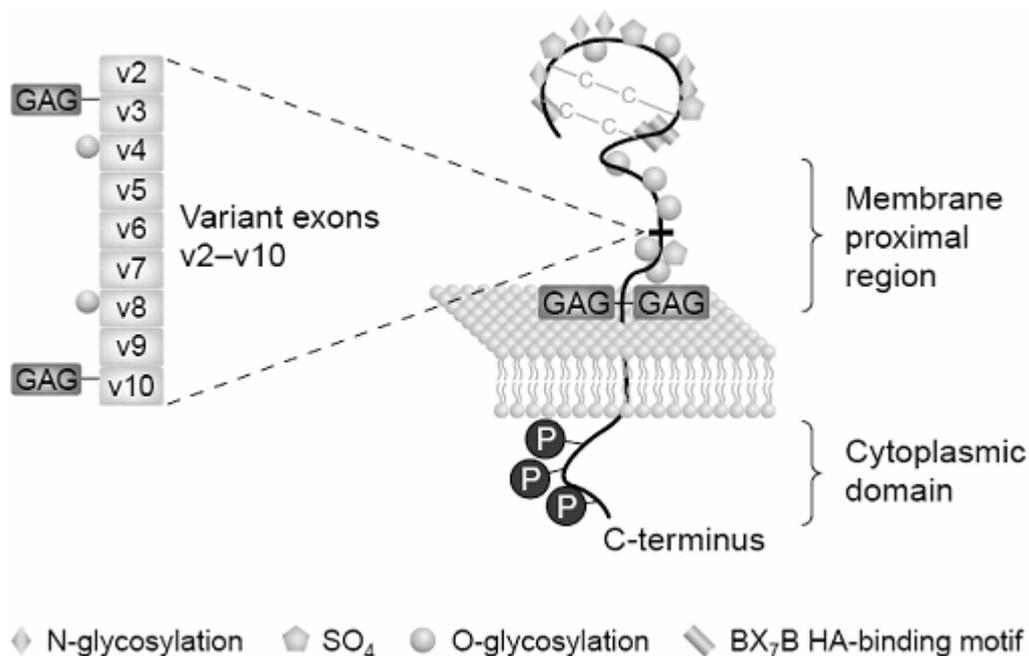


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Proteinstruktur des transmembranären CD44-Rezeptor**. Darstellung aus Pure and Cuff (2001). P und GAG bezeichnen potentielle Phosphorylierungsstellen bzw. Bindungsstellen für GAG. Die Sekundärstruktur der extrazellulären Domäne wird durch zwei Disulfidbrücken (-C-C-) aufrechterhalten. Die Sequenz BX₇B stellt das Bindungsmotiv für den Liganden Hyaluronsäure (HA) dar.

Das codierende Gen für CD44 wurde beim Menschen auf Chromosom 11p13 lokalisiert (Goodfellow, Banting et al. 1982). Die entstehenden Genprodukte sind strukturell und funktionell sehr heterogen, was sich auch schon durch einen Molekulargewichtsbereich von 80 bis 200 kDa ausdrückt. Diese Heterogenität ist vorwiegend auf zwei Mechanismen zurückzuführen. Einerseits wird durch posttranslationale Modifizierung die extrazelluläre

Domäne verändert. Dabei spielen insbesondere Glykosylierungs- und Sulfatisierungsprozesse sowie die Bindung von GAG wie Heparan-, Chondroitin- und Dermatan-sulfat eine wichtige Rolle. Andererseits kann die proximale Membranregion durch alternatives Spleißen modifiziert werden. Die Standardvariante CD44s wird durch die Exons 1-5 und 16-20 gebildet. Die dazwischen liegenden Exons 6-15, auch als Varianten v1-10 bezeichnet, liefern die Templates für die als CD44v bezeichneten alternativen Produkte. Primärer Bindungspartner aller CD44-Isoformen ist Hyaluronsäure (HA), ein polymeres GAG der EZM. Durch die dargestellten Modifizierungen und Variantenbildung wird zellspezifisch das Spektrum möglicher Bindungspartner auf weitere Bestandteile der EZM wie Kollagene oder Fibronectin erweitert (Pure and Cuff 2001; Ponta, Sherman et al. 2003).

1.3 Proliferation und Differenzierung von Adipozyten und myeloischen Zellen

1.3.1 Begriffe

Die Begriffe Proliferation und Differenzierung können mit Hilfe des Zellzyklus näher definiert werden (Abbildung 3).

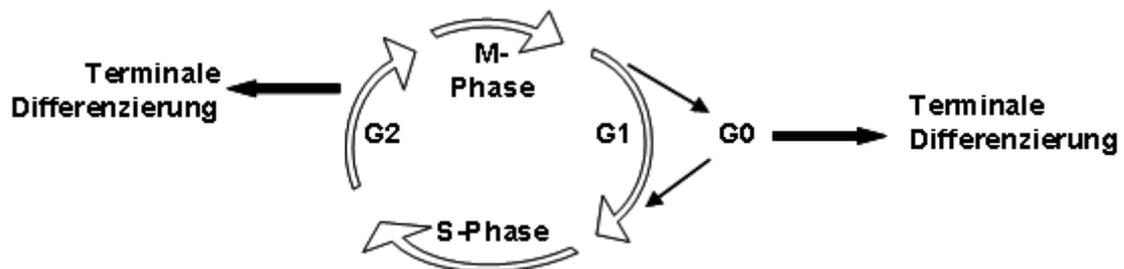


Abbildung 3: **Proliferation und Differenzierung.** *M-Phase*: Zellteilung; *G1, G2*: Proteinbiosynthese, Vermehrung der Zellmasse, Regulation, Reparatur; *S-Phase*: Duplikation des genetischen Materials; *G0*: Ruhephase. Proliferierende Zellen durchschreiten den Zellzyklus (weiße Pfeile). Verlassen Zellen diesen Zyklus, ist es ihnen möglich zu hochspezialisierten Zellen zu differenzieren (schwarze Pfeile). Modifiziert nach Coffman and Studzinski (1999).

Zellen, die diesen Zyklus aus Duplikation des genetischen Materials durch DNS-Neusynthese (*S-Phase*), Vermehrung der Zellmasse (Phasen *G1, G2*) und der eigentlichen Mitose, die schließlich durch die Trennung der Schwesterchromatiden zur Entstehung zweier genetisch identischer Tochterzellen führt (*M-Phase*), immer wieder durchlaufen, werden als proliferierende Zellen bezeichnet (Coffman and Studzinski 1999;

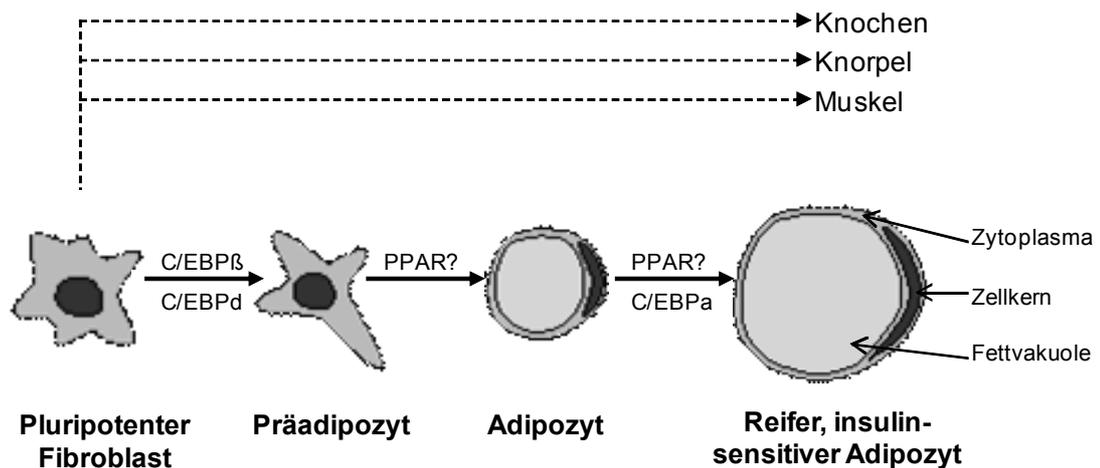
Nurse 2000). In dieser Arbeit wird der Begriff Proliferation als Maß der DNS-Neusynthese einer Zellpopulation enger gefasst.

Zellen ist es möglich diesen Zyklus zu verlassen. Diese Phase des Zellzyklus-Arrestes kann unspezifisch und reversibel sein (G0), oder in terminale Differenzierung der Zellen münden. Differenzierung beschreibt den Entwicklungsprozess omni- oder pluripotenter Ausgangszellen zu strukturell und funktionell hoch spezialisierten, nicht mehr teilungsfähigen Zellen. Dabei werden verschiedene Zwischenstadien durchlaufen, in denen die Zellen zunächst weiterhin proliferieren und gleichzeitig durch Änderung der replikativen zellularen Aktivität und der Transkriptionsvorgänge zu nicht proliferativen spezialisierten Zellen werden. Sie erreichen schließlich das Stadium der terminalen Differenzierung. In diesem Zustand synthetisieren z.B. ausdifferenzierte Gewebezellen gewebsspezifische Proteine, deren Nachweis als Differenzierungsmarker betrachtet werden kann (Coffman and Studzinski 1999; Blagosklonny 2003).

1.3.2 Adipozyten

Adipozyten des weißen Fettgewebes spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts. Sie speichern Energie in Form von Triglyceriden und setzen sie auf hormonelle Reize hin in Form von Fettsäuren wieder frei. Darüber hinaus fungieren Adipozyten auch als endokrine Zellen. Sie sezernieren Substanzen wie Leptin, Adiponektin, Resistin, Apolipoproteine sowie proinflammatorische Zytokine wie den Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin-6. Dadurch regulieren sie Prozesse wie Nahrungsaufnahme, Appetit, Glukosestoffwechsel, Insulinsensitivität und Entzündung. Durch pathologische Veränderungen des Zellstoffwechsels und den damit einhergehenden Verschiebungen im Sekretionsverhalten kann somit die Entstehung von Dyslipoproteinämien, Insulinresistenz, Diabetes, Arteriosklerose und chronischer Entzündung gefördert werden (Gregoire 2001; Yu and Ginsberg 2005).

Aus dem Mesoderm gehen pluripotente Fibroblasten hervor. Sie bilden die gewebständigen Stammzellen des mesenchymalen Gewebes und haben die Fähigkeit sich in Muskeln-, Sehnen-, Knochen- oder auch Fettzellen zu differenzieren. Die Ausreifung der fettspeichernden Zellen (Abbildung 4) erfolgt über die Zwischenstufe der unipotenten Präadipozyten, die sich durch ihre Determinierung nur in reife Adipozyten umwandeln können (Ntambi and Young-Cheul 2000).



Fettropfen:	--	++	+++
GLUT4:	--	+	+++
Insulinsensitivität:	--	(+)	+++

Abbildung 4: **Differenzierung von Adipozyten.** Die Abkürzungen stehen für folgende Transkriptionsfaktoren: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) mit den Subtypen α , β und δ ; peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Ebenfalls dargestellt ist der Zusammenhang zwischen Entwicklungsstadium und phänotypischen Eigenschaften der Zellen. Modifiziert nach Lowell (1999).

Während der Adipogenese wird eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren aktiviert, die letztlich zur terminalen Differenzierung und somit zur Adipozyten-spezifischen Genexpression führt. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α und peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) spielen dabei eine Schlüsselrolle (Lowell 1999). In der späten Phase der Differenzierung folgt eine Hochregulation des Glukosetransporters (GLUT) 4 sowie die sukzessive Einlagerung von Triglyceriden in Form von intrazellulären Fetttropfen. Beide Eigenschaften gelten als späte Marker einer abgeschlossenen Adipogenese hin zu einem Insulin-sensitiven Adipozyten (Furuyashiki, Nagayasu et al. 2004).

Die Zelllinie 3T3-L1 wird häufig als experimentelles Modell für die Adipogenese eingesetzt. Diese als unipotente Präadipozyten geltenden Zellen stammen ursprünglich aus embryonalem Mausgewebe. In Gegenwart einer Mischung aus Insulin, Dexamethason (DEX) und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) verlassen die Zellen den Zellzyklus und differenzieren zu reifen Adipozyten (Green and Meuth 1974; Ntambi and Young-Cheul 2000).

1.3.3 Myeloische Zellen

Monozyten entwickeln sich, wie die anderen Zelltypen des hämatopoetischen Systems, aus der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle. Abbildung 5 stellt die einzelnen Stufen des Differenzierungsprozess schematisch dar (Bellantuono 2004).

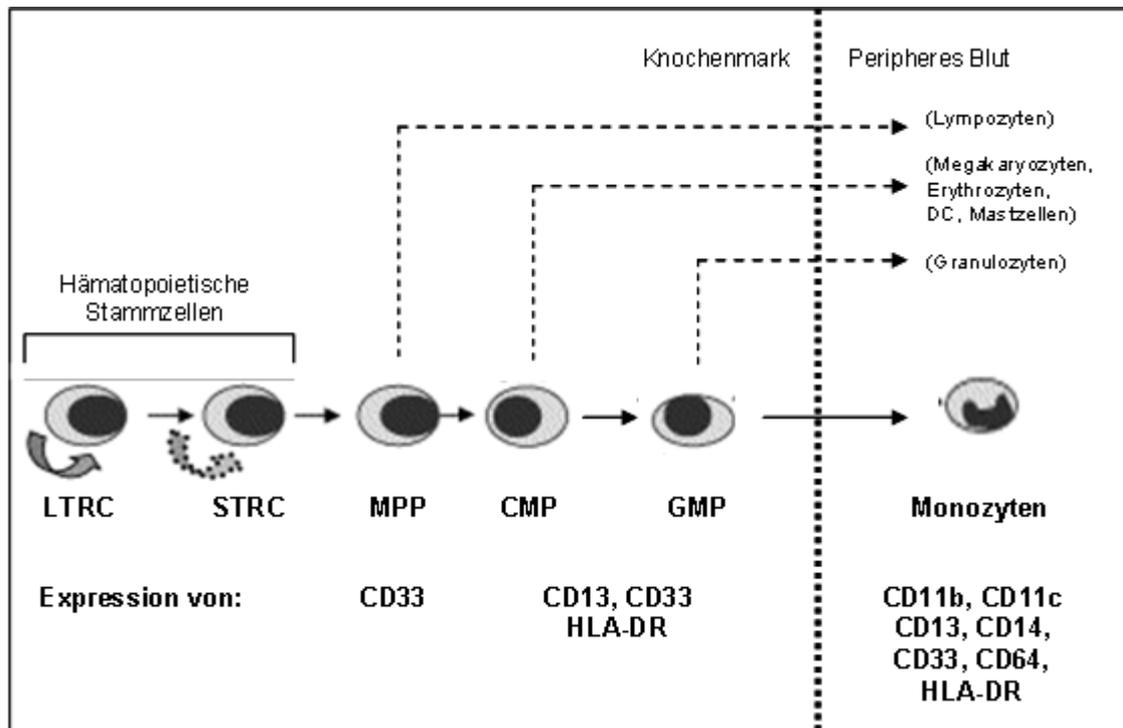


Abbildung 5: **Hämatopoetische Differenzierung myeloischer Zellen.** Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen stehen für die folgende Zelltypen: *Long* (LTRC)-, *Short-term repopulating cells* (STRC), multipotente (MPP), allgemeine myeloische (CMP) und Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen (GMP) sowie dendritische Zellen (DC). Die Fähigkeit zum *Self-renewal* (Blockpfeile) und die Expression ausgewählter Oberflächenantigene sind ebenfalls dargestellt. Modifiziert nach Bellantuono (2004).

Die Zellen dieses Stammzellkompartments unterscheidet man in solche, die zur Lang- oder Kurzzeitrepopulation des Knochenmarks in knochenmarksdefizienten Wirten in der Lage sind. Stammzellen teilen sich asymmetrisch. Eine der beiden Tochterzellen behält ihre Stammzeleigenschaften, ein Vorgang der als *Self-renewal* bezeichnet wird, während die andere sich zu einer spezialisierten Zelle ausdifferenziert. Über verschiedene Zwischenstufen linienspezifischer Progenitorzellen gehen letztlich alle differenzierten Zellen des peripheren Blutes hervor. Für myeloische Zellen, zu denen die Monozyten und Granulozyten gehören, verläuft dies im Knochenmark zunächst über multipotente Progenitorzellen, allgemeine Vorläufer für das myeloische Kompartiment hin zu spezifischen Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen (Bellantuono 2004). Vollständig

differenzierte Monozyten verlassen das Knochenmark und gehen in das periphere Blut über. Dort zirkulieren sie ein bis drei Tage. Nach der Extravasation ins Gewebe wandeln sich Monozyten in Gewebemakrophagen oder dendritische Zellen um. Gewebemakrophagen besitzen phagozytotische Aktivität und sind als gewebständige Effektorzellen an der lokalen Immunantwort beteiligt, wohingegen dendritische Zellen nach Aktivierung als Antigen-präsentierende Zelle zum regionalen Lymphknoten migrieren, um dort mit Lymphozyten zu interagieren (Imhof and Aurrand-Lions 2004).

Progenitorzellen und differenzierte Monozyten exprimieren unterschiedliche Oberflächenmoleküle. Diese linienspezifischen und den Differenzierungsgrad der Zellen charakterisierenden Antigene werden zur Immunphänotypisierung herangezogen und gelten als Indikatoren der Immunkompetenz der Zelle. Die Tabelle 2 fasst die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmoleküle und ausgewählte biologische Funktionen zusammen (Murdoch and Finn 2000; Lechmann, Berchtold et al. 2002; Reche and Reinherz 2003; PROW 2006).

Tabelle 2: **CD-Antigene myeloischer Zellen und ausgewählte Funktionen.** CD: *Cluster of Differentiation*, HLA: *Human Leukocyte Antigen*, CCR: Chemokinrezeptor der CC-Superfamilie.

<i>Funktion</i>	<i>Antigene</i>
Zelladhäsion, Chemotaxis, Extravasation	CCR3, CCR5, CCR7, CD11a/b/c, CD15, CD18, CD44s, CD54, CD58
T-Zellaktivierung und Regulation	CD1a, CD80, CD83, CD86, CD127, HLA-ABC, HLA-DR
Monozytenaktivierung (u.a. durch Viren, Endotoxine, Antikörper)	CD13, CD14, CD16, CD32, CD64, CD82

Die Zelllinie U937 wurde aus Zellen von malignem Pleuraexsudat eines Patienten gewonnen und gilt als Modell für maligne humane hämatopoetische Zellen der monozytären Zellreihe (Sundstrom and Nilsson 1976). Sie entsprechen insofern Progenitorzellen als ihre myeloische Differenzierung nicht abgeschlossen ist. U937-Zellen können aber morphologisch und funktionell z.B. unter dem Einfluss von Vitamin D, Retinoiden bzw. Phorbolestern zu Monozyten differenziert werden (Sellmayer, Obermeier et al. 1997; Huang and Failla 2000).

1.4 Fragestellung

Aufbauend auf Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von KXIV, einem strukturbildenden Bestandteil der EZM, auf die Proliferation und die Differenzierung humaner fibroblastärer und myeloischer Zellen untersucht. Als Modelle für unipotente Präadipozyten bzw. für myelomonozytäre Progenitorzellen werden die Zelllinien 3T3-L1 und U937 genutzt. Die Proliferation wird experimentell über den Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt. Für die Bewertung der Differenzierung werden bei den 3T3-L1-Zellen die Fetttropfenbildung und die Expression von GLUT4 herangezogen, bei den U937-Zellen die Expression spezifischer Oberflächenmarker.

In diesem System sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie wirkt das Gesamtmolekül KXIV auf die Proliferation und Differenzierung von 3T3-L1- und U937-Zellen?
2. Entsprechen die Effekte eines rekombinanten KXIV-Fragmentes, das die Adhäsionsdomäne enthält (KXIV₂₉₋₁₅₄) denen des KXIV-Gesamtmoleküls? Wirkt also das KXIV₂₉₋₁₅₄ als biologisch aktive Domäne?
3. Hängt die KXIV₂₉₋₁₅₄-Wirkung von der räumlichen Präsentation des Moleküls ab?
4. Im Hinblick auf die mögliche Funktion von CD44 als Rezeptor für KXIV: Wirken CD44-spezifische monoklonale Antikörper (mAb) in vergleichbarer Weise wie KXIV und das KXIV₂₉₋₁₅₄-Fragment?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

	<i>Hersteller</i>
Begasungsbrutschrank B5060, +37°C	Heraeus, Hanau, BRD
Biofuge pico	Heraeus
Blot-Tank TE 22	Hoefer, San Francisco, USA
Brutschrank, +80°C	Heraeus
Cell Harvester 1295-001	LKB Wallac, Turku, Finnland
Dampfsterilisator, Varioklav	H+P Labortechnik, München, BRD
Digitalkamera Camedia	Olympus, Hamburg, BRD
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lake, USA
Einfriercontainer/Dewar-Gefäße	Nalgene, Rochester, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, BRD
Filmentwickler X-Omat	Kodak, Rochester, USA
Fluorimeter Gemini	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Kühlschrank, +4°C	Bosch, Stuttgart, BRD
Kühlzentrifuge Minifuge RF	Heraeus
Laborschüttler TMP-2	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Mikrowelle, 175 W	Bosch
Mini-Protean-II-System	Bio-Rad, Hercules, USA
Phasenkontrastmikroskop Labovert FS	Wild Leitz, Wetzlar, BRD
Reinstwasser-Anlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Sterilwerkbank BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim, BRD
Stickstofflagertank (N ₂ -Lagertank)	Teclab, Königsstein, BRD
Szintillationszähler 1205-012	LKB Wallac
Temperierbares Wasserbad, Typ U3	Julabo, Seelbach, BRD
Thermostat mit Umwälzpumpe	LKB Bronza, Uppsala, Schweden
Tiefkühlschrank, -20°C	Bosch
Tiefkühlschrank, -80°C	Forma Scientific, Marjetta, USA
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, BRD
Zentrifuge GP	Beckman Instruments, Palo Alto, USA

2.2 Materialien

	<i>Hersteller</i>
Combitips für Multipette, steril	Eppendorf, Hamburg, BRD
Einmalskalpell	Feather, Köln, BRD
Einmalspritzen, steril (10 ml)	Becton Dickinson
Einwegpipetten, steril	Becton Dickinson
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel, BRD
Glasfaser-Filtermatte	LKB Wallac
Hamilton-Spritze (50 µl)	Hamilton, Reno, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Hyperkassette	Amersham Biosciences
Kryoröhrchen, steril (2,0 und 4,5 ml, Polypropylen)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Multipette	Eppendorf
Nitrozellulosemembran (Porendurchmesser 0,45 µm)	Bio-Rad
Objekträger mit Deckglas (21x26 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Pipettenspitzen, autoklaviert	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, BRD
Probenröhrchen für FACS (Rundboden, 5 ml, Polystyrol)	Becton Dickinson
Säule für die Gelfiltration (Sephadex-G25; NAP-10)	Amersham Biosciences
Spritzenvorsatzfilter (gemischte Zelluloseester, steril, Porengröße: 0,22 µm; Rotrand)	Schleicher & Schüll
Spritzenvorsatzfilter, steril (Polyvinylidenfluorid (PVDF), Porengröße: 0,22 µm)	Millipore
Szintillationswachs Typ 1205-441	LKB Wallac
Zellkulturflasche, steril (260 ml, 75 cm ²)	Nunc
Zellkulturflasche, steril (800 ml, 185 cm ²)	Nunc
Zellkulturplatte 6-Loch, steril (Polystyrol)	Nunc
Zellkulturplatte 24-Loch, steril (Polystyrol)	Becton Dickinson
Zellkulturplatte 24-Loch, steril (Polystyrol), mit Einsatz (Polyester-Membran, Porengröße 0,4 µm)	Corning, Corning, USA
Zellkulturplatte 96-Loch, steril (Flachboden, Polystyrol)	Becton Dickinson

	<i>Hersteller</i>
Zellschaber, steril, 32 cm	Nunc
Zellstofflagen, steril	Johnson & Johnson, New Brunswick, USA
Zentrifugenröhrchen, steril (50 ml, Polypropylen)	Becton Dickinson

2.3 Medien, Lösungen und Reagenzien

	<i>Hersteller</i>
[³ H]-Thymidin, sterile Lösung in PBS, 5 mCi/mol	Amersham Biosciences
4-Methylumbelliferylheptanoat (MUH)	Sigma, St. Louis, USA
Acrylamid (30%)/N,N'-Methylenbisacrylamid (1,37%)	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
all-trans-Retinolsäure (ATRA)	Sigma
Ascorbinsäure (Vitamin C)	Sigma
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, BRD
Detektionsreagenz ECL	Amersham Biosciences
Dexamethason (DEX)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Essigsäure (HAC)	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol, 70% (v/v), vergällt	Merck
Formaldehyd, 37% (v/v)	J.T. Baker
Fötales Rinderserum (FKS – A)	Biochrom, Berlin, BRD
Fötales Rinderserum (FKS – S)	Life Technologies, Groningen, Niederlande
Glycin	Merck
Größenmarker SDS-7B	Sigma
Grundmedium DMEM mit Glutamax-I	Life Technologies
Grundmedium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES	Life Technologies
Hämalaun-Lösung	Division Chroma, Münster, BRD
Insulin	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaninchenserum	Sigma
L-Glutamin, sterile Lösung, 200 mM	Biochrom
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven, BRD

	<i>Hersteller</i>
Methanol	J. T. Baker
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX)	Sigma
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat, sterile Lösung, 100 mM	Biochrom
Oil Red O	Sigma
Penicillin-/Streptomycin, sterile Lösung, 10 000 U/10 mg/ml	Biochrom
Phorbol-12-mystrat-13-acetat (PMA)	Sigma
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ (PBS), steril, pH 7,2	Biochrom
Propidiumjodid (PI)	ICN, Costa Mesa, USA
ProteoExtract	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Serum-Albumin vom Rind (BSA)	Dade Behring, Marburg, BRD
Stickstoff, flüssig	Messer Griesheim GmbH, Oberhausen, BRD
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris/Base	Sigma
Tris/HCl	Merck
Trypanblaulösung, 0,5% (w/v) in PBS	Biochrom
Trypsin/Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), sterile Lösung, 0,05%/0,02% (w/v)	Biochrom
Tween 20	Sigma

2.4 Bioaktive Proteine

2.4.1 Antikörper

Tabelle 3. **Verwendete monoklonale Antikörper (mAbs)**. Soweit nicht anders vermerkt, sind die mAbs aus der Maus isoliert und gegen humane Antigene gerichtet. FITC – Fluoreszeinisothiocyanat, PE – Phycoerythrin, HRP – Meerrettichperoxidase.

<i>Antigen</i>	<i>Markierung</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
CCR3	PE	61828.111	R&D Systems, Minneapolis, USA
CCR5	PE	CTC5	R&D Systems

<i>Antigen</i>	<i>Markierung</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
CCR7	ohne	6B3	MBL, Nagoya, Japan
CD11a	ohne	MHM 24	Dako, Roskilde, Dänemark
CD11b	PE	Bear 1	Beckman Coulter, Miami, USA
CD11c	ohne	IOM 11c	Beckman Coulter
CD127	PE	R34.34	Beckman Coulter
CD13	PE	SJ 1D1	Beckman Coulter
CD14	PE	RMO52	Beckman Coulter
CD15	ohne	ION 1	Amac, Westbrook, USA
CD16	ohne	3G8	Medarex, Princeton, USA
CD18	FITC	7E4	Beckman Coulter
CD1a	PE	BL6	Beckman Coulter
CD32	ohne	IV.3	Medarex
CD33	FITC oder PE	D3HL60-251	Beckman Coulter
CD44	FITC	DF1485	Dako
CD44	ohne	A3D8	Sigma
CD44 (Maus)	ohne	IM7.8.1 (aus Ratte)	Cedarline, Hornby, Canada
CD54	PE	84H10	Beckman Coulter
CD58	PE	AICD 58	Beckman Coulter
CD64	FITC	32.2	Medarex
CD80	FITC	MAB104	Beckman Coulter
CD82	FITC	50F11	RDI, Flanders, USA
CD83	FITC	HB15a	Beckman Coulter
CD86	PE	IT2.2	BD Pharmingen, San Diego, USA
GLUT4 (Maus)	ohne	polyklonal (aus Kaninchen)	Al-Hasani, Hinck et al. (1998)
HLA ABC	FITC	B9.12.1	Beckman Coulter
HLA DR	FITC	B8.12.2	Beckman Coulter
IgG1	ohne	679.1Mc7	Beckman Coulter
Isotypkontrolle IgG1/2a	FITC/PE	679.1Mc7/U7.27	Beckman Coulter
IgG (Kaninchen)	HRP	polyklonal (aus Ziege)	BD Pharmingen
IgG (Maus)	PE	polyklonal (aus Ziege)	Beckman Coulter

2.4.2 Kollagene und aus der extrazellulären Matrix abgeleitete Moleküle

Die nativen Kollagene KI und KXIV wurden im Labor unserer Forschungsgruppe aus humanen Plazenten isoliert. Das KXIV₂₉₋₁₅₄ wurde als rekombinantes Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E.coli* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Als Kontrolle diente ein auf die gleiche Weise gewonnenes freies GST. Die

rekombinanten Proteine KXIV₂₉₋₁₅₄ und GST wurden von Dr. W. Dieterich (Erlangen) hergestellt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die in den biologischen Versuchen verwendeten EZM-abgeleiteten Moleküle und Kontrollproteine sowie die Methoden ihrer Gewinnung werden in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4: **Verwendete native und rekombinante Proteine**

<i>Verbindung</i>	<i>Konzentration (µg/ml)</i>	<i>Referenz</i>
KI	2.000	Rühl, Erben et al. (2005)
KXIV	57	Schuppan, Cantaluppi et al. (1990)
KXIV ₂₉₋₁₅₄	300	Ehnis, Dieterich et al. (1997)
GST	3.000	Ehnis, Dieterich et al. (1997)

2.4.3 Umpuffern von Antikörperlösungen durch Gelfiltration

Durch Gelfiltration werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt, weil einzelne Bestandteile einer gemischten Lösung unterschiedlich lange durch das Gelbett zurückgehalten werden. Die Abbildung 6 zeigt schematisch das Elutionsprofil einer salzreichen Proteinlösung über eine standardisierte NAP-10-Säule.

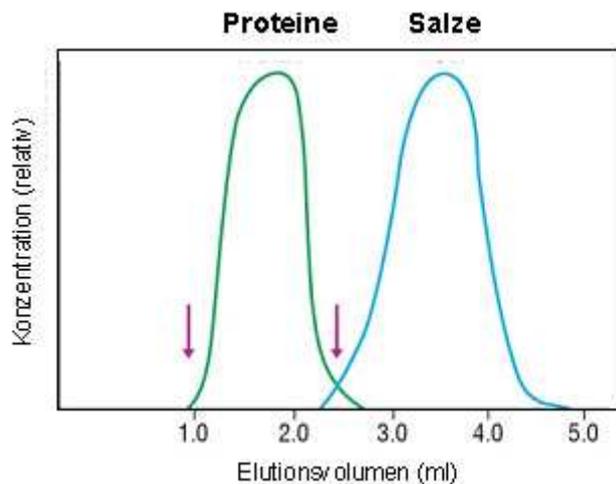


Abbildung 6: **Elutionsprofil einer NAP-10-Säule.** Nach dem Auftragen von 1 ml Probe auf die mit dem neuen Puffersystem äquilibrierte Säule, wird die Proteinfraction in 1,5 ml Puffer eluiert (grün). Beginn und Ende der Probensammlung sind durch Pfeile markiert. Salze werden durch die Poren des Gelbettes zurückgehalten und erst bei größeren Puffermengen (blau) ausgewaschen (GE Healthcare).

Die Trennschärfe der Gelfiltration hängt wesentlich von der Größe und Gleichverteilung der Poren der Partikel sowie von der Länge des Gelbettes ab. Die Gelfiltration ist geeignet Antikörperlösungen umzupuffern und ggf. niedermolekulare toxische Komponenten, wie z.B. NaN₃ in proteinhaltigen Lösungen quantitativ zu reduzieren. Bei Verwendung standardisierter NAP-10-Säulen darf bei einer Ausgangskonzentration der Proteinlösung von mindestens 1 mg/ml von einem Verlust von weniger als 5% der

Ausgangsproteinmenge ausgegangen werden. Das Volumen der Ausgangslösung erhöht sich um den Faktor 1,5. Um Verluste bei der Sterilfiltration dieser Lösungen möglichst gering zu halten, verwendet man am besten Filtermaterialien mit geringer Proteinbindungskapazität, wie z.B. Polytetrafluorethylen oder PVDF. Darüber hinaus kann man den Lösungen definierte Mengen von Makromolekülen zusetzen, die in den nachfolgenden Experimenten inert sind. Für Untersuchungen mit Zellen eignet sich BSA. Diese Faktoren sind bei der Bestimmung der Konzentration steriler, NaN_3 -freier Antikörperlösungen zu kalkulieren.

Lösungen: PBS, 1% (w/v) BSA in PBS, 20% (v/v) Ethanol (unvergällt), NaN_3 -haltige Antikörperlösungen: CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8; 0,2 mg/ml), CD44-spezifischer mAb (Klon IM7.8.1; 0,2 mg/ml), Irrelevantes Maus-IgG1 (Klon 679.1Mc7, 0,2 mg/ml)

Eine NAP-10-Säule wurde senkrecht an einem Stativ fixiert, die untere und obere Sicherungskappe entfernt und die Säule mit 15 ml PBS äquilibriert. Anschließend wurde die zu reinigende Antikörperlösung in einem Volumen von 1 ml auf den Filter über dem Gelbett aufgetragen. Nach dem vollständigen Einlaufen der Probe wurde der Durchlauf verworfen und die Säule mit 1,5 ml PBS in ein neues Röhrchen, in dem 150 μl 1% (w/v) BSA in PBS vorgelegt waren, eluiert. Diese Lösung wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter mit PVDF-Membran sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung der Säule für weitere Reinigungen desselben Antikörpers wurde die Säule mit 25 ml PBS gewaschen. Für die Aufbewahrung wurde die Säule nach dem Waschen nochmals mit 15 ml 20% (v/v) Ethanol (unvergällt) äquilibriert, an beiden Enden wieder verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.5 Zelllinien

Tabelle 5: **Verwendete Zelllinien.** ATCC - *American type culture collection*

	3T3-L1	U937
ATCC-Nummer	CL-173	CRL-1593.2
Herkunft	Maus	Mensch
	Embryonales, fibroblastäres Gewebe	myeloische Zellen aus malignen Pleuraerguss
Wachstum in Kultur	adhärent	in Suspension
Referenz	Green and Meuth (1974)	Sundstrom and Nilsson (1976)

Die biologische Aktivität von Kollagenen und daraus abgeleiteten Proteinen wurden *in vitro* mit den in der Tabelle 5 beschriebenen Zelllinien untersucht.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Medien

Um das im Serum enthaltene Komplement zu denaturieren, wurde das für die Zellkultur verwendete FKS 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubiert, bevor es zu den Medien zugesetzt wurde.

Für adhärente Zellen wurden folgende Medien eingesetzt:

Medium A:	90% (v/v) 10% (v/v) 50 mg/ml 100 U/ml 100 µg/ml	Grundmedium DMEM mit Glutamax-I FKS-A Vitamin C Penicillin Streptomycin
Reduktionsmedium A	90% (v/v) 50 mg/ml 100 U/ml 100 µg/ml	Grundmedium DMEM mit Glutamax-I Vitamin C Penicillin Streptomycin
Einfriermedium A	50% (v/v) 45% (v/v) 5% (v/v)	Grundmedium DMEM mit Glutamax-I FKS-A DMSO

Für Suspensionszellen wurden folgende Medien eingesetzt:

Medium S	90% (v/v) 10% (v/v) 1 mM 2 mM 100 U/ml 100 µg/ml	Grundmedium RPMI1640 mit 25 mM HEPES FKS-S Natriumpyruvat L-Glutamin Penicillin Streptomycin
Reduktionsmedium S	90% (v/v) 1 mM 2 mM 100 U/ml 100 µg/ml	Grundmedium RPMI1640 mit 25 mM HEPES Natriumpyruvat L-Glutamin Penicillin Streptomycin
Einfriermedium S	80% (v/v) 20% (v/v)	FKS-S DMSO

2.6.2 Standardzellkultur

Um Kontaminationen durch Pilze oder Bakterien zu vermeiden, wurde mit Zellkulturen prinzipiell unter keimarmen Bedingungen, d.h. in der laminaren Strömung einer Sterilwerkbank unter Verwendung von Einmalhandschuhen, gearbeitet. Zusätzlich wurden die Arbeitsflächen und alle verwendeten Hilfsmittel vor Gebrauch mit 70% (v/v) Ethanol (vergällt) desinfiziert. Adhärenzte sowie suspendierte Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert.

Medien und Lösungen: Medium A, PBS, Trypsin-EDTA-Lösung, Medium S

Geräte: Begasungsbrutschrank, Kühlzentrifuge, Phasenkontrastmikroskop, Sicherheitswerkbank

3T3-L1-Zellen wachsen *in vitro* als adhärenzte Monolayer. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 185 cm² liegend mit 20 ml Medium A kultiviert.

Um Abbauprodukte zu entfernen und neue Nährstoffe zuzufügen, wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und verworfen, der Zellrasen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und 20 ml frisches Medium A in die Kulturflasche pipettiert.

Im Stadium der Subkonfluenz, d.h. 80% des Bodens war bewachsen, wurden die Zellen in eine neue Flasche passagiert. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium abpipettiert, der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend etwa eine Minute mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um den Ablöseprozess einzuleiten. Die Abrundung der Zellen wurde im Phasenkontrastmikroskop optisch kontrolliert. Durch Abklopfen wurden die Zellen vollständig vom Plastik getrennt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden nun in einem Volumen von 20 ml in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml frischem Medium A aufgenommen. Zwei Milliliter dieser Zellsuspension wurden mit 18 ml Medium A verdünnt in eine neue Kulturflasche überführt.

Die U937-Zellen bleiben unter Kulturbedingungen in Suspension. Sie wurden in der 260-ml-Kulturflasche stehend in 20 ml Medium S kultiviert.

Die Zellpassage fand in einem strikten Wechsel von 3 und 4 Tagen statt. Nach vorheriger optischer Kontrolle unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden die U937-Zellen gut durchmischt und im Verhältnis 1:10 mit frischem Medium S in eine neue Kulturflasche überführt.

2.6.3 Direkte Bestimmung der Zellzahl und Vitalität im Hämatozytometer

Trypanblau ist ein kolloidaler Farbstoff, der durch die brüchige Zellwand von toten Zellen aufgenommen wird. Diese erscheinen dunkelblau. Lebende Zellen hingegen stoßen den Farbstoff aufgrund seiner Größe und Ladung durch das intakte Plasmalemma ab, d.h. sie erscheinen ungefärbt. So können lebende und abgestorbene Zellen aus einer Suspension mikroskopisch unterschieden werden. Durch die Zählung im Hämatozytometer konnte gleichzeitig die Qualität der Zellen aus der Kultur kontrolliert werden.

Lösungen: Trypanblau-Lösung

Geräte: Phasenkontrastmikroskop, Zählkammer nach Neubauer

Aus einer Zellsuspension – adhärenente Zellen wurden vorher abtrypsiniert und in Suspension gebracht – wurden 50 µl entnommen und im Verhältnis 1:2 mit der Trypanblau-Lösung gemischt. Aus diesem Gemisch wurden 10 µl unter das Deckglas einer Neubauerkammer aufgetragen und die Zellen in zwei diagonal gegenüberliegenden Großquadraten gezählt. Dabei wurden die jeweils links und unten liegenden Randlinien und somit die daran angrenzenden Zellen in die Zählung miteinbezogen. Die Anzahl blauer bzw. ungefärbter Zellen multipliziert mit 10^4 entsprach der Anzahl der Zellen pro Milliliter Volumen. Die Vitalität wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{blau}}{\text{blau} + \text{ungefärbt}} \times 100 = \text{Vitalität [\%]}$$

Idealerweise lag die Vitalität zwischen 95 und 90%.

2.6.4 Kryopräservierung von Zellen

Medien und Lösungen: Einfriermedium A, FKS–S, Einfriermedium S, Medium A, Medium S, Ethanol 70% (v/v)

Geräte: Sicherheitswerkbank, Kühlzentrifuge, Phasenkontrastmikroskop, Einfriercontainer/Dewar-Gefäß mit Isopropanol, Tiefkühlschrank (-80°C), N₂-Lagertank, Wasserbad

Die adhärenenten 3T3-L1-Zellen wurden abgelöst und zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Zellpellet wurde in Einfriermedium zu einer Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/1,8 ml verdünnt und in Portionen von 1,8 ml auf eisgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden nun in den mit Isopropanol angefüllten Einfriercontainer überführt und für 24 Stunden bei -80°C gelagert, bevor sie dauerhaft über flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt wurden.

Die Zellen der Zelllinie U937 wurden 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in eisgekühltem FKS resuspendiert und auf die Endkonzentration von 1×10^7 Zellen/0,9 ml eingestellt. Anschließend wurde die Suspension im Verhältnis 1:2 mit gekühltem Einfriermedium verdünnt. Die Kryoröhrchen wurden mit 1,8 ml Volumen, und somit 1×10^7 Zellen, gefüllt. Nach zwei Stunden Lagerung bei -80°C wurden die Röhrchen zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das zum Auftauen bestimmte Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff geholt und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Vor dem Öffnen wurde die Außenfläche mit Ethanol gereinigt. Der Inhalt des Röhrchens wurde nun schnellstmöglich in 40 ml des jeweiligen Mediums pipettiert und 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml frischem Medium resuspendiert und in die entsprechende Kulturflasche überführt.

2.6.5 Entzug von Wachstumsfaktoren

Zellen in Vollmedium, d.h. bei Zusatz von 10% FKS, haben optimale Wachstumsbedingungen. Denn durch die FKS-Zugabe werden verschiedene Wachstumsfaktoren zugeführt, welche die Zellen stimulieren und zur Proliferation anregen. Entzieht man den Zellen diese Faktoren werden sie in einen Mangelzustand versetzt und dadurch sensibler für äußere Stimuli.

Medien und Lösungen: Medium A, Reduktionsmedium A, FKS–A, PBS, Reduktionsmedium S, FKS–S

Geräte: Begasungsbrutschrank, Sicherheitswerkbank

Adhärente Zellen wurden zur optimalen Adhäsion in Medium A in die Zellkulturplatten ausgesät und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen in den Löchern dreimal mit jeweils 200 μl PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Zellkulturplatte auf sterilem Zellstoff ausgeschlagen. Danach wurden die Zellen in Reduktionsmedium A, in dem der FKS-Gehalt auf 0,5-5% (v/v) eingestellt war, überführt.

Zur Synchronisation von Suspensionszellen wurden diese bereits in Reduktionsmedium S mit entsprechend verringertem Serumgehalt ausgesät.

2.6.6 Zellzyklussynchronisation durch Kälte

In der Zellpopulation einer exponentiell wachsenden Kultur unter optimalen Medienbedingungen führt die generelle Verlangsamung aller zellulären Stoffwechselvorgänge durch Kälteexposition zur Anreicherung von Zellen in der gleichen

Phase des Zellzyklus. Starke Hypothermie (4-10°C) hemmt insbesondere den G1/S-Übergang. Die plötzliche Erhöhung der Temperatur auf 37°C führt dann dazu, dass alle Zellen der Kultur von vergleichbaren Ausgangspunkten in die nächste Runde des Zellzyklus starten, sie sind synchronisiert (Rieder and Cole 2002).

Medien und Lösungen: Reduktionsmedium S, FKS-S

Geräte: Begasungsbrutschrank, Sicherheitswerkbank, Kühlschrank

Das gesamte Volumen der Zellsuspension wurde aus der Zellkulturflasche entnommen und 10 Minuten mit 800 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Reduktionsmedium S mit einem Serumzusatz von 0,5% (v/v) aufgenommen und für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Zahl in dem Reduktionsmedium S mit Zusatz von 0,5% (v/v) FKS in die Zellkulturplatte eingesetzt.

2.6.7 Beschichtung von Zellkulturplatten

Alle Proteine, also auch Kollagene, binden als geladene Verbindungen auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen auf gegenläufig geladene Oberfläche von Zellkulturplatten. Die Effizienz der Bindung ist stark vom verwendeten Plastikmaterial und dem pH-Wert der Lösungen abhängig. Für die Proteinbindung bevorzugt man Polystyrol bei neutralen oder mäßig basischen Bedingungen.

Lösungen: 0,1% (w/v) BSA in PBS, KI, KXIV, KXIV₂₉₋₁₅₄, GST, PBS, NaN₃-freie Antikörperlösungen: CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8; 0,13 mg/ml), CD44-spezifischer mAb (Klon IM7.8.1; 0,13 mg/ml), Irrelevantes Maus-IgG1 (Klon 679.1Mc7, 0,13 mg/ml)

Geräte: Begasungsbrutschrank, Kühlschrank

Die eisgekühlten Stammlösungen von Kollagenen und rekombinanten Proteinen wurden mit PBS auf eine Endkonzentration von 30 µg/ml verdünnt. Die 96-Loch-Platten bzw. Zellkultureinsätze wurden mit je 100 µl und 24-Loch-Platten mit je 1 ml dieser Lösungen pro Loch befüllt. Für die Negativkontrollen wurden die Löcher mit dem entsprechenden Volumen PBS versehen. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch Ausschlagen der Platte auf einem sterilen Zellstoff verworfen. Die Löcher wurden einmal mit 200 µl bzw. 2 ml PBS gewaschen. Dann wurde in jedes Loch 200 µl bzw. 2 ml BSA-Blockierungslösung pipettiert, um die noch freien Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche abzusättigen. Die Platte wurde daraufhin für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde sie dreimal mit PBS gewaschen, bevor die

Zellen in die Löcher eingesetzt wurden. Dabei wurde beachtet, dass nach der Beschichtung mit Kollagen die Platte nicht austrocknen konnte.

Damit die Versuche untereinander vergleichbar werden, entnahm man die Zellen immer zum gleichen Zeitpunkt der Kulturflasche. Adhärente Zellen wurden im Stadium der gerade erreichten Subkonfluenz und Suspensionszellen zwei Tage nach der letzten Passage eingesetzt.

Rekombinante Peptide und mAbs konnten alternativ auch nach der Zellaussaat gelöst hinzupipettiert werden, da sie nicht wie das Gesamtmolekül KXIV in einem zytotoxischen Puffer mit Harnstoff aufbewahrt wurden.

2.6.8 Indirekte Bestimmung der Zellzahl über intrazelluläre Esterasen

Die metabolische Aktivität intrazellulärer Esterasen kann als Maßstab für lebende Zellen herangezogen werden. MUH wird in intakte Zellen aufgenommen und als Substrat durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das dabei entstehende Produkt kann fluorimetrisch erfasst werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität (FI) korreliert mit der Zahl lebender Zellen (Virag, Kerekgyarto et al. 1995).

Lösungen: 10 mg/ml MUH in DMSO, PBS

Geräte: Fluorimeter, Begasungsbrutschrank

Die Zellen wurden bis zum Messzeitpunkt in einer 96-Loch-Platte kultiviert. Die MUH-Versuchslösung wurde durch Verdünnung der Stammlösung mit PBS im Verhältnis 1:100 hergestellt. Das Medium wurde aus den Löchern abpipettiert, der verbleibende Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 100 µl der MUH-Versuchslösung dazugegeben. Die so behandelte Platte wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und unmittelbar darauf wurde im Fluorimeter mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm die emittierte Fluoreszenz bei 460 nm bestimmt.

2.7 Zellproliferation durch Einbau von [³H]-Thymidin

Tritium (³H) markiertes Thymidin wird, wenn es im Zellkulturmedium vorliegt, kompetitiv zum zelleigenen Nucleosid in der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut und ist dadurch ein Maßstab für die Zellproliferation. Nach Lyse der Zellen durch Kälte oder unter alkalischen Bedingungen werden die DNS-Fragmente auf einen Glasfaserfilter mit hoher DNS-Bindungsaffinität präzipitiert. Das eingebaute [³H]-Thymidin wird chemisch in Szintillationen, also Lichtblitze umgewandelt, die quantifiziert werden können.

Medien und Lösungen: Medium A, Reduktionsmedium A, Reduktionsmedium S, 25 µCi/ml [³H]-Thymidin in Reduktionsmedium A/S, 10% (w/v) TCA, 200 mM NaOH, 800 mM HCl

Geräte: Begasungsbrutschrank, Brutschrank, Cell Harvester, Mikrowelle, Szintillationszähler, Tiefkühlschrank (-80°C)

Adhärente Zellen wurden 24 Stunden in 100 µl Medium A bzw. Reduktionsmedium A mit unterschiedlicher FKS-Konzentration in einer 96-Loch-Platte inkubiert. Für die letzten vier Stunden wurde 20 µl der [³H]-Thymidin-Lösung hinzugegeben. Nach Ablauf der Einbauzeit wurde das Medium aus den Löchern auf eine Zellstofflage ausgeschlagen und die Zellen durch Überschichten mit 200 µl 10% (w/v) TCA bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach 30 Minuten wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen bei RT mit 50 µl 200 mM NaOH lysiert. Dabei wurde gleichzeitig die DNS partiell hydrolysiert. Diese Reaktion wurde nach 30 Minuten durch Neutralisation mit 50 µl 800 mM HCl gestoppt. Nun konnte die Platte bei -80°C bis zur Messung an einem späteren Zeitpunkt eingefroren werden. Nach dem Auftauen im Brutschrank bei 37°C wurde der Inhalt jedes Loches mit Hilfe des Cell Harvesters abgesaugt. Die DNS-Fragmente wurden dabei auf ein entsprechendes Feld eines Glasfaserfilters präzipitiert.

Suspensionszellen wurden (a) 20 Stunden in 100 µl oder (b) vier Tage in 200 µl Reduktionsmedium S in einer 96-Loch-Platte inkubiert. Anschließend wurden 20 µl [³H]-Thymidin-Lösung für (a) vier Stunden oder (b) 18 Stunden hinzugegeben. Die Proliferation wurde abrupt durch Einfrieren der Zellkulturplatte für mindestens eine Stunde bei -80°C abgebrochen. Dadurch wurde die Zellwand lysiert und die DNS freigesetzt. Zum Auftauen wurde die Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Inhalt wurde daraufhin mit Hilfe des Cell Harvesters auf eine Filtermatte übertragen und die DNS so auf ein entsprechendes Loch präzipitiert. Um die DNS möglichst vollständig zu erhalten, wurden die Platten wie bei den adhärennten Zellen anschließend mit der Sequenz aus TCA-, NaOH- und HCl-Lösungen behandelt. Diese Überstände wurden auf einen zweiten Filter übertragen und die Messwerte dieser beiden Filter für die Auswertung addiert.

Alle Filter wurden in der Mikrowelle bei 175 W für 20 Minuten getrocknet, mit Szintillationswachs bedeckt und vier Minuten bei +80°C im Brutschrank inkubiert. Jede Probe wurde eine Minute im Szintillationszähler gemessen. Die ermittelten Werte entsprachen den radioaktiven Zerfällen in diesem Zeitraum (counts per minute; cpm).

2.8 Oil-Red-O-Färbung von Lipidtropfen

Medien und Lösungen: Medium A, 10 mg/ml Insulin in 1% (v/v) HAC, 20 mg/ml DEX in 70% (v/v) Ethanol (vor Verwendung Verdünnung im Verhältnis 1:50 in Grundmedium DMEM), 10 mg/ml MIX in 70% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Formalaldehyd in PBS, Hämalaun-Lösung, Isopropanol, Oil Red O

Geräte: Sicherheitswerkbank, Begasungsbrutschrank, Phasenkontrastmikroskop, Kühlschrank, Digitalkamera

In die zur 24-Loch-Platte gehörenden Zellkultureinsätze wurden nach der Beschichtung 5×10^3 3T3-L1-Zellen in 100 μ l Medium A eingesetzt. In das Loch selbst wurden 800 μ l Medium A vorgelegt. Hatte sich nach zwei bis drei Tagen mikroskopisch ein konfluenter Zellrasen gebildet, wurde dieser Zeitpunkt als Tag 0 der Kultur festgelegt und die Zellen weiter inkubiert. Zwei Tage später wurde das Medium sowohl aus den Einsätzen als auch aus dem Loch abpipettiert und entweder durch frisches Medium A oder durch Medium A mit einem Hormoncocktail aus 10 μ g/ml Insulin, 400 μ g/ml DEX und 111 μ g/ml MIX ersetzt. Zugewetzte gelöste Peptide wurden ebenfalls ersetzt. Im weiteren Verlauf wurde alle 2 bis 3 Tage auf diese Weise das Medium gewechselt.

Zur Herstellung der Oil-Red-O-Lösung wurden 530 mg Oil-Red-O-Pulver in 150 ml Isopropanol gelöst und ohne Schütteln über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Gemisch mit Hilfe eines Membranfilters filtriert, mit 112,5 ml bidestilliertem Wasser versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Tags darauf wurde die Lösung zweimal filtriert und zur Verwendung aliquotiert. Bei RT waren die Aliquots 6-8 Monate verwendbar. Sie wurden vor jedem Einsatz erneut filtriert (Ramirez-Zacarias, Castro-Munozledo et al. 1992).

An Tag 9 der oben beschriebenen Kultur wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 100 μ l Formalin bei RT eine Stunde fixiert. Nach der Fixierung wurde der Zellrasen erneut mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde jedes Loch mit 100 μ l der Oil-Red-O-Färbelösung für zwei Stunden inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang mit destilliertem Wasser wurde die frisch filtrierte Hämalaun-Gegenfärbung für maximal 5 Minuten aufgetragen, und der Zellrasen erneut gewaschen.

Die zelltragende Membran der Zellkulturplatteneinsätze wurde mit einem Skalpell vorsichtig herausgelöst und auf einen Objektträger übertragen, auf dem die gefärbten Zellen nun unter einem Deckglas eingebettet wurden. Abschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt und fotografiert.

2.9 Nachweis der Expression des Glukosetransporters GLUT4 im Western-blot

2.9.1 Kultivierung und Fraktionierung von 3T3-L1-Zellen

Medien und Lösungen: Medium A, ProteoExtrakt

Geräte: Sicherheitswerkbank, Begasungsbrutschrank, Phasenkontrastmikroskop, Kühlzentrifuge, Kühlschrank, Biofuge pico, Tiefkühlschrank (-80°C)

In eine beschichtete 6-Loch-Zellkulturplatte wurden 1×10^6 3T3-L1-Zellen in 2 ml Medium A bzw. dem Hormoncocktail aus 10 µg/ml Insulin, 400 µg/ml DEX und 111 µg/ml MIX eingesetzt. Nach drei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 5 erfolgte die Auswertung. In einem Loch jeder Behandlungsart wurde eine Zellzählung mittels Neubauerkammer durchgeführt. Zwei weitere Löcher der Zellkulturplatte mit identischer Behandlungsart wurden gepoolt. Das Medium wurde abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Zellrasen wurde zunächst mit 2 ml PBS gewaschen bevor er in 2 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers vom Plastik entfernt wurde. Überstand und Zellgemisch wurden jeweils vollständig in das genannte Zentrifugenröhrchen überführt, welches nun für 10 Minuten bei 800 U/min bei 4°C zentrifugiert wurde. Die weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet mit Hilfe der ProteoExtrakt Puffer in seine subzellulären Kompartimente aufgetrennt. Dazu wurde das Pellet zunächst in den mitgelieferten Waschpuffer aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Suspension wurde bei 1500 U/min bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Waschschrift und Zentrifugation wurden wiederholt. Das Pellet wurde dann in 100 µl Extraktionspuffer 1 mit 0,5 µl Proteaseinhibitor gelöst und 10 Minuten inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation mit 13 000 U/min für 10 Minuten bei 4°C, wurde der Überstand, der nun der zytosolischen Zellfraktion (F1) entsprach, abgenommen und in 20 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.9.2 Gelelektrophorese

Elektrisch geladene Teilchen wandern im elektrischen Feld. Proteine eines Substanzgemisches unterscheiden sich hinsichtlich Ladung und Größe, deshalb besitzen sie im elektrischen Feld unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Durch diesen Effekt können mit Hilfe der Gelelektrophorese Substanzgemische in ihre Einzelbestandteile aufgetrennt werden.

Medien und Lösungen: 1% Bromphenolblau in *Aqua dest*, Acrylamid, 4x Trenngel (TG)-Puffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS), TEMED, 10% (w/v) APS in

Aqua dest, 4x Sammelgel (SG)-Puffer (500 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS), Größenmarker, Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 187,5 mM L-Glycin, 0,5% (w/v) SDS)

Geräte: Mini-Protean-II-System, Kühlschrank, Biofuge pico

Am Tag vor der Durchführung wurden Die SDS-Polyacrylamidgele bestehend aus Trenn- und Sammelgel vorbereitet. Zunächst wurde das TG (12% Acrylamid, 10% SDS, 0,1% TEMED, 1% APS in 1x TG-Puffer) gegossen. Nach 30 Minuten Polymerisationszeit wurde das SG (3% Acrylamid, 10% SDS, 0,1% TEMED, 1% APS in 1x SG-Puffer) dazugegeben. Das fertige Gel wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Am Tag der Gelelektrophorese wurden die Zellfraktionen aufgetaut, mit 2 µl Bromphenolblau versetzt, suspendiert und für 5 Minuten bei 4.000 U/min zentrifugiert. Entsprechend der zuvor ermittelten Zellzahlen wurden die Volumina der Proben mit Hilfe einer Hamilton-Pipette in die Taschen des SG aufgetragen. Als Referenz wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer befüllt. Während der Sammelphase des Gels wurden 80 V an die Elektroden angeschlossen, in der Trennphase 180 V. Die Laufzeit betrug etwa 1,5 Stunden. Die Proteine mit 45 kDa Molekulargewicht, wie GLUT4, befanden sich etwa in Mitte des Gels.

2.9.3 Western-blot und Immundetektion

Mit Hilfe der Westernblot-Methode werden Proteine durch Anlegen von Spannung aus einem Gel auf eine immobilisierende Membran transferiert. Dort werden sie durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert. Einzelne Epitope können nun durch spezifische Antikörperbindung detektiert werden. Diese spezifische Antikörperbindung kann durch einen Enzym-konjugierten Zweitantikörper sichtbar gemacht werden. Wenn das Enzym mit einer geeigneten Substratlösung reagiert, wird durch Chemolumineszenz ein Film belichtet und somit indirekt das spezifische Epitop dargestellt.

Medien und Lösungen: Blot-Puffer (25 mM Tris/Base, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS), 10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) (200 mM Tris/HCl, pH 7,6, 1,37 mM NaCl), Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver, 0,1% (v/v) Tween 20 in 1x TBS), Waschpuffer (0,1% (v/v) Tween 20 in 1x TBS), GLUT4-spezifischer mAb (Verdünnung 1:4000 in 0,1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) BSA, 1x TBS), HRP-konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000 in 0,1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) BSA, 1xTBS), Detektionsreagenz ECL

Geräte: Blot-Tank, Thermostat, Laborschüttler, Filmentwickler

Die Gele und Nitrozellulosemembranen wurden zunächst in Blot-Puffer equilibriert, bevor sie übereinander gelegt und zwischen zwei Schwämmen in einer Gitterkassette zu einem Blot-Sandwich zusammengebaut wurden. Die Gitterkassette wurde in einem mit Blot-Puffer gefüllten Tank überführt, so dass die Membran der Anodenseite zugewandt war. Die Blotzeit betrug 55 Minuten bei 300 mA unter Wasserkühlung (10°C). Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran über Nacht bei RT getrocknet.

Die nachfolgenden Schritte wurden in Glasschalen auf einem Laborschüttler bei RT durchgeführt. Die verwendeten Puffer basieren auf TBS, das Inkubationsvolumen betrug in der Regel 20 ml. Zunächst wurde die Membran mindestens eine Stunde mit der Blockierungslösung inkubiert. Nachdem die Membran dreimal 5 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen worden war, wurde der GLUT4-Primärantikörper für eine Stunde hinzugegeben. Es erfolgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang. Die Membran wurde zur Detektion des Primärantikörpers eine Stunde mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran, erfolgte die Behandlung mit dem Chemilumineszenz-Substrat. Zur Herstellung dieses Substrates je 5 ml der beiden gelieferten Detektionsreagenzien vermischt und anschließend für eine Minute zur Membran gegeben. Die Substratlösung wurde verworfen und die Membran zwischen zwei transparente Folien in eine Filmkassette eingespannt. In einer Dunkelkammer wurde ein Chemilumineszenz-sensitiver Film für etwa 30 Sekunden belichtet und anschließend entwickelt.

2.10 Durchflusszytometrie (FACS)

An Oberflächenantigene von Suspensionszellen können spezifische Antikörper binden, die fluoreszenzmarkierte Farbstoffe FITC und PE tragen. PI hingegen ist ein DNS-interkalierendes Molekül, das nur nicht-intakte Membranen passiert und tote Zellen somit markiert. Durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung werden Zellen im Durchflusszytometer durch eine Kapillare in das Messgerät aufgenommen, beschleunigt, aufgetrennt und perlenschnurartig aneinandergereiht, um dann mittels eines Lasers gemessen zu werden. Diese Messung umfasste zwei Vorgänge. Einerseits wird die Streuung des einfallenden Lichtstrahls bestimmt. Dabei wird als Vorwärtsstreuung die Zellgröße und als Seitwärtsstreuung die Granularität erfasst. Andererseits werden durch die Anregung des Argonlasers mit einer Wellenlänge von 488 nm die Fluoreszenzemissionen von den Farbstoffen FITC, PE und PI aufgrund ihrer unterschiedlichen Wellenlängen in drei unabhängigen Detektoren gemessen. Die Auswertung wird auf die Population, definiert anhand von Größe und Granularität, und auf

nicht-PI-gefärbte Zellen, also lebende Zellen, beschränkt. Die Anzahl von markierten Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von FITC und PE geben Auskunft über das Antigenprofil der Zellpopulation.

Medien und Lösungen: FACS-Puffer (0,5% (w/v) BSA und 0,01% (w/v) NaN_3 in PBS), Medium S, Kaninchenserum, 50 $\mu\text{g/ml}$ PI in FACS-Puffer, 10 $\mu\text{g/ml}$ PE-konjugierter anti-Maus-IgG-Zweitantikörper in FACS-Puffer, mAbs (nach Herstellerangaben),

Geräte: Begasungsbrutschrank, Durchflusszytometer, Kühlschrank, Kühlzentrifuge

Aus einer Zellpopulation wurden am Tag 0 5×10^4 U937-Zellen in 2 ml Medium S in eine beschichtete 24-Loch-Platte eingesetzt. An Tag 3 wurde ein Halbmedienwechsel bei den inkubierten Zellen durchgeführt. Neben frischem Medium S wurden auch zugesetzte gelöste Peptide oder mAbs ersetzt. An Tag 0 und Tag 6 wurden die Oberflächeneigenschaften der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

An den Messtagen wurden je 2×10^5 Zellen zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften in Röhrchen überführt. Zur Geräteeinstellung wurden außerdem drei Röhrchen mit jeweils 1×10^6 Zellen vorbereitet. Anschließend wurden alle überführten Zellsuspensionen gewaschen, d.h. es wurden 2 ml FACS-Puffer dazugegeben und die Röhrchen 5 Minuten bei 1.500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet im Restvolumen resuspendiert. Zur Suspension wurden dann 50 μl hitzeinaktiviertes Kaninchenserum hinzupipettiert und somit unspezifische Bindungen blockiert.

Direkt-konjugierte Antikörper: FITC bzw. PE markierte mAbs wurden gleich im Anschluss in einem Volumen von 20 μl hinzugegeben und anschließend 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Dabei wurden Doppelfärbungen mit je einem FITC und PE Antikörper pro Röhrchen zeitgleich vorgenommen.

Unkonjugierte Antikörper: Nicht-markierte, spezifische Antikörper wurden in einem Volumen von 20 μl hinzugegeben und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension, wie oben beschrieben, mit FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 25 μl der PE-konjugierten anti-Maus-IgG-Zweitantikörperlösung suspendiert. Auf diese Weise wird der bereits gebundene Maus-Antikörper erkannt und indirekt mit dem PE Farbstoff markiert. Nach weiteren 20 Minuten bei 4°C wurde die Zelllösung erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Doppelfärbung wurde die Suspension 20 Minuten mit 20 μl eines spezifischen FITC-markierten Antikörpers bei 4°C inkubiert.

Die doppeltmarkierten Zellsuspensionen wurden mit 100 μl der PI-Lösung versehen und für weitere 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Zellen in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert.

Vor der Messung wurde das Gerät kalibriert. Durch die Kombinationsfärbung mit den Isotypkontrollen IgG1-FITC/IgG2a-PE wurde die Einstellung von Zellgröße und Granularität angepasst. Die Einzelfärbungen CD33-FITC bzw. CD33-PE dienten dazu, den Messbereich des jeweiligen Farbspektrums zu optimieren. Anschließend wurden jeweils 20×10^3 Ereignisse aus allen Röhrcchen gemessen. Die Verteilung der emittierten Fluoreszenzemissionen, die MFI wurde in willkürlich gewählten Einheiten, die sich aus der Kanalnummer ergeben, angegeben.

2.11 Statistik

Aus den parallel angesetzten Einzelwerten (x_i) und der Anzahl der Einzelmessungen (n) jedes Versuches wurde Mittelwert und Standardabweichung nach folgenden Formeln berechnet:

Mittelwert (MW):
$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Standardabweichung (SD):
$$\sigma_{n-1} = +\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Die statistische Auswertung der einzelnen Messreihen eines Versuches erfolgte anschließend mit Hilfe der ANOVA-Varianzanalyse sowie dem multiplen t-Test nach Bonferroni (Software: InStat, GraphPad, LaJolla, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Biologische Effekte von KXIV und seinem aminoterminalen Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ auf 3T3-L1-Zellen

3.1.1 Serumabhängigkeit der KXIV-Wirkung bei der Proliferation

Zunächst sollte untersucht werden, wie das Gesamtmolekül KXIV in plastikgebundener Form die Proliferation der mesenchymalen Zelllinie 3T3-L1 beeinflusst. Im ersten Schritt wurden die Versuchsbedingungen optimiert, um einen möglichen Effekt vor dem Hintergrund medienbedingter Unterschiede herauszuarbeiten. Angelehnt an Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe mit 3T3-Swiss-Zellen wurden in den Versuchen mit der Zelllinie 3T3-L1 jeweils 5×10^3 Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l eingesetzt und die FKS-Konzentration variiert (Abbildung 7).

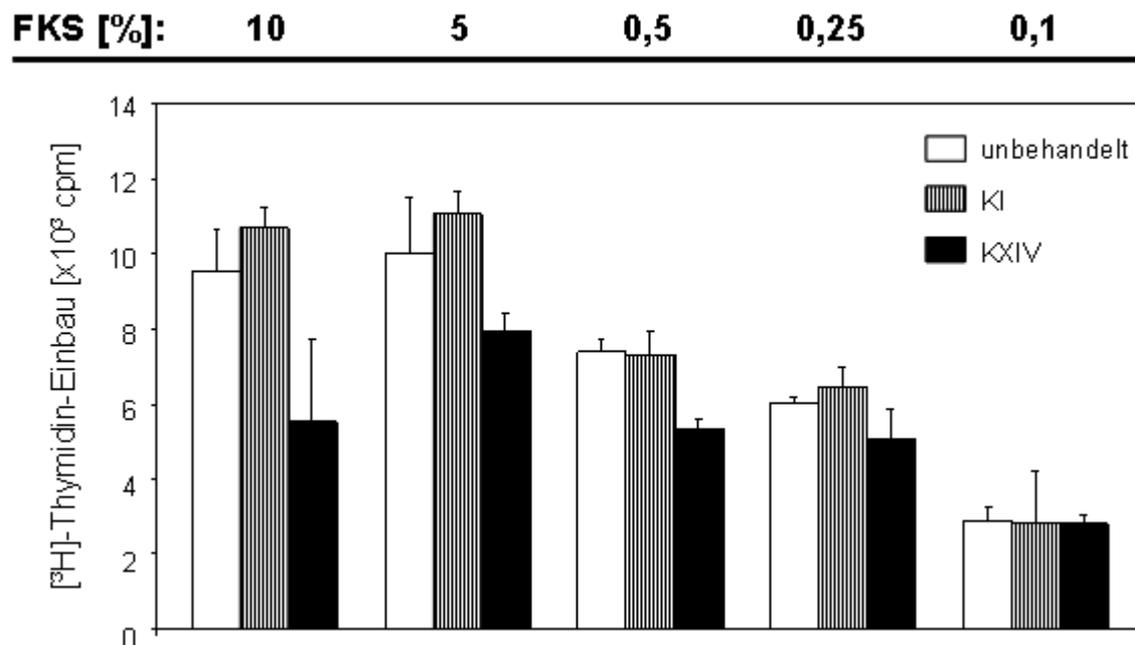


Abbildung 7: **FKS-abhängige Wirkung von plastikgebundenem KXIV auf die Proliferation bei 3T3-L1-Zellen.** Löcher von 96-Loch-Zellkulturplatten enthielten 3 μ g plastikgebundenes KXIV bzw. KI oder blieben unbehandelt. 3T3-L1-Zellen (5×10^3) wurden in Medium A ausgesät. Nach 4 Stunden wurde das Medium durch Medium A oder Reduktionsmedium A mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen ersetzt und die Kulturplatte für weitere 24 Stunden inkubiert. Während der letzten 4 Stunden enthielt jede Kultur 0,5 μ Ci 3 H]-Thymidin. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelkulturen.

In den Ansätzen ohne Kollagen und mit KI verhielt sich die Proliferation proportional zur FKS-Konzentration. Das Maximum des 3 H]-Thymidin-Einbaus wurde mit 5 und 10% (v/v) FKS erreicht und lag vergleichbar um 10^4 cpm. In den Kulturen mit 0,1% (v/v) FKS war

das Maximum der Proliferation etwa um den Faktor 3,3 geringer als bei hohem Serumgehalt. Die Proliferation war bei unbehandelten Zellen stets analog zu den Kulturen mit KI-Zusatz. Beide Ansätze waren also als Kontrolle für die Wirkung von KXIV geeignet.

In Gegenwart von plastikgebundenem KXIV war der [³H]-Thymidin-Einbau der 3T3-L1-Zellen bei FKS-Gehalten von 10, 5 oder 0,5% (v/v) um 50%, 28% bzw. 27% im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen reduziert. Bei einem Serumgehalt von weniger als 0,5% im Medium zeigte sich vor dem Hintergrund der insgesamt geringen DNS-Neusynthese kein antiproliferativer Effekt.

Die Signifikanz der Reduktion der Proliferation durch KXIV wurde in zwei weiteren Versuchen mit jeweils 6 Einzelkulturen bei 10% (v/v) FKS untersucht (Abbildung 8).

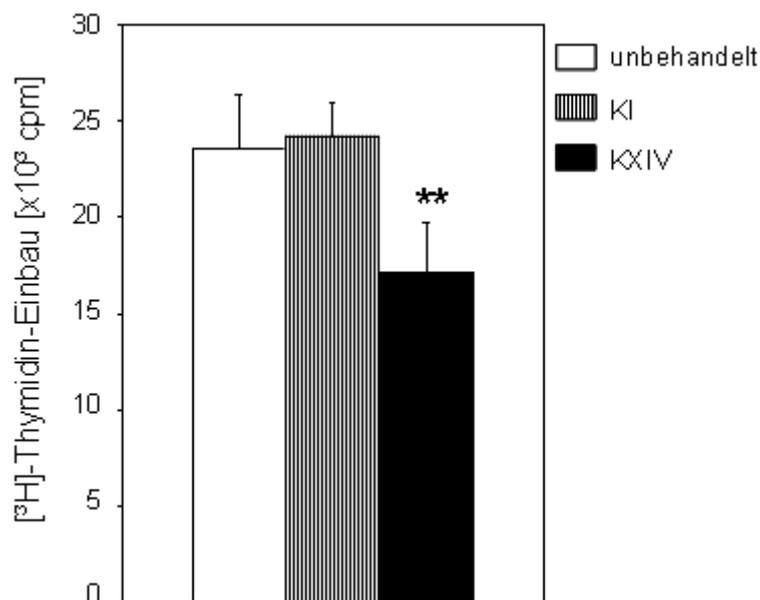


Abbildung 8: **Effekt von plastikgebundenem KXIV auf die Proliferation bei 3T3-L1-Zellen.** Beschichtung, und Kultur erfolgte wie in Abbildung 7 für Medium A beschrieben. Abgebildet sind MW und SD aus 6 Einzelkulturen. **p≤0,01 bezieht sich auf beide Kontrollen.

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p≤0,01 in Bezug auf die Kontrollen ohne KXIV und mit KI bestätigte sich die antiproliferative Wirkung von KXIV unter Standardmedienbedingungen. Daher wurden alle weiteren Versuche zur Wirkung von KXIV auf 3T3-L1-Zellen in Medien mit einer FKS-Konzentration von 10% durchgeführt. Die Messung von 6 Einzelkulturen zur besseren statistischen Auswertung wurde ebenfalls beibehalten.

3.1.2 Proliferation mit gelöstem und plastikgebundenem KXIV₂₉₋₁₅₄

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die antiproliferativen Effekte auch mit dem Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ reproduziert werden können. Der Fusionspartner GST wurde in den folgenden Versuchen als Kontrolle mitgeführt. Das Fragment wurde alternativ auf die Plastikoberfläche gebunden oder gelöst zu den Zellen gegeben.

Um die Wirkung des Fragments KXIV₂₉₋₁₅₄ zu erproben, wurden 5×10^3 3T3-L1-Zellen in 100 μ l Medium A inkubiert. Abbildung 9 stellt die Ergebnisse eines Versuches, der repräsentativ für zwei vergleichbare Versuche ist, dar.

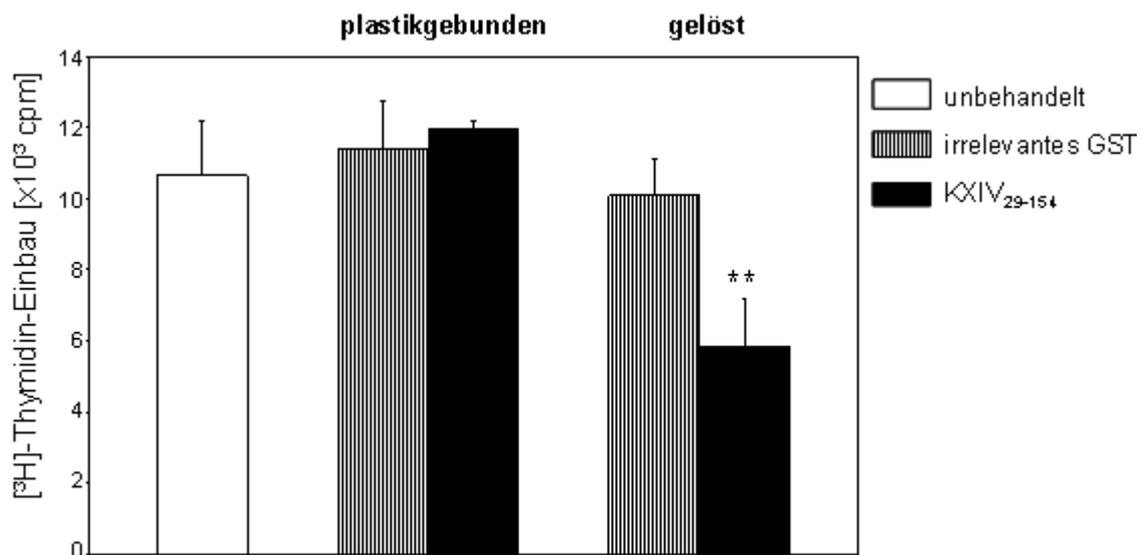


Abbildung 9: **Einfluss der Präsentation auf die Wirkung von KXIV₂₉₋₁₅₄ auf die Proliferation bei 3T3-L1-Zellen.** 3T3-L1-Zellen (5×10^3) wurden in Löcher der 96-Loch-Platte in 100 μ l Medium A ausgesät. 3 μ g KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. GST wurden auf die Plastikoberfläche gebunden oder in Lösung zu den Zellen gegeben. Inkubation und Statistik erfolgte wie in Abbildung 7 und 8 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils 6 Einzelkulturen. ** $p \leq 0,01$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

In den Ansätzen ohne Kollagen bzw. mit Zusatz von GST lag die maximale Proliferation unabhängig von der Präsentation jeweils um 11×10^3 cpm. In Lösung reduzierte das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ den [3H]-Thymidin-Einbau um 40% im Vergleich zu den Kontrollen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$. Plastikgebundenes KXIV₂₉₋₁₅₄ hatte keinen Effekt auf die DNS-Neusynthese. In allen weiteren Versuchen mit 3T3-L1-Zellen wurde deshalb das KXIV₂₉₋₁₅₄ ausschließlich in Lösung verwendet.

3.1.3 Einfluss auf die Zellzahl

Die vorausgegangenen Versuche zeigten einen Rückgang der Proliferation in Anwesenheit des Gesamtmoleküls KXIV sowie des Fragments KXIV₂₉₋₁₅₄. Zur Beantwortung der Frage, ob zytotoxische Effekte des Kollagens dafür verantwortlich sind, wurde eine indirekte Zellzahlbestimmung mit Hilfe der enzymatischen Umsetzung von MUH durchgeführt (Abbildung 10).

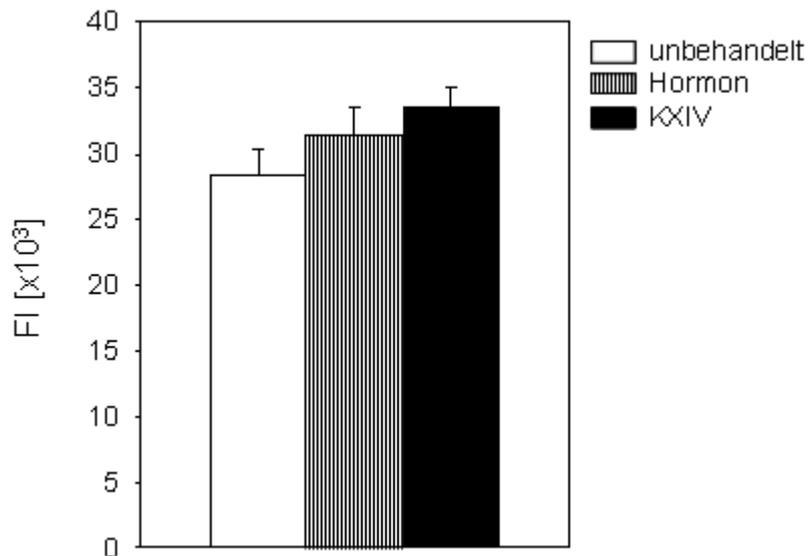


Abbildung 10: **Einfluss von KXIV auf Zellzahl von 3T3-L1-Zellen.** Löcher der 96-Loch-Platte enthielten 3 µg plastikgebundenes KXIV oder blieben unbehandelt. 3T3-L1-Zellen (5×10^3) wurden in 100 µl Medium A ausgesät. Ab Tag 2 nach erreichter Konfluenz wurden ausgewählte Kulturen mit einem Hormoncocktail aus Insulin, DEX und MIX behandelt. Am Tag 9 wurde die MUH-Lösung zugegeben und die Platte fluorimetrisch gemessen. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelwerten.

Für unbehandelte Zellen wurde nach 11tägiger Inkubation Fluoreszenzintensitäten um 30×10^3 FI ermittelt. Die als Positivkontrolle mitgeführten differenzierten Zellen unter Zugabe des Hormoncocktails zeigten ebenfalls Werte in diesem Bereich. Genauso konnte unter Zugabe von KXIV keine Abweichung zu den Kontrollen festgestellt werden. Daraus ließ sich schließen, dass der Rückgang der Proliferation nicht auf zytotoxische Effekte des Kollagens zurückzuführen war. Es musste vielmehr von einem Verlassen des Zellzyklus mit beginnender Differenzierung ausgegangen werden.

3.1.4 Nachweis der Differenzierung über die Fetttropfchenbildung

Die Fähigkeit der präadipozytären 3T3-L1-Zellen auf einen Hormonstimulus hin Triglyceride zu bilden und diese intrazytoplasmatisch als Fetttropfchen einzulagern, wurde als terminale Differenzierung betrachtet. Ein Hormoncocktail aus Insulin, DEX und MIX wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle für morphologische Veränderungen hin zu reifen Adipozyten mitgeführt (Abbildung 11).

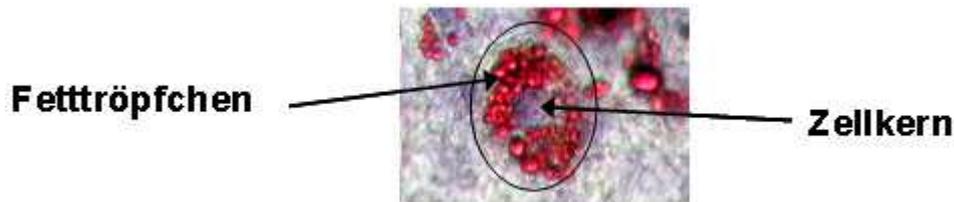


Abbildung 11: **Differenzierte 3T3-L1-Zelle nach Hormonstimulation (Detailaufnahme).** 3T3-L1-Zellen (5×10^3) wurden in 100 μ l Medium A in Zellkultureinsätze einer 24-Loch-Platte eingesetzt. Ab Tag 2 nach erlangter Konfluenz wurden die Kulturen mit einem Hormoncocktail aus Insulin, DEX und MIX stimuliert. An Tag 9 wurden die Zellen mit Oil-Red-O und Hämalaun gefärbt. Die Zelle wurde mit 60facher Vergrößerung fotografiert.

Nach 7tägiger Inkubation mit dem Differenzierungscocktail verloren die Zellen ihre Spindelform. Sie wurden rundlich und lagerten kranzförmig um den Zellkern herum rot anfärbbare Triglyceride und Cholesterinester ein.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Präadipozyten durch Kontakt mit KXIV ebenfalls zur terminalen Differenzierung angeregt werden können. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse aus einem von drei gleichartigen Versuchen.

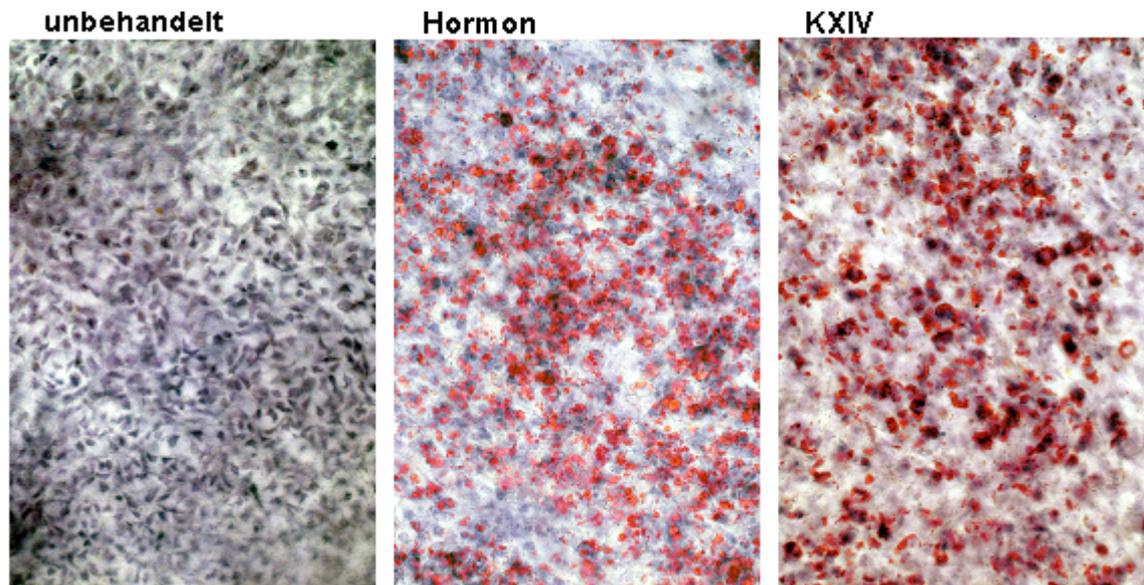


Abbildung 12: **Wirkung von plastikgebundenem KXIV auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen.** Die Zellkultureinsätze einer 24-Loch-Platte enthielten 3 µg plastikgebundenes KXIV oder blieben unbehandelt. In jeden Einsatz wurden 3T3-L1-Zellen (5×10^3) in 100 µl Medium A eingesetzt. Hormonbehandlung und Auswertung erfolgte wie in Abbildung 11 beschrieben. Dargestellt sind repräsentative Bilder von Tag 9 für je 8 Fotos aus jeweils zwei Einzelkulturen bei 20facher Vergrößerung.

Unbehandelte Zellen zeigten keinerlei Veränderung ihrer Morphologie. Die Zellen bildeten einen homogenen Rasen spindelförmiger Zellen ohne Einlagerung von Fetttröpfchen. Hormonbehandelte Zellen wurden rundlich und lagerten intrazytoplasmatisch rot anfärbbare Fetttröpfchen ein. Sie differenzierten also zu Adipozyten.

Unter Zugabe des plastikgebundenen KXIV zeigten die 3T3-L1-Zellen nach Ablauf der 11 Tage ebenfalls eine Abrundung und Einlagerung von rot anfärbbaren intrazytoplasmatisch lokalisierten Triglyceriden. Die Anzahl von Zellen mit eingelagerten Fetttröpfchen war jedoch deutlich geringer als bei der parallel mitgeführten Hormonstimulation. Es bildeten sich vielmehr Inseln von differenzierten Zellen neben Flächen von morphologisch unveränderten Zellen.

Die nachfolgenden Versuche sollten zeigen, ob das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ ebenfalls Triglycerideinlagerung induziert. Rekombinante GST wurde als Kontrollprotein mitgeführt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse aus einem von drei gleichartigen Versuchen.

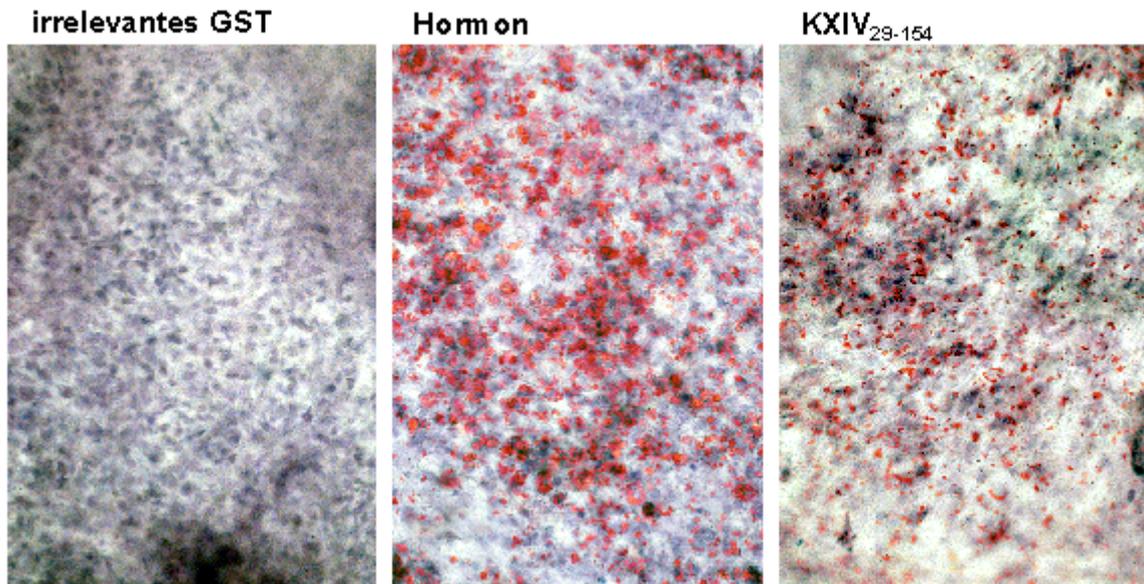


Abbildung 13: **Wirkung von gelöstem KXIV₂₉₋₁₅₄ auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen.** 3T3-L1-Zellen (5×10^3) wurden in 100 μ l Medium A in die Einsätze einer 24-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. Zu ausgewählten Kulturen wurde 3 μ g KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. GST gelöst zugegeben. Die Inkubation, Hormonbehandlung und Färbung erfolgte wie in Abbildung 11 beschrieben. Dargestellt sind repräsentative Bilder bei 20facher Vergrößerung für je 8 Fotos aus jeweils zwei Einzelkulturen.

In den Ansätzen mit irrelevanter GST war die Zellmorphologie unverändert. Der Zellrasen blieb homogen und die Einzelzellen spindelförmig, ohne intrazelluläre Fetttropfcheneinlagerung. Sie entsprachen so der Kontrolle mit unbehandelten Zellen. Hormonstimulierte 3T3-L1-Zellen zeigten die für die Differenzierung typische Einlagerung großer perinukleärer Fetttropfchen.

Zellen, die mit KXIV₂₉₋₁₅₄ inkubiert wurden zeigten ebenfalls eine intrazytoplasmatische Ablagerung von Fetttropfchen. Dabei entrundeten die Zellen und wurden größer. Die Einlagerung der Triglyceride war homogen, allerdings deutlich feintröpfiger als unter den Bedingungen mit Hormonstimulation.

3.1.5 Nachweis der Differenzierung über die Expression von GLUT4

Neben der Einlagerung von Fetttropfchen war auch die Expression des Glukosetransporters GLUT4 ein Nachweis für differenzierte Adipozyten. Deshalb sollte in folgenden Versuchen überprüft werden, ob KXIV und sein Fragment diesen Prozess bei der Zelllinie 3T3-L1 induzieren kann. Als Positivkontrolle wurde wiederum der Hormoncocktail aus Insulin, DEX und MIX mitgeführt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches.

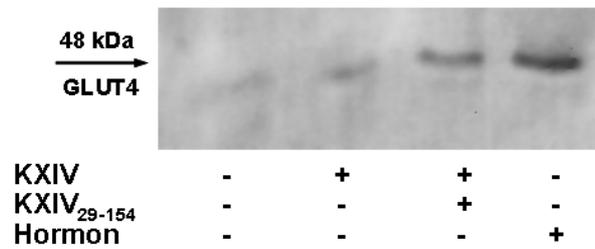


Abbildung 14: **Wirkung von KXIV und seinem Fragment auf die Expression von GLUT4 bei 3T3-L1-Zellen.** Löcher einer 6-Loch-Platte enthielten 80 µg plastikgebundenes KXIV oder blieben unbehandelt. 3T3-L1-Zellen (1×10^6) wurden in 2 ml Medium A bzw. dem Hormoncocktail aus Insulin, DEX und MIX ausgesät. KXIV₂₉₋₁₅₄ (14 µg) wurde gelöst zu den Zellen gegeben. Nach 5 Tagen wurde die zytosolische Zellfraktion isoliert. Mit Hilfe eines GLUT4-spezifischen Western-blot wurde das GLUT4-Protein dargestellt.

Bei unbehandelten 3T3-L1-Zellen konnte keine spezifische GLUT4-Bande nachgewiesen werden. Die als Positivkontrolle mitgeführten hormonbehandelten Zellen zeigten hingegen nach Inkubation mit dem GLUT4-spezifischen Antikörper eine deutliche Bande im Bereich von 48 kDa, dem Molekulargewichtsbereich des Glukosetransporters. Somit konnten diese Zellen als differenzierte Adipozyten betrachtet werden.

Zellen auf dem plastikgebundenen Gesamtmolekül KXIV zeigten allenfalls eine schwache GLUT4-Bande, so dass nicht sicher von einer Differenzierung zu Adipozyten ausgegangen werden konnte.

Gab man allerdings zu den 3T3-L1-Zellen das Gesamtmolekül KXIV oder das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ so zeigte sich im Molekulargewichtsbereich von 48 kDa eine deutliche Bande. Somit konnte auch hier der GLUT4-Transporter nachgewiesen werden.

3.2 Proliferation von U937 mit KXIV, KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper

3.2.1 KXIV und Modifikation der Kulturbedingungen

Voruntersuchungen zeigten, dass die Bedingungen für die optimale, synchrone Proliferation von U937-Zellen nicht direkt aus den Erfahrungen mit adhären, fibroblastären Zellen übernommen werden konnten. Neben dem Entzug von Wachstumsfaktoren wurde deshalb zusätzlich die Zellzahl und Inkubationsdauer variiert bzw. Zellsynchronisation durch Kältebehandlung erprobt. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse eines von je zwei analog durchgeführten Versuchen.

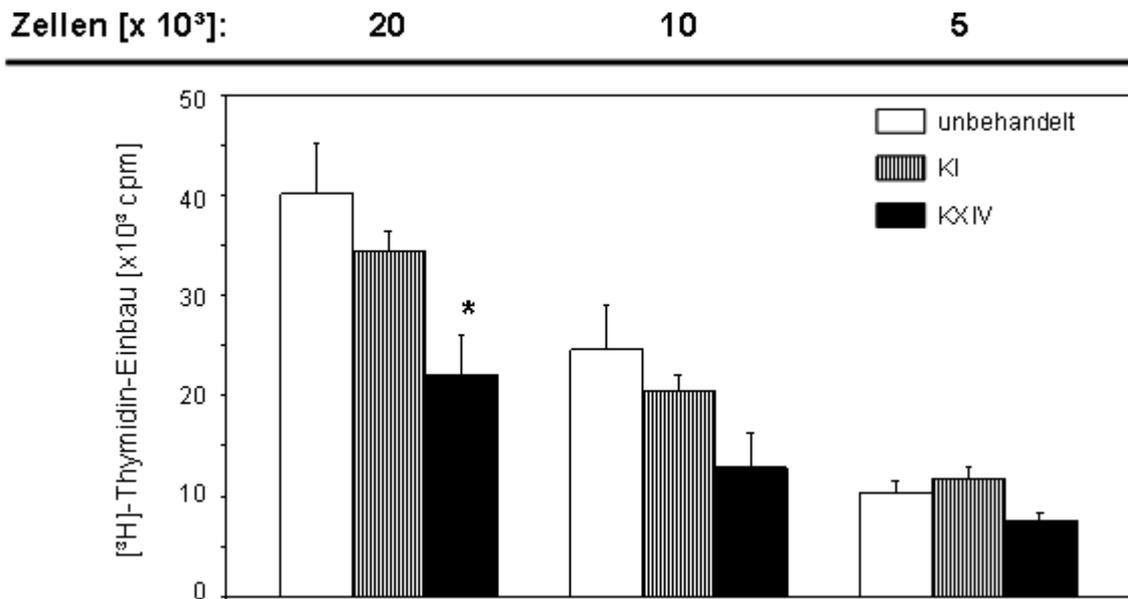


Abbildung 15: **Wirkung von plastikgebundenem KXIV unter Kurzzeitbedingungen auf die Proliferation bei U937-Zellen.** U937-Zellen wurden 2 Stunden bei 4°C in Reduktionsmedium S mit Zusatz von 0,5% (v/v) FKS inkubiert, bevor sie in unterschiedlicher Ausgangszellzahl in 100 µl Volumen in die Löcher der 96-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt wurden. Diese enthielten 3 µg plastikgebundenes KXIV bzw. KI oder waren unbehandelt. Die Platte wurde für 24 Stunden inkubiert. Während der letzten 4 Stunden enthielt jede Kultur 0,5 µCi [^3H]-Thymidin. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelkulturen. * $p \leq 0,05$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

Die Proliferation verringerte sich in den Ansätzen ohne Kollagen sowie mit KI mit sinkender Zellzahl. Der maximale [^3H]-Thymidin-Einbau lag bei einer Zellzahl von 20×10^3 Zellen bei etwa 40×10^3 cpm und reduzierte sich in den Kulturen mit 5×10^3 Zellen um den Faktor 3,9. Die unbehandelten Einzelkulturen unterschieden sich nicht signifikant von den Ansätzen mit plastikgebundenem KI.

Plastikgebundenes KXIV führte unter diesen Kurzzeitbedingungen zu einer Senkung der Proliferationsrate um 45%. Lag die Ausgangszellzahl unter 10×10^3 Zellen verschwand der Effekt vor dem Hintergrund einer insgesamt niedrigen DNS-Neusynthese.

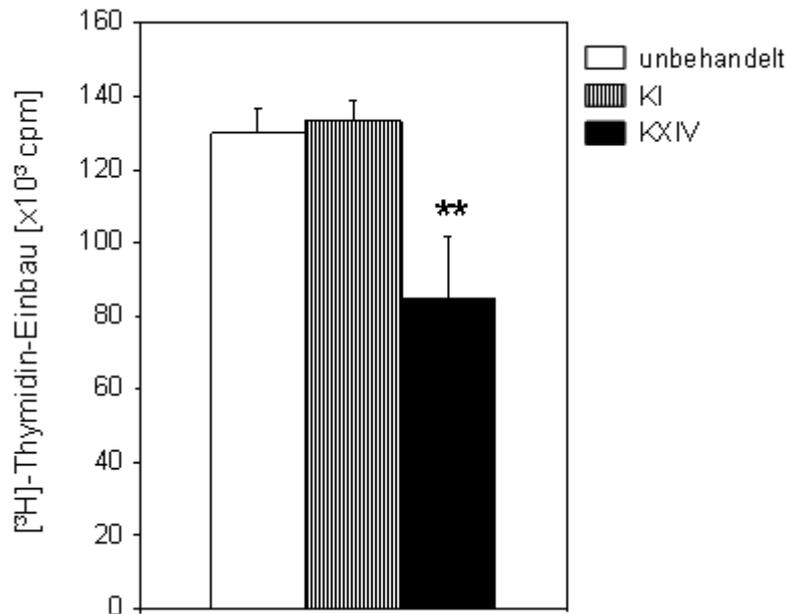


Abbildung 16: **Wirkung von plastikgebundenem KXIV unter Langzeitbedingungen auf die Proliferation bei U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^3) wurden in 200 μ l Reduktionsmedium S mit Zusatz von 2% (v/v) FKS in die Löcher der 96-Loch-Zellkulturplatte, die 3 μ g plastikgebundenes KXIV bzw. KI enthielten oder unbehandelt waren, eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 5 Tage. In den letzten 18 Stunden enthielt jede Kultur 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils 6 Einzelkulturen. ** $p \leq 0,01$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

Unter Langzeitbedingungen lag die maximale Proliferation der unbehandelten U937-Zellen sowie der KI-behandelten Zellen vergleichbar um 130×10^3 cpm. Die Zugabe von KXIV reduzierte die Proliferation signifikant um etwa 35% bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ bezogen auf beide Kontrollen. Aufgrund dieser deutlichen, reproduzierbaren Reduktion der DNA-Neusynthese bei einem gleichzeitig insgesamt hohen Niveau des [³H]-Thymidin-Einbaus wurden für alle weitere Proliferationsversuche mit U937-Zellen die Langzeitbedingungen beibehalten.

3.2.2 Gelöstes und plastikgebundenes Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄

In den folgenden Versuchen wurde erprobt, ob die antiproliferativen Effekte von KXIV auf U937-Zellen mit dem Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ reproduziert werden können. Das Fragment wurde dabei sowohl plastikgebunden, als auch gelöst zu den Zellen gegeben. Abbildung 17 zeigt repräsentativ das Ergebnis aus einem von drei gleichartigen Versuchen.

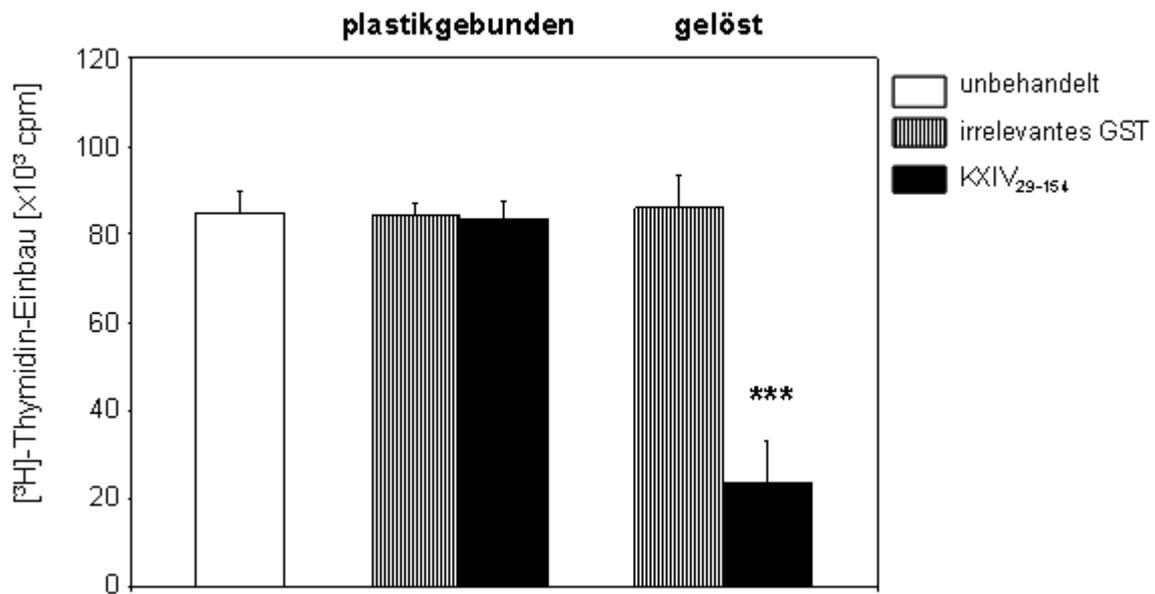


Abbildung 17: **Wirkung des Fragments KXIV₂₉₋₁₅₄ auf die Proliferation bei U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^3) wurden in 200 μ l Reduktionsmedium S mit 2% (v/v) FKS in die Löcher der 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. 3 μ g KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. GST wurden entweder auf die Plastikoberfläche gebunden oder gelöst zu den Zellen gegeben. Inkubation und Statistik erfolgte wie in Abbildung 16 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils 6 Einzelkulturen. *** $p \leq 0,001$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

Die maximale Proliferation von unbehandelten bzw. mit GST versetzten U937-Zellen lag bei etwa 85×10^3 cpm. Bei Zusatz von gelöstem KXIV₂₉₋₁₅₄ war der [³H]-Thymidin-Einbau mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ um 70% signifikant reduziert. Wurde KXIV₂₉₋₁₅₄ allerdings auf die Plastikoberfläche gebunden, blieb die Proliferation unbeeinflusst. Auch bei U937-Zellen wurde somit für weitere Versuche die gelöste Zugabe des Peptides gewählt.

3.2.3 CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8

Im nächsten Abschnitt wurde die Frage näher beleuchtet, welche Effekte auf das Proliferationsverhalten eine Aktivierung des CD44-Rezeptors mit sich bringt. Indirekt sollte damit die Frage beantwortet werden, ob die beobachteten antiproliferativen Effekte von KXIV und seinem Fragment CD44-vermittelt sind. Als Kontrolle des spezifisch am CD44-Rezeptor bindenden Antikörpers wurden unspezifische nicht-bindende Immunglobuline des gleichen Subtyps 1 (IgG1) mitgeführt.

Die Wirkung des CD44-spezifischen mAb auf das Proliferationsverhalten wurde unter Langzeitbedingungen erprobt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse stellvertretend für drei analog durchgeführte Versuche.

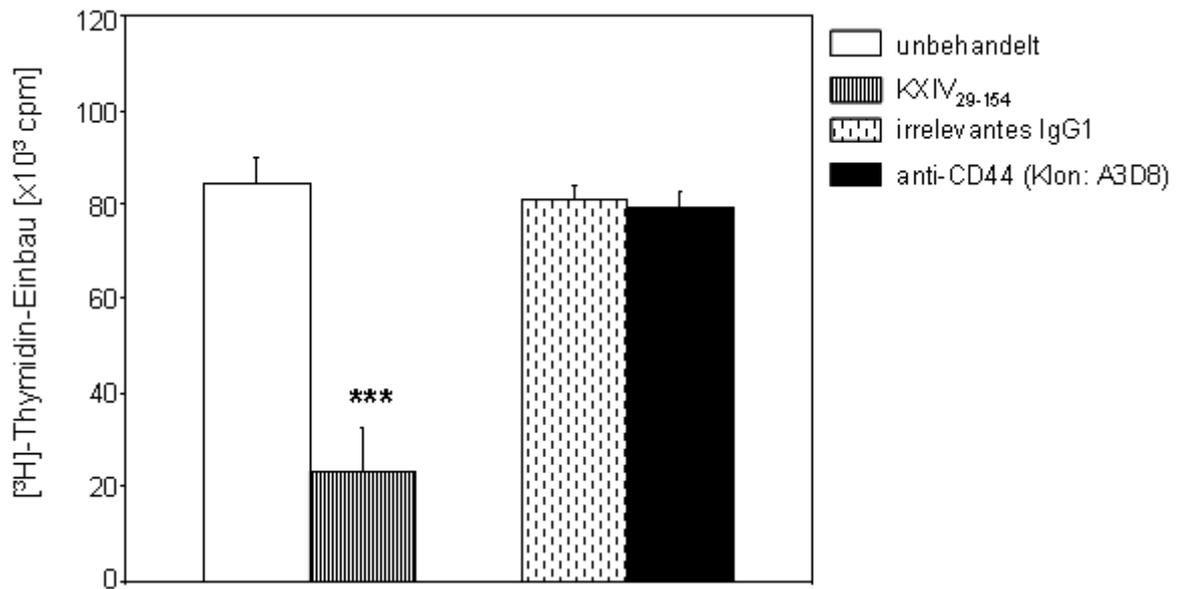


Abbildung 18: **Wirkung des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) auf die Proliferation bei U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^3) wurden in 200 μ l Reduktionsmedium S mit 2% (v/v) FKS in die 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Zu ausgewählten Kulturen wurden 5 μ g CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8), 5 μ g IgG1 bzw. 3 μ g KXIV₂₉₋₁₅₄ gelöst hinzugegeben. Inkubation und Statistik erfolgte wie in Abbildung 16 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils 6 Einzelkulturen. *** $p \leq 0,001$ bezieht sich auf unbehandelte Zellen.

Die Kontroll-Ansätze ohne Zusatz und mit IgG1 lagen mit ihrer [³H]-Thymidin-Einbaurate vergleichbar um 85×10^3 cpm. Die als Positivkontrolle mitgeführten U937-Zellen mit KXIV₂₉₋₁₅₄-Zusatz zeigten, wie bereits beschrieben, eine signifikante Reduktion der Proliferation um etwa 70%. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $p \leq 0,001$.

Der CD44-spezifische mAb (Klon A3D8) hingegen hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von U937-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der IgG1-Kontrolle.

3.2.4 Kombination von KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8

Das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ und der CD44-spezifische mAb (Klon A3D8) zeigten unterschiedliche Effekte auf das DNS-Syntheseverhalten. Unter der Annahme, dass sowohl KXIV als auch der CD44-spezifische mAb an CD44 binden, waren die bisher gewonnenen Ergebnisse Anlass zu weiteren Überlegungen und Versuchsreihen. Im Folgenden wurden deshalb beide Substanzen in Kombination zu U937-Zellen gegeben, um konkurrierende bzw. synergistische Effekte aufzudecken. Die Bedingungen der

vorherigen Versuche wurden eingehalten. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse eines Versuches, der repräsentativ für zwei analog durchgeführte Versuche ist.

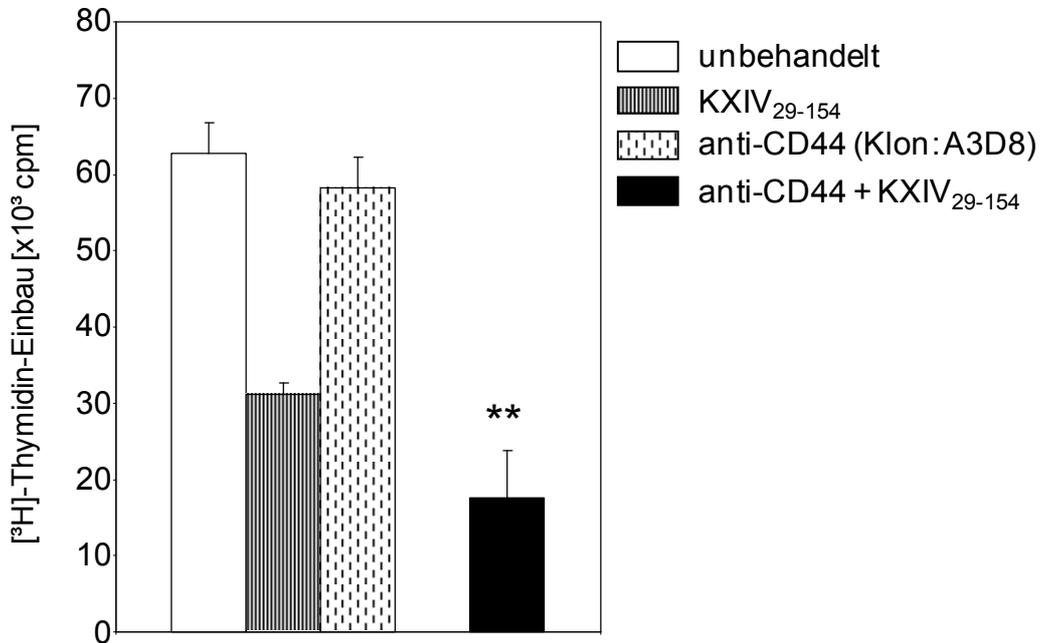


Abbildung 19: **Wirkung der Kombination aus KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem mAb (Klon A3D8) auf die Proliferation bei U937-Zellen.** Beschichtung, Inkubation und Statistik erfolgte wie in Abbildung 18 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils 6 Einzelkulturen. ** $p \leq 0,01$ bezieht sich auf die Kontrolle mit KXIV₂₉₋₁₅₄. *** $p \leq 0,001$ (hier nicht dargestellt) wurde sowohl zwischen KXIV₂₉₋₁₅₄ und den mitgeführten Kontrollen als auch zwischen der Kombination aus KXIV₂₉₋₁₅₄ und dem CD44-spezifischen mAb und den mitgeführten Kontrollen ermittelt.

Unbehandelte Zellen lagen mit ihrer [³H]-Thymidin-Einbaurrate in diesem Versuch bei etwa 63×10^3 cpm. U937-Zellen mit dem CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) zeigten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Unterschied des [³H]-Thymidin-Einbaus. Der Einfluss des KXIV-Fragmentes hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation um etwa 50%. Dabei lag die Irrtumswahrscheinlichkeiten bei $p \leq 0,001$ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle sowie auf die Ansätze mit CD44-spezifischem mAb.

Bei Kulturen mit KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem mAb war die Proliferation um 70% im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert. Ebenso verhielt es sich im Vergleich zu den Kulturen mit alleinigem Zusatz des CD44-spezifischen mAb. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $p \leq 0,001$ bezogen auf diese beiden Kontrollen. Des Weiteren zeigte die Kombination von KXIV-Fragment und CD44-spezifischem mAb eine signifikante

Reduktion der DNS-Neusynthese im Vergleich zur Kontrolle mit KXIV₂₉₋₁₅₄. Für beide durchgeführten Versuche wurde ein signifikanter Unterschied der DNS-Synthese zur KXIV₂₉₋₁₅₄-Kontrolle ermittelt.

3.3 Zellzahl von U937 mit KXIV, KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8

3.3.1 KXIV und KXIV₂₉₋₁₅₄

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Reduktion der Proliferation von U937-Zellen unter KXIV und KXIV₂₉₋₁₅₄ mit verringerter Zellzahl in Kultur einhergeht. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Zellzählung abgebildet. Die Daten zeigen einen repräsentativen aus vier gleichartigen Versuchen.

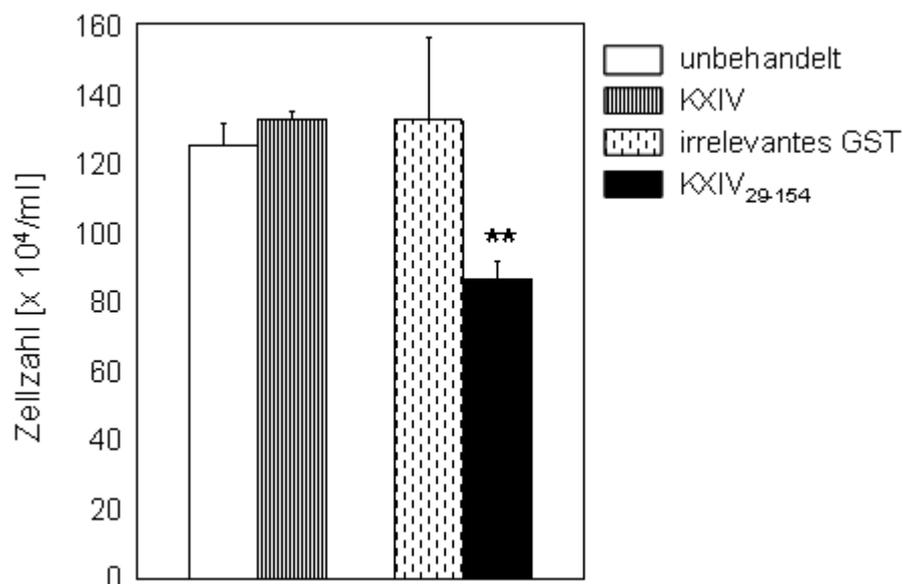


Abbildung 20: **Wirkung von KXIV und KXIV₂₉₋₁₅₄ auf Zahl von U937-Zellen in Kultur.** Löcher der 24-Loch-Zellkulturplatte enthielten 3 g plastikgebundenes KXIV oder waren unbehandelt. U937-Zellen (5×10^4) wurden in 2 ml Medium S eingesetzt. 3 μg KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. GST wurden gelöst zu den Zellen gegeben. Nach 6 Tagen Inkubation wurden Zellzahl und Vitalität mit Hilfe der Neubauerkammer bestimmt. Dargestellt sind MW und SD aus je drei Einzelwerten. $**p \leq 0,01$ bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Bei unbehandelten U937-Zellen bzw. Zellen mit Zusatz von irrelevanter GST betrug die Zellzahl etwa 125×10^4 Zellen pro Milliliter. Zellen auf plastikgebundenem KXIV zeigten keine signifikante Abweichung der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen. Bei Zusatz von gelöstem KXIV₂₉₋₁₅₄ zeigte sich die Zellzahl signifikant um etwa 30% im Vergleich zu den

Kontrollen reduziert. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug dabei $p \leq 0,01$. Die Vitalität war bei allen Kulturen, also auch bei den Ansätzen mit KXIV-Fragment, $>90\%$.

Zur Entscheidung, ob Apoptose an der Verringerung der Proliferation und der Zellzahl in den Kulturen mit dem KXIV₂₉₋₁₅₄ beteiligt ist, wurde die Vitalität mittels Vitalfärbung mit PI durchflusszytometrisch beurteilt. Abbildung 21 zeigt Originaldaten der durchflusszytometrischen Analyse. Diese sind repräsentativ für vier Versuche mit jeweils drei Einzelwerten.

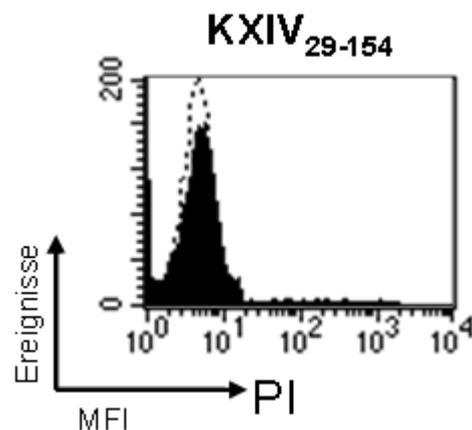


Abbildung 21: **Wirkung von KXIV₂₉₋₁₅₄ auf Vitalität von U937-Zellen.** U937-Zellen wurden wie in Abbildung 20 beschrieben inkubiert und mit KXIV₂₉₋₁₅₄-Fragment (schwarzer Bereich) bzw. Isotypkontrolle (gestrichelte Linie) versehen. An Tag 6 wurden die Zellen mit PI inkubiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Originaldaten von jeweils drei Einzelkulturen.

Im Vergleich zu der mitgeführten Isotypkontrolle lässt sich nach 6tägiger KXIV₂₉₋₁₅₄-Inkubation keine Veränderung erkennen. Beide Kulturen sind im unspezifischen Bereich PI-gefärbt und somit vital. Das bedeutet, dass weder Apoptose noch zytotoxische Effekte durch das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ vermittelt wurden. Die vorher beschriebene Zellzahlreduktion unter dem Einfluss von KXIV₂₉₋₁₅₄ muss somit aufgrund reduzierter mitotischer Aktivität erfolgt sein.

3.3.2 Zellzahl in Gegenwart von CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8

Parallel zur durchflusszytometrischen Bewertung der Vitalität wurde die Zellzahl unter Zusatz von CD44-spezifischem mAb bestimmt. Die Ergebnisse der Zellzählung werden in Abbildung 22 dargestellt und sind repräsentativ für vier gleichartig durchgeführte Versuche.

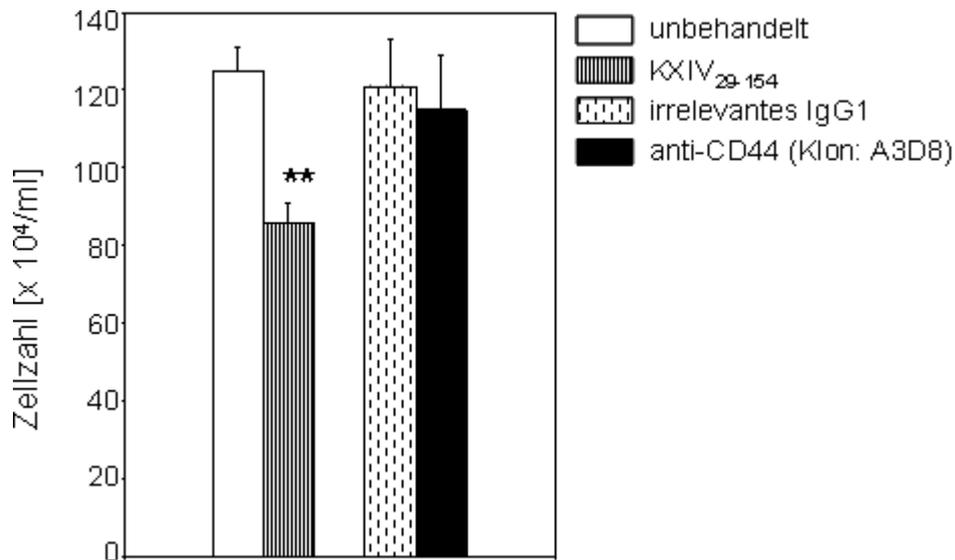


Abbildung 22: **Wirkung von CD44-spezifischem mAb (Klon A3D8) auf Zahl von U937-Zellen in Kultur.** U937-Zellen wurden wie in Abbildung 20 beschrieben inkubiert, mit KXIV-Fragment versehen und ausgewertet. 5 μg CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8) bzw. irrelevantes IgG1 wurden gelöst zu den Zellen gegeben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelwerten. ** $p \leq 0,01$ bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Für unbehandelte Zellen wurde eine Zellzahl von etwa 125×10^4 Zellen pro Milliliter ermittelt. Die als Positivkontrolle mitgeführten U937-Zellen mit KXIV₂₉₋₁₅₄-Zusatz zeigten, wie bereits beschrieben, eine Reduktion der Zellzahl um etwa 30%. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $p \leq 0,01$.

Sowohl für die Inkubation mit irrelevantem IgG1 als auch mit CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) ergab sich keine signifikante Abweichung der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.3.3 Kombination von KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8

Wie auch schon bei den Versuchen zur Proliferation sollen nun beide Substanzen in Kombination zu U937-Zellen gegeben werden, um mögliche antagonistische oder synergistische Effekte am CD44-Rezeptor zu untersuchen. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des einmalig durchgeführten Versuches.

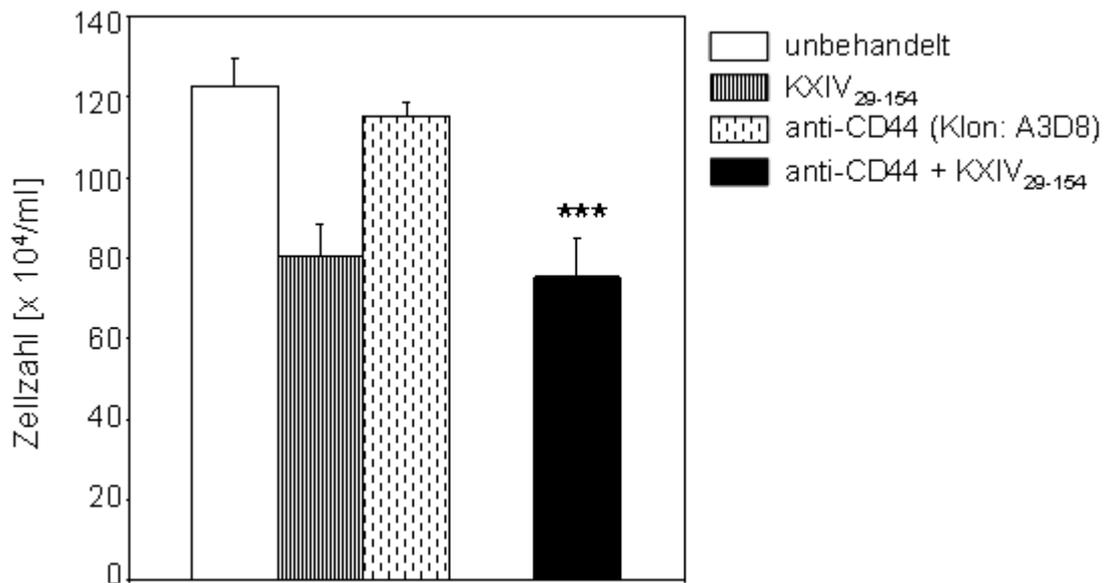


Abbildung 23: **Wirkung der Kombination von KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischem mAb (Klon A3D8) auf Zahl von U937-Zellen.** Beschichtung, Inkubation, Auswertung und Statistik erfolgten wie in Abbildung 20 und 22 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD von je drei Einzelwerten. *** $p \leq 0,001$ bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle und Kulturen mit Zusatz von CD44-spezifischem mAb (Klon A3D8).

Unbehandelte Zellen und Zellen nach Inkubation mit dem CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) zeigten keine signifikanten Unterschiede bei der Zellzahl. Die Konzentration lag bei etwa 123×10^4 Zellen pro Milliliter. Das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl um etwa 30%. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug $p \leq 0,001$ zur unbehandelten Kontrolle.

Die U937-Zellen, zu denen sowohl das KXIV₂₉₋₁₅₄ als auch der CD44-spezifische mAb (Klon A3D8) gegeben wurde, zeigten eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 30%. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird mit $p \leq 0,001$ angegeben und bezieht sich auf unbehandelte Zellen sowie Zellen mit Zusatz des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8). Im Vergleich zu Kulturen mit KXIV₂₉₋₁₅₄ gab es keinen Unterschied, anders als für die Proliferation über den [³H]-Thymidin-Einbau gezeigt (siehe Abbildung 19). Die Zellzahlreduktion muss folglich unter dem Einfluss von KXIV₂₉₋₁₅₄ erfolgt sein. Es konnten dabei weder hemmende noch synergistische Effekte beobachtet werden.

3.4 Expression von Oberflächenantigenen durch U937-Zellen

3.4.1 Aus der Standardkultur

Im Folgenden wurde der Differenzierungsprozess von U937-Zellen anhand der Expression von Oberflächenantigenen untersucht. Um den Effekt auf die Progenitorzellen

besser beurteilen zu können, wurde die Zellpopulation am Tag 0 hinsichtlich ihrer immunphänotypischen Eigenschaften durchflusszytometrisch charakterisiert. Tabelle 6 zeigt auf, welche Oberflächenantigene in der U937-Zellpopulation bereits exprimiert werden.

Tabelle 6: Charakterisierung der Population unbehandelter U937-Zellen hinsichtlich der Expression von Oberflächenantigenen U937-Zellen wurden mit den entsprechenden direkt oder indirekt konjugierten spezifischen mAb inkubiert und mit PI gegengefärbt. Die Bindung der Antikörper wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Bezogen auf den Oberflächenmarker wurden die Zellen dann als positiv gewertet, wenn mindestens 98% aller Zellen von der entsprechenden Isotypkontrolle unterschieden waren. Entsprechend der MFI nach der Inkubation mit einem spezifischen Antikörper der Isotypkontrolle, wurde diese Probe als negativ gewertet.

<i>Expression</i>	<i>Antigen</i>
positiv	CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD18, CD33, CD44, CD54, CD58, HLA-ABC
negativ	CD1a, CD14, CD15, CD16, CD32, CD64, CD80, CD82, CD83, CD86, CD127, CCR3, CCR5, CCR7, HLA-DR

Um die Bewertung der Versuche möglichst frei von Störeinflüssen zu halten, wurde parallel zu den Versuchsreihen das Verhalten von U937-Zellen und deren Rezeptordichte im Verlauf einer Standardkultur in Zellkulturflaschen betrachtet. Über einen Zeitraum von vier Tagen wurden Zellzahl und Expressionshöhe von CD11a bestimmt (Abbildung 24).

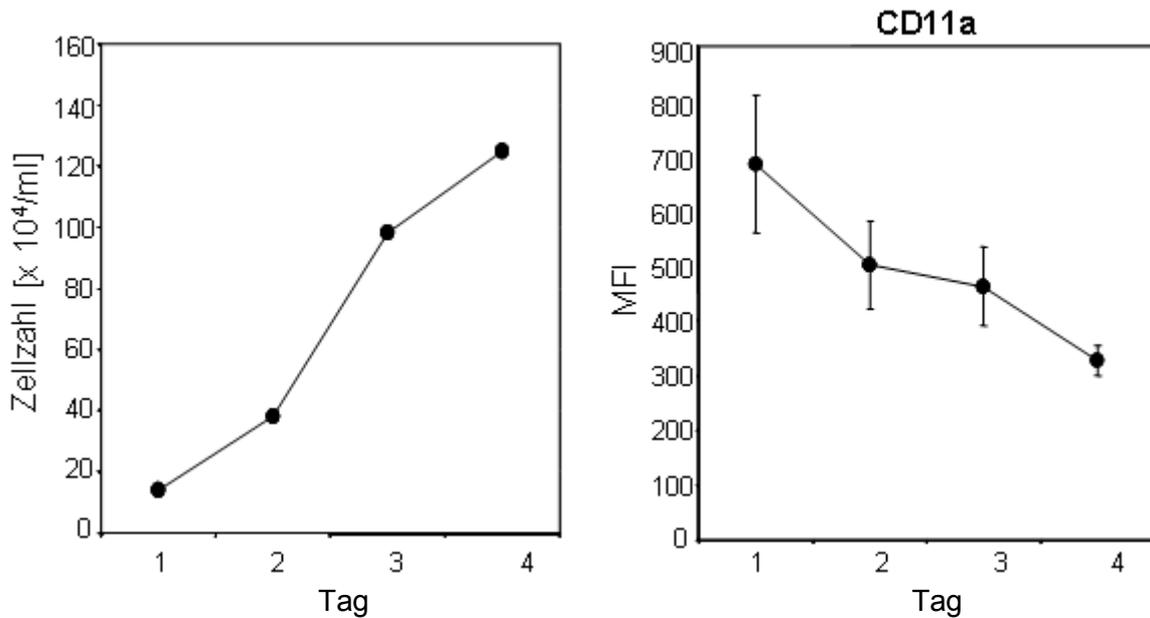


Abbildung 24: **Zellkonzentrationsabhängige Änderung der Expressionsrate von CD11a bei U937-Zellen.** Bei einer U937-Kultur wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen Zellkonzentration mit Hilfe der Neubauerkammer und Rezeptordichte von CD11a durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind MW und SD aus je drei Einzelkulturen.

In der Standardkultur war die Rezeptordichte auf den U937-Zellen für CD11a umgekehrt proportional zur Zelldichte und Inkubationsdauer. Als Konsequenz dieser Beobachtung wurden in den folgenden Versuchen nur Zellen miteinander verglichen, die unter gleichen Inkubationsbedingungen standen.

3.4.2 Wirkung von Phorbolestern

Retinoide und Phorbolster wirken differenzierend auf U937-Zellen und deshalb wurde mit PMA und ATRA geprüft, ob die in den Experimenten verwendeten U937-Zellen tatsächlich die Kapazität zur myeloischen Differenzierung hatten (Abbildung 25).

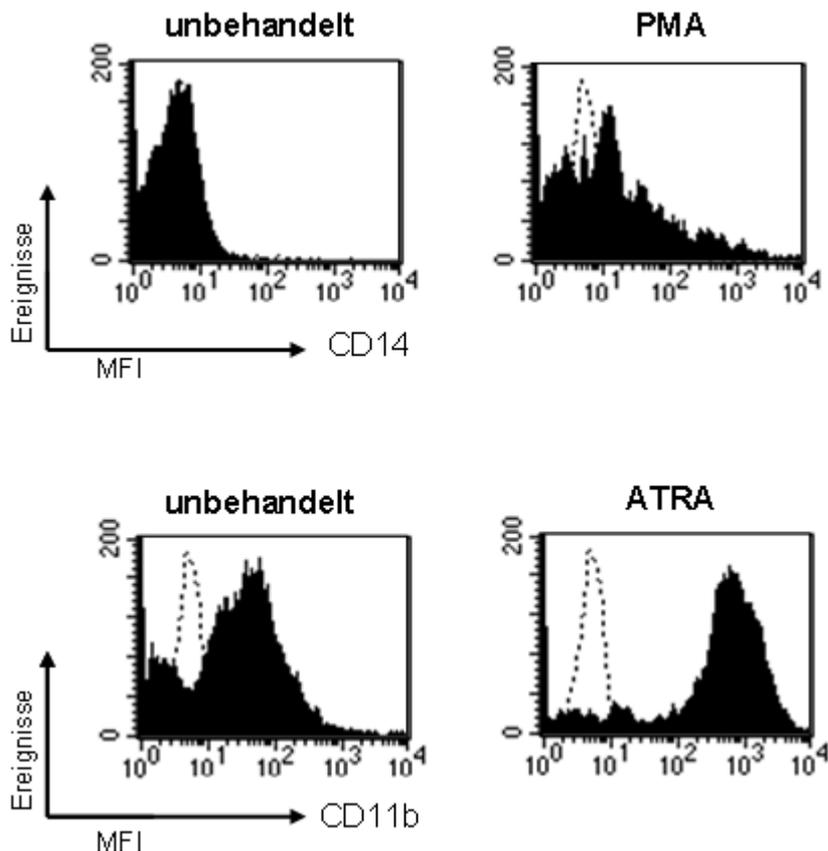


Abbildung 25: **Wirkung von ATRA und PMA auf Expression von CD14 und CD11b bei U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^4) wurden in 2 ml Medium S in 24-Loch-Zellkulturplatten eingesetzt und $0,3 \mu\text{g}$ ATRA bzw. 40 ng PMA wurde gelöst zu den Zellen gegeben. Am Tag 6 wurden die Oberflächenantigene durchflusszytometrisch bestimmt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Ansatz mit der Isotypkontrolle, der schwarze Bereich den mit dem spezifischen Antikörper. Dargestellt sind repräsentative Beispiele der Originaldaten von je drei Einzelkulturen.

Nach Behandlung mit PMA zeigten sich die U937-Zellen morphologisch deutlich verändert. Die sonst suspendierten U937-Zellen adhärten im mikroskopischen Bild an die Zellkulturoberfläche, wurden spindelförmig und bildeten pseudopodienartige Ausläufer aus. Diese adhären Zellen waren nur schwer aus ihrer Bindung zu lösen um sie durchflusszytometrisch zu untersuchen, jedoch wurde in der Zellkultur die Expression des spezifischen Monozytenmarkers CD14 nachgewiesen.

Ansätze mit ATRA zeigten im Vergleich dazu keine morphologischen Veränderungen. Jedoch erhöhte sich die Expression des Oberflächenantigens CD11b, eines weiteren Markers später myeloischer Differenzierung. Die U937-Zellen waren also prinzipiell zur monozytären Differenzierung in der Lage.

3.4.3 Wirkung von KXIV und KXIV₂₉₋₁₅₄

Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit KXIV und sein Fragment Differenzierung der myeloischen Zelllinie U937 induzieren kann. Dazu wird die Expression von Oberflächenantigenen genauer betrachtet.

In der Versuchsreihe mit dem plastikgebundenen Gesamtmolekül KXIV wurden 5×10^4 U937-Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml Medium S eingesetzt und 6 Tage inkubiert.

Unbehandelte U937-Zellen änderten nach 6tägiger Inkubation ihre Morphologie nicht, d.h. sie blieben suspendiert und exprimierten die in Tabelle 6 gezeigten Oberflächenantigene analog der Ausgangskultur. Zellen auf plastikgebundenem KXIV blieben ebenfalls in Suspension. Wie bei der unbehandelten Kontrolle konnte in drei weiteren durchgeführten Versuchen kein Unterschied hinsichtlich der Expression von Oberflächenantigenen durch das Gesamtmolekül KXIV ermittelt werden.

Als nächster Schritt wurde der Einfluss von gelöstem KXIV₂₉₋₁₅₄ auf die Differenzierung von U937-Zellen untersucht. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse repräsentativ für vier analog durchgeführte Versuche.

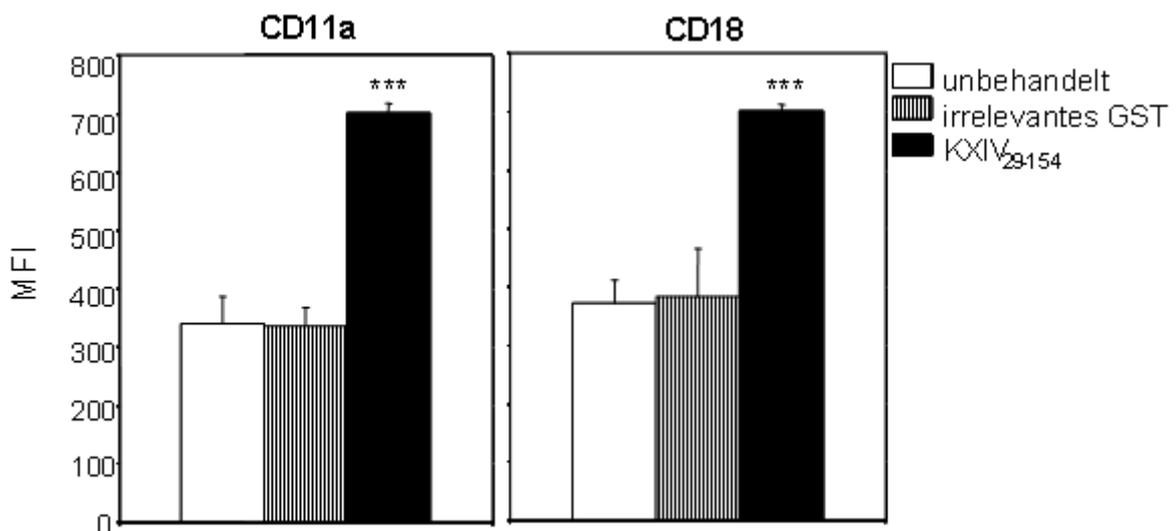


Abbildung 26: **Wirkung von KXIV₂₉₋₁₅₄ auf Expression von Oberflächenantigenen von U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^4) wurden in 2 ml Medium S in die Löcher der 24-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. 3 μ g KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. GST wurden gelöst hinzugegeben. Am Tag 6 wurden die Oberflächenantigene durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelwerten. *** $p \leq 0,001$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

Unbehandelte Zellen und Zellen nach Inkubation mit GST zeigten bei der Expression von Oberflächenantigenen vergleichbare Werte. Die immunphänotypischen Eigenschaften entsprachen der in Tabelle 6 dargestellten Ursprungspopulation.

Bei Zellen mit Zusatz von gelöstem KXIV₂₉₋₁₅₄ fiel eine signifikante Hochregulation der bereits exprimierten Oberflächenantigene CD11a und CD18 um den Faktor 2,1 bzw. 1,9 auf. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei $p \leq 0,001$. Die basale Expressionshöhe von unbehandelten Zellen lag dabei bei einem Wert von 340 bzw. 370 MFI. Bei allen anderen Oberflächenantigenen konnte keine Abweichung zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. U937-Zellen trugen also nach Behandlung mit KXIV₂₉₋₁₅₄ in höherer Dichte das Heterodimer CD11a/CD18 (LFA-1) aus der Gruppe der Integrine.

3.4.4 Wirkung von CD44-spezifischem monoklonalen Antikörper des Klons A3D8

Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob die Bindung an den CD44-Rezeptor durch den CD44-spezifischen mAb das Differenzierungsverhalten der monozytären Progenitorzelle U937 beeinflusst. Insbesondere soll auch hier untersucht werden, ob sich die Expressionshöhe der Oberflächenantigene ändert. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse repräsentativ für vier gleichartig durchgeführte Versuche.

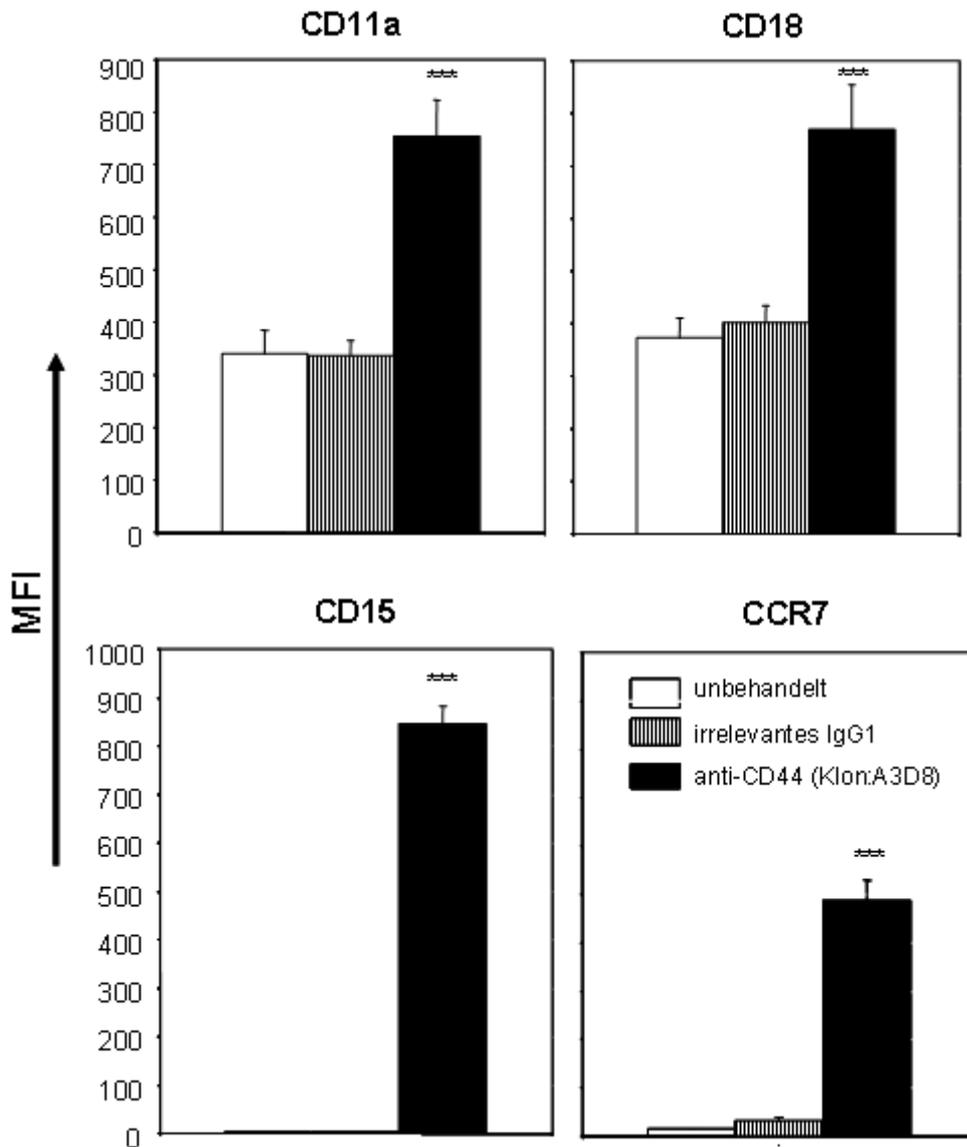


Abbildung 27: **Wirkung von CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) auf Expression von Oberflächenantigenen von U937-Zellen.** In die Löcher der 24-Loch-Zellkulturplatte wurden U937-Zellen (5×10^4) in 2 ml Medium S eingesetzt. 5 μ g des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) bzw. IgG1 wurden gelöst hinzugegeben. Inkubation, Auswertung und Statistik erfolgten wie in Abbildung 26 geschildert. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelwerten. *** $p < 0,001$ bezieht sich auf beide Kontrollen.

Bei U937-Zellen, die mit irrelevantem Maus-IgG1 inkubiert wurden, konnte kein spezifischer Unterschied zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Bei beiden Behandlungsarten exprimierten die Zellen die bereits in Tabelle 6 genannten Oberflächenantigene in vergleichbarer Quantität. Auch bei Zusatz des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) änderten viele der getesteten Oberflächenantigene (siehe Tabelle 6) ihre Expressionshöhe im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht.

Jedoch konnte für vier antigene Strukturen ein signifikanter Anstieg der Rezeptordichte gemessen werden. Auffällig waren das Integrin CD11a/CD18, das Carbohydrat-Epitop CD15 und der Chemokinrezeptor CCR7.

Bei unbehandelten Zellen wurde für die Rezeptordichte von CD11a und CD18 wieder ein Wert von etwa 340 bzw. 372 MFI ermittelt (siehe Abbildung 26). Nach Inkubation mit dem CD44-spezifischen mAb war Expressionshöhe des Integrins jeweils um den Faktor 2 erhöht. CD15 und CCR7 waren in der Ausgangspopulation und nach Ablauf der 6tägigen Inkubation bei unbehandelten Zellen gar nicht exprimiert. Durch die Zugabe des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) kam es zu einem starken Anstieg der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Für das CD15-Antigen wurde dabei ein Wert von etwa 847 MFI, für den Rezeptor CCR7 von 488 MFI ermittelt.

3.4.5 Vergleich: CD44-spezifische monoklonale Antikörper der Klone A3D8 und IM7.8.1

Ein weiterer CD44-spezifischer mAb (Klon IM7.8.1) wurde hinsichtlich seiner Wirkung auf U937-Zellen einmalig getestet. Es wurde dabei analog den oben beschriebenen Versuchen verfahren. Der mAb des Klons A3D8 wurde als Positivkontrolle eines aktivierenden Effektes am CD44-Rezeptor mitgeführt (Abbildung 28).

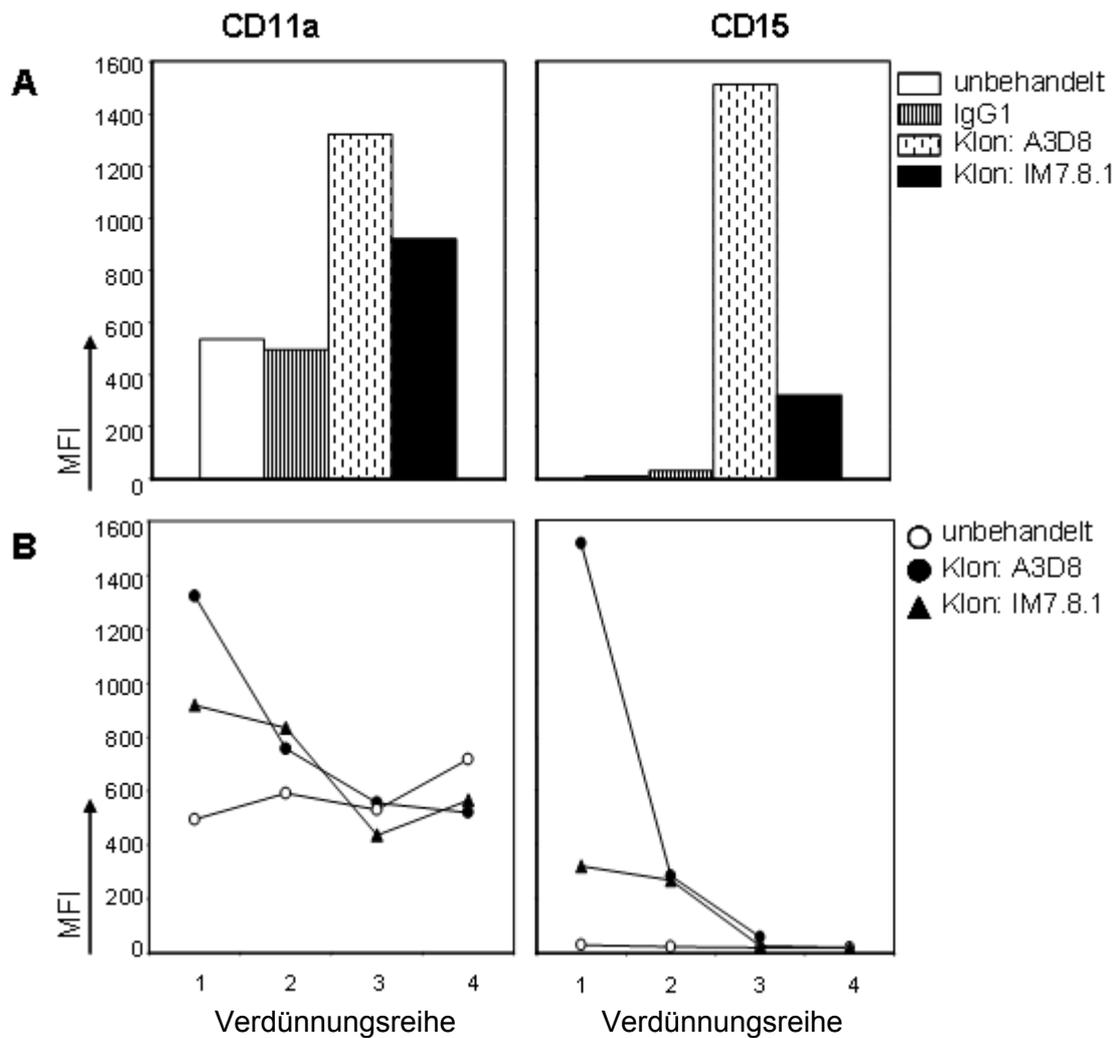


Abbildung 28: **Wirkung CD44-spezifischer mAbs (Klone A3D8 und IM7.8.1) auf Expression von Oberflächenantigenen von U937-Zellen im Vergleich.** U937-Zellen (5×10^4) wurden in 2 ml Medium S in die Löcher der 24-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. Die CD44-spezifischen mAbs (Klone A3D8 bzw. IM7.8.1) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst zugegeben. (A) In jedem Loch wurden je 5 μg mAb eingesetzt. (B) Verdünnungsreihe der verschiedenen mAb in folgenden Konzentrationen: 1 – 5 μg , 2 – 500 ng, 3 – 50 ng, 4 – 5 ng. An Tag 6 erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Dargestellt sind Einzelwerte der erhaltenen MFI.

Unter Bedingungen maximaler Antikörperkonzentrationen (Abbildung 28A) exprimierten unbehandelte Zellen CD11a in einem Bereich von 536 MFI. CD15 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Der mAb des Klons A3D8 steigerte die Expressionshöhe von CD11a um den Faktor 2,5. Die Hochregulation der Rezeptordichte von CD15 erlangte einen Wert von 1.512 MFI.

Beim mAb des Klons IM7.8.1 wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen eine Erhöhung der CD11a-Dichte um den Faktor 1,7 und eine Hochregulation der CD15-Expression auf

einen Wert von 321 MFI gemessen. In Bezug auf den Klon A3D8 entsprach das etwa 20% der Expression.

Stellte man nun die mAb beider Klone im direkten Vergleich gegenüber, fällt auf, dass sie sich für beide Oberflächenantigene synchron verhalten. Sie bewirken eine Hochregulation von CD11a und CD15. Was die Ausprägung dieser Steigerung jedoch angeht, zeigte sich der mAb des zweiten Klons IM7.8.1, insbesondere in Bezug auf CD15, weit weniger potent als der Klon A3D8.

Die Effekte beider Antikörper auf CD11a und CD15 waren konzentrationsabhängig (Abbildung 28B). Beim mAb des Klons IM7.8.1 konnte bereits bei 500 ng mAb kein Unterschied zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Für einen vergleichbaren Effekt auf U937-Zellen konnte der mAb des Klons A3D8 etwa 1:100 verdünnt werden. Auffällig war, dass CD11a und CD15 simultan herunterreguliert wurden.

3.4.6 Vergleich: KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8

Im Folgenden sollen die Einflüsse von KXIV₂₉₋₁₅₄ und dem CD44-spezifischen mAb auf die Expression von Oberflächenantigenen einander gegenübergestellt werden. Abbildung 29 zeigt Originaldaten aus einem von vier gleichartig durchgeführten Versuchen.

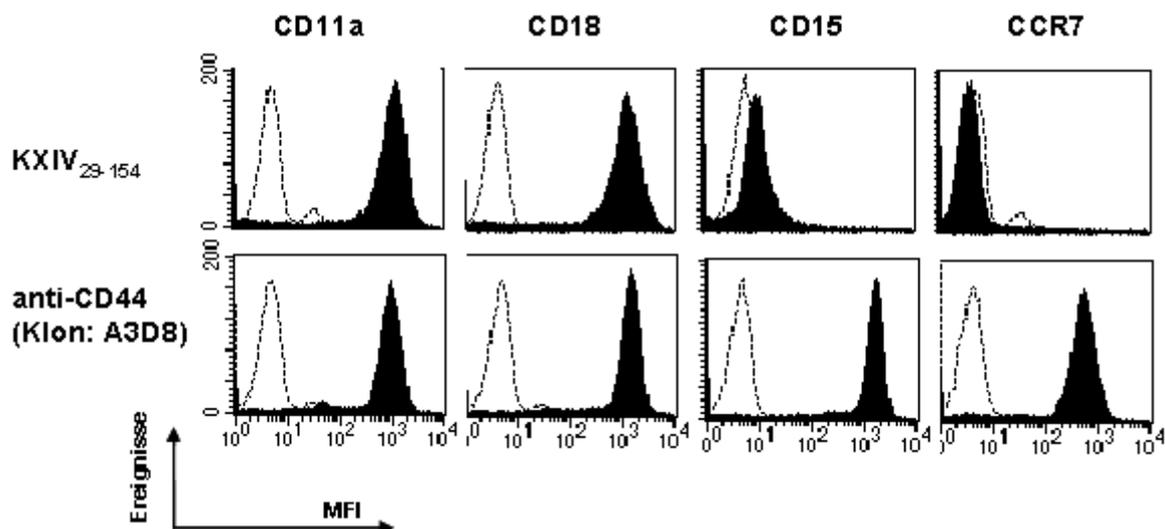


Abbildung 29: **Wirkung von KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8) auf die Expression von Oberflächenantigenen von U937-Zellen im Vergleich.** Inkubation und Auswertung erfolgten wie in Abbildung 26 und 27 beschrieben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Ansatz mit der Isotypkontrolle, der schwarze Bereich den mit dem spezifischen Antikörper. Dargestellt sind repräsentative Beispiele der Originaldaten von je drei Einzelkulturen.

Sowohl das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ als auch der CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) regulierten die Expression des Integrins CD11a/CD18 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe auch Abbildung 26 und 27) um den Faktor 2 hoch. Somit zeigten beide Moleküle in Bezug auf das Integrin eine Steigerung der Expressionshöhe auf vergleichbarem Niveau.

Während KXIV₂₉₋₁₅₄ keinen Einfluss auf das Carbohydrat-Epitop CD15 und den Chemokinrezeptor CCR7 zeigte, führte der CD44-spezifische mAb zu einem fulminanten Anstieg der Rezeptordichte dieser beiden Oberflächenantigene. Die Zelllinie U937 wurde also durch mAb-vermittelte Aktivierung des CD44-Rezeptors mit zwei weiteren Eigenschaften immunkompetenter Zellen ausgestattet.

3.4.7 Kombination: KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper des Klons A3D8

Wie der Vergleich der Effekte von KXIV₂₉₋₁₅₄ mit dem spezifischen CD44-spezifischen mAb zeigte, konnten sowohl Parallelen als auch Unterschiede nachgewiesen werden. Durch die gegenläufigen Effekte auf den CD15 Rezeptor erschien interessant, welche Auswirkungen die Kombination des KXIV-Fragmentes, als potentieller CD44-Ligand, mit dem CD44-spezifischen mAb hinsichtlich der Expression des Oberflächenantigens CD15 mit sich bringt. Insbesondere antagonistische oder synergistische Effekte sollten untersucht werden. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse des einmalig durchgeführten Versuches.

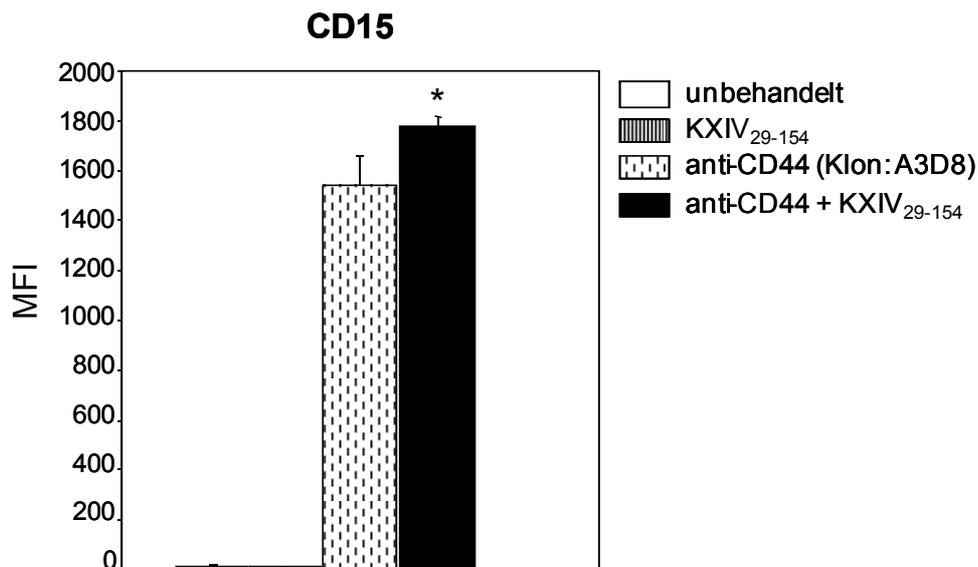


Abbildung 30: **Wirkung der Kombination aus KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifischer mAb (Klon A3D8) auf die Expression von CD15 bei U937-Zellen.** U937-Zellen (5×10^4)

wurden in 2 ml Medium S in die Löcher der 24-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. 3 µg KXIV₂₉₋₁₅₄ bzw. 5 µg CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) wurden einzeln oder in Kombination gelöst hinzugegeben. Inkubation, Auswertung und Statistik erfolgte wie in Abbildung 26 beschrieben. Dargestellt sind MW und SD aus jeweils drei Einzelwerten. * p≤0,05 bezieht sich auf die Kontrolle mit isoliert zugesetztem CD44-spezifischem mAb.

Auf unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit dem Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ war das Oberflächenantigen CD15 nicht nachweisbar. Die U937-Zellen nach Inkubation mit dem CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) hingegen exprimierten das Carbohydratepitop auf ihrer Oberfläche. Der Wert lag dabei um 1541 MFI. In Kulturen, in denen das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ mit dem CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) kombiniert wurde, kam es ebenfalls zu einer deutlichen Expression von CD15. Im Vergleich zur isolierten Zugabe des CD44-spezifischen mAb wurde sogar eine signifikante Zunahme der Rezeptordichte um 15% ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug p≤0,05. Somit konnte durch die Kombination beider Moleküle ein synergistischer Effekt auf die Expression des CD15 Antigens nachgewiesen werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von KXIV auf die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler und myeloischer Zelllinien untersucht. Dabei wurde sowohl die Wirkung des Gesamtmoleküls als auch die des aminoterminalen Fragmentes KXIV₂₉₋₁₅₄, das eine Adhäsionsdomäne für Proteoglykane und Zellen enthält, betrachtet (Ehnis, Dieterich et al. 1997; Ehnis, Dieterich et al. 1998).

Um potentielle Induktoren zellulärer Quieszenz und Differenzierung zu identifizieren, war es sinnvoll Proliferations- und Differenzierungsmarker zu bestimmen. Zellen verlassen den Zellzyklus, werden quieszent, wenn sie das unspezialisierte Stadium verlassen und durch terminale Differenzierung spezialisierte Formen und Funktionen übernehmen. Dieser Mechanismus ist ein physiologischer Vorgang, der wichtig für embryonale Entwicklung, Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen und Tumorsuppression ist (Coffman and Studzinski 1999; Blagosklonny 2003; Loercher, Tank et al. 2005).

Des Weiteren wurde die KXIV-induzierte Signaltransduktion mit ihren Endpunkten Proliferation und Differenzierung insbesondere auch Rezeptor-orientiert untersucht. CD44 wurde als potentieller Rezeptor von KXIV bestätigt (Ehnis, Dieterich et al. 1996), weshalb in dieser Arbeit die Veränderungen innerhalb einer Zellpopulation nach Inkubation mit KXIV und seines Fragmentes KXIV₂₉₋₁₅₄ im Vergleich zu den CD44-aktivierenden mAbs der Klone A3D8 und IM7.8.1 untersucht wurde (Zheng, Katoh et al. 1995; Gadhoom, Delaunay et al. 2004).

Für den hier ausgewählten mAb des Klons A3D8 konnte bereits gezeigt werden, dass via CD44-vermittelter Aktivierung bei malignen Zellpopulationen, wie Leukämiezellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, neben anderen Prozessen terminale Differenzierung mit Ausreifung von funktionsfähigen myeloischen Zellen, insbesondere Monozyten, induziert werden kann. Bei etablierten myeloischen Leukämiezelllinien wurden darüber hinaus antiproliferative und auch proapoptotische Effekte nachgewiesen (Charrad, Li et al. 1999; Charrad, Gadhoom et al. 2002).

Den theoretischen Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten Beobachtungen, nach denen KXIV nur in hochdifferenziertem Gewebe gebildet wird und *in vitro* Quieszenz bei mesenchymalen Zellen wie Hautfibroblasten, hepatischen Sternzellen und Fibroblasten der Maus induziert (Ricard-Blum, Dublet et al. 2000; Rühl, Wagner et al. 2000; Rühl, Erben et al. 2005). Darauf aufbauend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Gesamtmolekül KXIV sowohl bei den präadipozytären 3T3-L1-Zellen aus der Maus als auch bei den humanen malignen myeloischen U937-Zellen die DNS-Synthese *in vitro* signifikant um 30-45% reduziert (siehe Abbildungen 7, 8, 15 und 16). Der im

Kulturmedium enthaltene Serumgehalt lag bei 10% (v/v) für 3T3-L1 bzw. 2% (v/v) für U937-Zellen. Bei Inkubation mit dem Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ betrug die Reduktion der Proliferation *in vitro* bei vergleichbaren Kulturbedingungen 40-70% (siehe Abbildungen 9 und 17). Insbesondere bei U937-Zellen übertraf die Adhäsionsdomäne dabei den antiproliferativen Effekt des Gesamtmoleküls. Zudem konnte eine Reduktion der mitotischen Aktivität der U937-Zellpopulation nachgewiesen werden. Diese Wirkung des Fragmentes war robust, da die Zellzahl auch bei einem Serumgehalt von 10% (v/v), der optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen aus der Kultur sicher stellt, nach Zugabe des Fragmentes KXIV₂₉₋₁₅₄ signifikant um 30% reduziert war (siehe Abbildung 20). Der mikroskopische, enzymatische und durchflusszytometrische Nachweis vitaler Zellen (siehe Abbildungen 10 und 21) beider Zelllinien zeigte, dass die Vitalität der Zellen und die Apoptoserate nicht beeinflusst wurden. Apoptotische und nekrotische Prozesse können als wesentliche Ursache für den antiproliferativen Effekt von KXIV und seines aminoterminalen Fragments ausgeschlossen werden. Vielmehr muss ein Zellzyklusarrest am G1-Restriktionspunkt angenommen werden.

Die murine präadipozytäre Zelllinie 3T3-L1 gilt als etabliertes Modell für die Adipogenese und damit für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Die Bildung von intrazellulären Fetttröpfchen (siehe Abbildung 11) und die Hochregulation von GLUT4 sind Indikatoren für eine terminale Differenzierung hin zu Adipozyten. Eine Kombination der Hormone Insulin, DEX und MIX initiiert eine Signaltransduktionskaskade und Fetttröpfchen werden gebildet (Ntambi and Young-Cheul 2000; Furuyashiki, Nagayasu et al. 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das Gesamtmolekül KXIV als auch das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ bei 3T3-L1-Zellen in ähnlichem Maße wie der Hormoncocktail auf die Bildung von intrazellulären Fetttröpfchen (siehe Abbildungen 12 und 13) und die Hochregulation von GLUT4 (siehe Abbildung 14) wirkt. Obwohl die Intensität unter dem Niveau der Hormonkontrolle liegt, initiiert das Matrixmolekül KXIV bzw. das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ alleine Mechanismen, die letztlich zur Differenzierung der Zellen führt. Als mögliche Ursachen für Unterschiede zur Hormonstimulierung kommen Proteinverluste während der Beschichtung des Kollagens auf die Zellkulturplatte bzw. zu niedrige Konzentrationen von KXIV und seinem Fragment aber auch eine unzureichende Stimulierung von Signaltransduktionswegen in Frage. Durch den Hormoncocktail werden sowohl der Insulinrezeptor IGF-1, der Glukokortikoidrezeptor als auch die Signalkette der cAMP-abhängigen Proteinkinase aktiviert. Via C/EBP β und C/EBP δ werden die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBP α hochreguliert, die letztendlich die terminale Differenzierung durch Induktion von Adipozyten-spezifischen Proteinen und Enzymen einleiten (Ntambi and Young-Cheul 2000). Für CD44 hingegen ist – zum Beispiel nach

Bindung von HA – bekannt, dass eine Dephosphorylierung des am zytoplasmatischen Ende gebundenen Protein Merlin eine Hemmung der Signaltransduktionskaskade via Ras initiiert, welche zu einer Reduktion der Proliferation führen kann und somit erste Voraussetzungen für die Induktion von Differenzierung liefert. D.h. die durch die Hormone angesteuerten Signaltransduktionswege sind nicht identisch mit denen, die durch CD44 reguliert werden (Ponta, Sherman et al. 2003). Eine Hochregulation von PPAR γ und C/EBP α mittels KXIV und seinem Fragment muss somit auf indirektem Wege erfolgt sein, da eine terminale Differenzierung sonst nicht möglich wäre. Für das Gesamtmolekül KXIV kann ein Zusammenhang zwischen der inselhaften Ansammlung von differenzierten Zellen und der Kollagenverteilung auf der Zellkulturplatte vermutet werden. Insbesondere, da bei Inkubation mit dem rekombinanten Fragment sich ein homogener Zellrasen mit feintröpfiger Fetttröpfcheneinlagerung zeigte. Weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass infolgedessen die Insulinsensitivität der mit KXIV-behandelten Zellen ansteigt. Es konnte ein verstärkter Insulin-abhängiger Glukosetransport nachgewiesen werden (Rühl, Erben et al. 2005).

Als Vertreter für Zellen myeloischen Ursprungs, die CD44 exprimieren, wurde die in Suspension wachsende humane maligne myeloische U937-Zelllinie in Differenzierungsexperimenten untersucht. Als Indikator wurde die Expression von Oberflächenantigenen herangezogen. Dabei gelten CD14 als spezifischer Monozytenmarker sowie CD11b, CD64 und CD16 als späte Differenzierungsmarker der myeloischen Zellreihe (Clarke and Gordon 1998; Landmann, Muller et al. 2000). Die mitgeführten Positivkontrollen, insbesondere der Phorbolester PMA, aber auch das Retinoid ATRA zeigten, dass die verwendete U937-Zellpopulation grundsätzlich final differenzieren konnte. Späte Differenzierungsmarker wie CD14 und CD11b werden nach Behandlung *de-novo* exprimiert (siehe Abbildung 25). Unter dem Einfluss von PMA kam es sogar zur für reife Monozyten typischen Adhäsion der sonst suspendierten Zellpopulation mit Ausbildung von Pseudopodien. Die relativ niedrige MFI von CD14 nach PMA-Stimulierung kann dadurch erklärt werden, dass der Großteil der differenzierten Zellen der durchflusszytometrischen Analyse nicht zugänglich war, da die Zellen am Plastik der Zellkulturplatte adhärirten.

Obwohl antiproliferative Wirkung und Reduktion der mitotischen Teilungsrate darauf hinwiesen, dass U937-Zellen nach Inkubation mit KXIV den Zellzyklus verlassen, konnte durch das Gesamtmolekül KXIV keine terminale Differenzierung hin zu reifen Monozyten eingeleitet werden. Sowohl die späten Differenzierungsmarker als auch alle weiteren Oberflächenantigene (siehe Tabelle 6) blieben in ihrer Expression unbeeinflusst. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ die Höhe

der Expression einzelner Oberflächenantigene verändert. Die Expressionshöhe des Heterodimeres CD11a/CD18 aus der Gruppe der Integrine (Synonyme: α L/ β ₂-Integrin, Leukozyten-Funktions-Antigen = LFA-1) wurde hochsignifikant um den Faktor 2 erhöht (siehe Abbildungen 26 und 29). Hauptbindungspartner von Integrinen sind insbesondere interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM). Da ICAM-1 (Synonym: CD54) auf den U937 exprimiert wird, jedoch kein Bindungsverhalten in Form von Zellklusterbildung beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, dass das Integrin rein quantitativ hochreguliert wird, ohne Veränderung von Affinität und Avidität. Trotzdem gilt die Hochregulation des Integrins CD11a/CD18 als Aktivierung der Zellen, durch den sie auf weitere Stimuli, insbesondere von Chemokinen vorbereitet werden, die dann eine Änderung der Affinität und Avidität der Integrine induzieren (Harris, McIntyre et al. 2000; Imhof and Aurrand-Lions 2004).

Diese differenziellen Effekte von Gesamtmolekül KXIV und aktiver Domäne KXIV₂₉₋₁₅₄ hinsichtlich der Integrinexpression passen zu der Beobachtung, dass häufig proteolytisch freigesetzte Fragmente von EZM-Molekülen physiologische und/oder pathologische Bioaktivitäten besitzen, die die Gesamtmoleküle nicht haben, aus denen sie hervorgegangen sind (Schuppan, Rühl et al. 2001; Mott and Werb 2004). Möglicherweise spielt dabei auch eine Rolle, dass das KXIV-Gesamtmolekül aus mehreren Domänen besteht, die teilweise antagonistische Funktionen haben (Rühl, Erben et al. 2005). Außerdem wurde das Gesamtmolekül KXIV aus humanem Plazentagewebe isoliert. Im Gegensatz zu den rekombinant hergestellten Fragmenten unterlag es somit posttranslationalen Glykosylierungs- und Hydroxylierungsprozessen, die das Bindungsverhalten beeinflussen können. Genauso ist denkbar, dass *in vivo*, wie für das KXIV aus dem Huhn bereits nachgewiesen, alternative Spleißprodukte der NC3-Domäne gebildet wurden, die das Zellbindungsverhalten beeinflussen (Ricard-Blum, Dublet et al. 2000; Imhof and Trueb 2001). Für Untersuchungen an den Suspensionszellen U937 ist möglicherweise auch die zweidimensionale Beschichtung des Kollagens suboptimal. Dies passt zu der Beobachtung, dass das rekombinante Fragment bei beiden Zelllinien vor allem in flüssiger Form Einfluss nimmt. Ein ineffektiver Beschichtungsvorgang kann durch Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe, in denen immobilisiertes KXIV-Fragment deutliche antiproliferative Effekte auf Fibroblasten zeigte, ausgeschlossen werden (Rühl, Erben et al. 2005). Allerdings kann ein Verlust an Protein durch die Beschichtung der Zellkulturplatten nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise, in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht, erhöhen sich die Effekte des KXIV Gesamtmoleküls nach Mehrfachbeschichtung oder Erhöhung der initialen Konzentration. Trotz allem verweist das Ergebnis wohl auch darauf wie wichtig dreidimensionale räumliche Strukturen bzw.

mehrdimensionaler Kontakt für bestimmte Zellen, insbesondere für antiproliferative und Differenzierungs-induzierende Effekte ist. Unterstützt wird diese Annahme durch *in-vitro* Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten. Zweidimensionale Kulturbedingungen führten zu Stress, angezeigt durch Verlust der zellulären KXIV-Expression. Durch Überführung in ein dreidimensionales Kultursystem wurde der Stressfaktor reduziert und dieser Effekt aufgehoben (Brown, Mann et al. 1993; Berthod, Germain et al. 1997).

Parallel wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit Versuche zu Proliferation und Differenzierung an U937-Zellen durch Rezeptoraktivierung mittels CD44-aktivierender mAbs (Klone A3D8 und IM7.8.1) durchgeführt. Im Gegensatz zu KXIV zeigten die CD44-spezifischen mAbs keinen Einfluss auf die Proliferationsrate bzw. mitotische Aktivität der malignen myeloischen Zelllinie U937 (siehe Abbildungen 18 und 22). Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenstrukturen hingegen konnten Veränderungen des Expressionsmusters nach Inkubation mit den mAbs nachgewiesen werden. Das Heterodimer CD11a/CD18 wurde analog zum KXIV-Fragment um den Faktor 2 hochreguliert. Darüber hinaus kam es zur *de-novo* Expression der Oberflächenmoleküle CD15 und CCR7 (siehe Abbildungen 27 und 29). Die verwendeten mAbs der Klone A3D8 und IM7.8.1 zeigen dabei gleiche Effekte auf die Zelllinie U937, wobei der mAb des Klon IM7.8.1 weit weniger potent war als der von Klon A3D8. Bei CD15 beispielsweise lag die Expression um 80% niedriger (siehe Abbildung 28). Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass Klon IM7.8.1 zwar eine Kreuzreaktion mit humanem CD44 aufweist, jedoch ursprünglich gegen CD44 von der Maus gerichtet war und somit Klon A3D8 eine höhere Affinität besitzt. Auch eine Bindung an unterschiedliche Epitope und damit Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden ist anzunehmen, da man davon ausgeht, dass Klon A3D8 an ein Epitop innerhalb der Bindungsstelle von HA bindet, wohingegen Klon IM7.8.1 mit einem Epitop außerhalb der HA-Bindungsstelle assoziiert wird (Zheng, Katoh et al. 1995; Gadhoum, Delaunay et al. 2004).

Trotz der *de-novo* Synthese des Carbohydratepitops CD15 und des Chemokinrezeptors CCR7 kann auch unter CD44-spezifischer mAb-Inkubation nicht von terminaler Differenzierung hin zu reifen Leukozyten ausgegangen werden. Die späten Differenzierungsmarker wie CD14, CD11b, CD16 und CD64 wurden weiterhin nicht exprimiert und die Proliferationsrate der U937-Zellen blieb konstant hoch. Das Stadium der postmitotischen Quieszenz einer terminal differenzierten Zelle wurde dementsprechend nicht induziert. Somit entsprechen die behandelten Zellen weiterhin Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihe (Coffman and Studzinski 1999).

Basierend auf der Beobachtung, dass im Vergleich der Effekte des KXIV-Fragments mit denen der CD44-spezifischen mAbs sowohl Unterschiede als auch Analogien beobachtet werden konnten, wurden in dieser Arbeit weitere Versuche durchgeführt, die eine Abhängigkeit von der Konzentration als Ursache für die unterschiedlichen Effekte ausschloss. Bei der Variation der Konzentration des CD44-spezifischen mAb konnte gezeigt werden, dass die Expression der Oberflächeneigenschaft CD15 sich analog zur Expression des Oberflächenantigens CD11a verhält. Beide Strukturen wurden entweder parallel signifikant hochreguliert oder blieben unbeeinflusst (siehe Abbildung 28). In weiteren Versuchsreihen wurden KXIV₂₉₋₁₅₄ und der CD44-spezifische mAb Klon A3D8 kombiniert zu den Zellen gegeben und diese hinsichtlich Proliferation und Expression von Oberflächenantigenen untersucht. Dabei reduzierte sich die Proliferationsrate durch die Kombination signifikant um weitere 20% im Vergleich zur bereits bestehenden Reduktion durch KXIV₂₉₋₁₅₄ (siehe Abbildung 19). Des Weiteren konnte, bezogen auf die Expressionshöhe von CD15, eine signifikante Zunahme der Rezeptordichte um 15% im Vergleich zu der bereits beschriebenen *de-novo* Synthese nach Behandlung mit dem CD44-spezifischen mAb ermittelt werden (siehe Abbildung 30). Beide Substanzen einzeln wirkten unterschiedlich auf Proliferation und Expression von Oberflächenantigenen. Die Kombination hob jedoch die Effekte des anderen nicht auf, sondern es wurde die Wirkung der jeweiligen Substanz verstärkt. Man kann von einer synergistischen Koaktivierung sprechen. Ob dieser Mechanismus auf intrazelluläre oder extrazelluläre Mechanismen zurückzuführen ist bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für den synergistischen Effekt ist eine durch den CD44-spezifischen mAb vermittelte Änderung der Affinität des Rezeptors zu seinen Liganden. Dabei werden insbesondere Konformationsänderungen des Rezeptors und laterale Mobilität von CD44 mit der Fähigkeit zur Aggregation, insbesondere Dimerisierung, diskutiert (Legras, Levesque et al. 1997; Johnson, Maiti et al. 2000). In anderen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Antikörper des Klon A3D8 den CD44-Rezeptor durch *cross-linking* oligomerisieren kann, und dass insbesondere diese Eigenschaft Einfluss auf das Zellverhalten, insbesondere differenzierende Effekte, nimmt (Charrad, Li et al. 1999; Charrad, Gadhoum et al. 2002).

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigte synergistische Effekt weist darauf hin, dass KXIV₂₉₋₁₅₄ und der CD44-spezifische mAb Klon A3D8 nicht um dieselbe Bindungsstelle am CD44-Rezeptor konkurrieren. Vielmehr kann von zwei unterschiedlichen Bindungsregionen ausgegangen werden. Andere Studien mit mAbs zeigten, dass unterschiedliche Epitope des CD44-Rezeptors unterschiedliche Aktivierungskaskaden initiieren und diese insbesondere bei Prozessen wie Proliferation,

Apoptose und Differenzierung unterschiedliche Effekte hervorrufen (Zheng, Katoh et al. 1995; Charrad, Li et al. 1999; Charrad, Gadhoul et al. 2002). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass beide Verbindungen an unterschiedliche Subtypen des CD44-Rezeptors binden. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben wird durch alternative Spleißvorgänge und posttranslationale Modifikation das Spektrum der Bindungspartner für CD44 erweitert und zusätzliche Signaltransduktionswege rekrutiert (Ponta, Sherman et al. 2003). Da für KXIV als Bindungspartner speziell eine Chondroitin/Dermatansulfat-Variante nachgewiesen wurde (Ehnis, Dieterich et al. 1996), scheint dieser Erklärungsansatz für die unterschiedlichen und doch synergistischen Effekte von KXIV und der CD44-spezifischen mAbs durchaus relevant. Trotzdem kann in den hier gezeigten Versuchsreihen auch nicht ausgeschlossen werden, dass KXIV nicht bzw. nicht ausschließlich an CD44 bindet oder die Rezeptorvariante, die die Bindung des KXIV vermittelt, durch die U937-Zellen nicht exprimiert werden. Ein Heparansulfat-Proteoglykan wird ebenfalls als Rezeptor diskutiert und muss als Korezeptor in Betracht gezogen werden (Klein, Kibler et al. 1998; Imhof and Trueb 2001).

Die Versuchsreihen dieser Arbeit zeigen, dass sowohl das KXIV-Fragment als auch CD44-spezifische mAbs insbesondere Oberflächenantigene beeinflussen, die bei Prozessen wie Adhäsion, Extravasation, Migration und Chemotaxis eine wichtige Rolle spielen. Integrine wie das $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ -Integrin d.h. CD11a/CD18 werden vor allem auf Leukozyten gebildet und vermitteln Interaktionen zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der EZM. Das Carbohydratepitop CD15 ist insbesondere beim Rolling, der ersten Phase der Migration, von Bedeutung, während der Chemokinrezeptor CCR7 durch Aktivierung von Leukozyten die Affinität und Avidität von Integrinen erhöht und feste Adhäsion und gerichtete Migration im Sinne von Chemotaxis vermittelt. Insbesondere bei einer akuten Entzündungsreaktion sind alle genannten Oberflächenantigene von Bedeutung. Die im entzündeten Gewebe ausgeschütteten Zytokine induzieren eine Aktivierung von Endothel und Leukozyten, indem sie Integrine, Selektine, Carbohydratepitope wie CD15 und Chemokinrezeptoren hochregulieren und deren Affinität steigern. Als Folge wandern Immunzellen aus dem Blut ins Gewebe ein und die Abwehrreaktion beginnt. (Murdoch and Finn 2000; Walzog and Gaehtgens 2000; Imhof and Aurrand-Lions 2004). Die direkte Beteiligung von HA, einem Molekül der EZM, und dessen Rezeptor CD44 an diesem Entzündungsvorgang ist bekannt. Dabei wird eine Beteiligung von CD44 an Vorgängen wie Extravasation, Migration, Induktion von proinflammatorischen Genprodukten, Matrixreorganisation und Phagozytose apoptotischer Zellen proklamiert (Pure and Cuff 2001), die in dieser Arbeit über die induzierte

Hochregulation und die *de-novo* Synthese von CD11a/CD18 bzw. CD15 und CCR7 mittels des CD44-spezifischen mAb (Klon A3D8) bestätigt wird.

Da unter dem Einfluss von KXIV₂₉₋₁₅₄ ebenfalls Integrine hochreguliert wurden, kann vermutet werden, dass KXIV, ähnlich wie HA, als proinflammatorischer chemotaktischer Faktor wirkt. Neben der differenzierungsinduzierenden und antiproliferativen Funktion scheint KXIV somit weitere Aufgaben im Gewebeverband zu übernehmen. Unterstützt wird diese These dadurch, dass bei der Suche nach chemotaktischen Faktoren für neutrophile Granulozyten im Granulationsgewebe ein Peptid gefunden wurde, welches starke Homologie zur aminoterminalen Aminosäuresequenz 29-118 von KXIV zeigt und hohe chemotaktische Wirkung ausübt (Nakagawa, Takano et al. 1999). Die Fragmentierung des Kollagens im Gewebe und die damit verbundenen Anhäufung der MMP-resistenten NC3-Domäne (Ricard-Blum, Dublet et al. 2000) könnten von Wichtigkeit sein. Die hier vorgelegte Arbeit ordnet die chemotaktische bzw. Integrin-regulierende Funktion von KXIV dieser kurzen definierten aminoterminalen Sequenz innerhalb des Gesamtmoleküls zu.

Die antiproliferativen und Differenzierung induzierenden Effekte von KXIV und seinem Fragment lassen an einen therapeutischen Nutzen denken. Insbesondere der Einsatz des rekombinant-herstellbaren Fragmentes KXIV₂₉₋₁₅₄ ist denkbar, da es in gelöster Form verabreicht werden kann und die für die o.g. Funktionen verantwortliche Domäne von KXIV enthält. Die nachfolgenden Punkte sollten zur Abschätzung des Potentials solcher KXIV/KXIV₂₉₋₁₅₄-basierter Therapien weiter untersucht werden.

Der deutliche antiproliferative Effekt bei der malignen Zelllinie U937 lässt an einen Einsatz innerhalb der Tumorthherapie denken. Maligne transformierte Zellen proliferieren autonom, indem sie Apoptose und antiproliferative Stimuli umgehen. Sie vermeiden dadurch das Stadium der terminalen Differenzierung und den damit einhergehenden postmitotischen Ruhestatus (Hanahan and Weinberg 2000). Dabei ändert sich auch die die Tumorzellen umgebende EZM. KXIV, beispielsweise, ist in Tumorstroma abwesend (Walchli, Koch et al. 1994; Ricard-Blum, Dublet et al. 2000). Durch Zugabe von KXIV ins Tumorgewebe könnte somit die Reduktion der DNS-Syntheserate und somit der mitotischen Aktivität gefördert werden.

Des Weiteren kann bei KXIV an einen therapeutischen Einsatz bei Diabetes mellitus Typ 2 gedacht werden, da KXIV, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Differenzierung von Präadipozyten mit einer Steigerung der GLUT4-Synthese und nachfolgend erhöhter Insulinsensitivität initiiert. Diese Differenzierungsprozesse werden mittels des Transkriptionsfaktors PPAR γ reguliert. Im Rahmen einer Diabetestherapie werden bereits

PPAR γ -modifizierende Substanzen, die Thiazolidindione, als orale Antidiabetika erfolgreich eingesetzt, mit dem Ziel, den Fettsäure- und Glukosemetabolismus via Anstieg von Adiponektin und Abfall von Resistin zu modifizieren und eine Verbesserung der Insulinsensitivität und somit der Funktion der β -Zellen zu bewirken. (Kahn 2003; Chiasson and Rabasa-Lhoret 2004).

Auch an einen therapeutischen Einsatz bei der Leberfibrose kann gedacht werden, da dort pathogenetisch die Transdifferenzierung von ruhenden, Vitamin A speichernden, hepatischen Sternzellen hin zu proliferierenden, Myofibroblasten ähnlichen Zellen mit kontraktilen, proinflammatorischen und fibrogenen Eigenschaften eine Schlüsselrolle spielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte und somit fibrogene, hepatische Sternzellen mittels des Adipozyten-differenzierenden Hormoncocktails bestehend aus Insulin, DEX und MIX analog zu Präadipozyten via PPAR γ in ruhende hepatische Sternzellen revertiert werden können (Bataller and Brenner 2005; She, Xiong et al. 2005). PPAR γ -modifizierende Medikamente wie die bereits oben erwähnten Thiazolidindione wurden bereits an aktivierten hepatischen Sternzellen getestet. Dabei konnte eine deutlich antifibrotische Modifizierung beobachtet werden (Pinzani, Rombouts et al. 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Wirkung von KXIV auf aktivierte hepatische Sternzellen in Form der Zelllinie CFSC getestet. Dabei zeigte sich ein signifikant antiproliferativer Effekt (Rühl, Erben et al. 2005).

Mit der hier vorgelegten Arbeit wurde *in vitro* die Wirkung von KXIV auf Zellen mesenchymalen und hämatopoetischen Ursprungs untersucht und die biologischen Funktionen einem definierten aminoterminalen Fragment zugeordnet. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, gezielt das therapeutische Potential des EZM-Moleküls KXIV und seiner funktionellen Domänen in ihrer Wirkung auf aktivierte hepatische Sternzellen, auf die Insulinsensitivität oder als Agens in der Tumorthherapie prüfen zu können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Kollagen-Typ XIV (KXIV), einem Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM), auf Proliferation und Differenzierung von Zellen mesenchymalen und hämatopoetischen Ursprungs untersucht. Dabei wurden die Zelllinien 3T3-L1 und U937 als Modell für unipotente Präadipozyten bzw. für myelomonozytäre Progenitorzellen eingesetzt. Als Maß der Zellproliferation wurde der Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt. Ergänzend wurden direkte und indirekte Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen mittels Hämatozytometer, der Bestimmung intrazellulärer Esterasen mit Hilfe von 4-Methylumbelliferylheptanoat bzw. Vitalfärbung mit Propidiumjodid in der Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei den 3T3-L1-Zellen wurden Differenzierungsprozesse anhand der intrazellulären Bildung von Fetttröpfchen beurteilt. Der Nachweis erfolgte optisch über die Färbung der Lipidtröpfchen mittels Oil-Red-O. Ergänzend wurde die Expression des Glukosetransporters GLUT4 im Western-blot untersucht. Bei U937-Zellen wurde Differenzierungsinduktion durchflusszytometrisch anhand der Expression spezifischer Oberflächenmarker bewertet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Gesamtmolekül KXIV sowohl bei den präadipozytären 3T3-L1-Zellen, als auch bei den malignen myeloischen U937-Zellen die DNS-Synthese *in vitro* um 30 bis 45% signifikant reduziert. Das rekombinante Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ erzielte eine gleichwertige Reduktion der Zellproliferation (3T3-L1) bzw. übertraf bei der malignen Zelllinie U937 den antiproliferativen Effekt des Gesamtmoleküls und bewirkte eine Reduktion der Proliferation um 70%. Die Vitalität der Zellen blieb jeweils unverändert, weshalb Apoptose ausgeschlossen werden konnte.

Sowohl das Gesamtmolekül KXIV als auch das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ induzierten die Differenzierung der Zelllinie 3T3-L1. Es konnte eine Einlagerung von intrazellulären Fetttröpfchen sowie eine Hochregulation von GLUT4 nachgewiesen werden. Ein solcher Differenzierungs-induzierender Einfluss von KXIV oder seinem Fragment wurde für die Zelllinie U937 nicht gefunden. Die späten Differenzierungsmarker wie CD14, CD11b, CD16 und CD64 wurden weiterhin nicht exprimiert. Allerdings war in Gegenwart des Fragmentes KXIV₂₉₋₁₅₄ das Oberflächenmolekül α L β 2 (CD11a/CD18) aus der Gruppe der Integrine um den Faktor 2 hochsignifikant hochreguliert. Dies könnte auf die physiologische Beteiligung von EZM-Molekülen an Prozessen wie Adhäsion, Extravasation, Migration und Chemotaxis hinweisen.

Insbesondere anhand der Versuchsreihen mit der Zelllinie U937 wurde deutlich, dass das Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ das Gesamtmolekül KXIV hinsichtlich Reduktion der Proliferation und Induktion von Differenzierung nicht nur bestätigt, sondern die Effekte sogar deutlich

übertrifft. Dies passt zu der Beobachtung, dass proteolytisch freigesetzte Fragmente von EZM-Molekülen physiologische und/oder pathologische Bioaktivitäten besitzen, die im Kontext des Gesamtmoleküls nicht darstellbar sind. Das aminoternale Fragment KXIV₂₉₋₁₅₄ lässt sich dadurch eindrücklich als biologisch aktive Domäne bezogen auf die o.g. Funktionen in der Proliferation und Differenzierung benennen. Die biologischen Effekte des Fragments KXIV₂₉₋₁₅₄ sind von der räumlichen Präsentation des Moleküls abhängig. Insbesondere in Lösung, die einen mehrdimensionalen Kontakt des Fragments mit den Zellen gestattet, kam es zu deutlichen Veränderungen bei Proliferation und Differenzierung. Dreidimensionale Kultursysteme reduzieren Stressfaktoren und fördern somit antiproliferative und differenzierungsinduzierende Effekte.

CD44 wurde von anderen als KXIV-Rezeptor identifiziert, weshalb in dieser Arbeit anhand der Zelllinie U937 die Effekte von KXIV auf den Rezeptor mit denjenigen ausgewählter CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAb) verglichen wurden. Analogien gab es hinsichtlich der Hochregulation von CD11a/CD18 um den Faktor 2. Allerdings wurden auch Unterschiede beobachtet. Die Proliferationsrate bzw. mitotische Aktivität der malignen myeloischen Zellen blieb unbeeinflusst. Dafür wurde eine *de-novo* Expression der Antigene CD15 und CCR7 beobachtet werden. Versuchsreihen, in denen KXIV₂₉₋₁₅₄ und CD44-spezifische mAbs kombiniert zu der Zelllinie U937 gegeben wurden, erbrachten eine synergistische Koaktivierung mit signifikanter Verstärkung des antiproliferativen Effektes und der Antigenexpression.

Anhand oben beschriebener Ergebnisse lassen sich folgende Thesen aufstellen: Das KXIV-Fragment und die in dieser Arbeit verwendeten CD44-spezifischen mAbs binden an unterschiedliche Epitope der Standardvariante von CD44 oder an unterschiedliche Spleißvarianten des Rezeptors. Eine kompetitive Hemmung an derselben Bindungsstelle kann ausgeschlossen werden. Des Weiteren erscheint aufgrund der antiproliferierenden und Differenzierung induzierenden Effekte eine weitere Evaluierung des therapeutischen Nutzens von KXIV, insbesondere in Form seiner aktiven Domäne KXIV₂₉₋₁₅₄ interessant. Dabei muss u.a. der Einsatz bei der Behandlung von Diabetes mellitus, Leberfibrose oder in der Tumorthherapie diskutiert werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	all-trans-Retinolsäure
BSA	Serum-Albumin vom Rind
CCR	Chemokinrezeptor der CC-Superfamilie
CD	<i>cluster of differentiation</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CMP	Allgemeine myeloische Progenitorzellen
COL	Kollagen-Domäne
cpm	<i>counts per minute</i>
DC	Dendritische Zellen
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACIT	Fibrillen-assoziiert
FACS	Durchflusszytometrie
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Rinderserum
GAG	Glykosaminoglykane
GLUT	Glukosetransporter
GMP	Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hyaluronsäure
HAC	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
KI	Kollagen-Typ I
KXIV	Kollagen-Typ XIV
KXIV ₂₉₋₁₅₄	Kollagen-Typ XIV Fragment mit Adhäsionsdomäne
LTRC	<i>long-term repopulating cells</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MIX	Methylxanthin
MMP	Matrixmetalloproteinase
MUH	Methylumbelliferylheptanoat
MPP	Multipotente Progenitorzellen

MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Domänen ohne Kollagenstruktur
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺
PE	Phycoerythrin
PI	Prpidiumjodid
PMA	Phorbol-12-mystrat-13-acetat
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Sammelgel
STRC	<i>short-term repopulating cells</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trenngel
TNF	Tumornekrosefaktor

7 Literaturverzeichnis

- Al-Hasani, H., C. Hinck, et al. (1998). "Endocytosis of the glucose transporter GLUT4 is mediated by the GTPase dynamin." *J Biol Chem* 273(28): 17504-10.
- Aumailley, M. and B. Gayraud (1998). "Structure and biological activity of the extracellular matrix." *J Mol Med* 76(3-4): 253-265.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." *J Clin Invest* 115(2): 209-18.
- Bauer, M., W. Dieterich, et al. (1997). "Complete primary structure of human collagen type XIV (undulin)." *Biochim Biophys Acta* 1354(3): 183-8.
- Bellantuono, I. (2004). "Haemopoietic stem cells." *Int J Biochem Cell Biol* 36(4): 607-620.
- Berthod, F., L. Germain, et al. (1997). "Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin." *J Invest Dermatol* 108(5): 737-42.
- Blagosklonny, M. (2003). "Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order." *Semin Cancer Biol* 13(2): 97-105.
- Brown, J. C., K. Mann, et al. (1993). "Structure and binding properties of collagen type XIV isolated from human placenta." *J Cell Biol* 120(2): 557-67.
- Charrad, R. S., Z. Gadhoun, et al. (2002). "Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines." *Blood* 99(1): 290-9.
- Charrad, R. S., Y. Li, et al. (1999). "Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia." *Nat Med* 5(6): 669-76.
- Chiasson, J. and R. Rabasa-Lhoret (2004). "Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function." *Diabetes* 53(3): 34-8.
- Chiquet, M. (1999). "Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress." *Matrix Biol.* 18(5): 417-426.
- Clarke, S. and S. Gordon (1998). "Myeloid-specific gene expression." *J Leukoc Biol* 63(2): 153-68.
- Coffman, F. and G. Studzinski (1999). "Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication." *Exp Cell Res* 248(1): 58-73.
- Dublet, B. and M. van der Rest (1991). "Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens." *J Biol Chem* 266(11): 6853-8.
- Ehnis, T., W. Dieterich, et al. (1997). "Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin)." *J Biol Chem* 272(33): 20414-9.

- Ehnis, T., W. Dieterich, et al. (1996). "A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV (undulin)." *Exp Cell Res* 229(2): 388-97.
- Ehnis, T., W. Dieterich, et al. (1998). "Localization of a cell adhesion site on collagen XIV (undulin)." *Exp Cell Res* 239(2): 477-80.
- Furuyashiki, T., H. Nagayasu, et al. (2004). "Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* 68(11): 2353-9.
- Gadhoum, Z., J. Delaunay, et al. (2004). "The effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and proliferation of human acute myeloid leukemia cells." *Leuk Lymphoma* 45(8): 1501-10.
- Gerecke, D. R., X. Meng, et al. (2003). "Complete primary structure and genomic organization of the mouse Col14a1 gene." *Matrix Biol* 22(3): 209-16.
- Giry-Lozinguéz, C., E. Aubert-Foucher, et al. (1998). "Identification and characterization of a heparin binding site within the NC1 domain of chicken collagen XIV." *Matrix Biol* 17(2): 145-9.
- Goodfellow, P., G. Banting, et al. (1982). "The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoklonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11." *Eur J Immunol* 12(8): 659-63.
- Green, H. and M. Meuth (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." *Cell* 3(2): 127-33.
- Gregoire, F. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." *Exp Biol Med* 226(11): 997-1002.
- Hanahan, D. and R. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Harris, E., T. McIntyre, et al. (2000). "The leukocyte integrins." *J Biol Chem* 275(31): 23409-12.
- Huang, Z. and M. Failla (2000). "Copper deficiency suppresses effector activities of differentiated U937 cells." *J Nutr* 130(6): 1536-42.
- Imhof, B. and M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." *Nat Rev Immunol* 4(6): 432-44.
- Imhof, M. and B. Trueb (2001). "Alternative splicing of the first F3 domain from chicken collagen XIV affects cell adhesion and heparin binding." *J Biol Chem* 276(12): 9141-8.
- Johnson, P., A. Maiti, et al. (2000). "A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response?" *Biochem Pharmacol* 59(5): 455-65.
- Kadler, K., D. Holmes, et al. (1996). "Collagen fibril formation." *Biochem J* 316(Pt 1): 1-11.

- Kahn, S. (2003). "The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes." *Diabetologia* 46(1): 3-19.
- Klein, G., C. Kibler, et al. (1998). "Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells." *Matrix Biol* 16(6): 307-17.
- Landmann, R., B. Muller, et al. (2000). "CD14, new aspects of ligand and signal diversity." *Microbes Infect* 2(3): 295-304.
- Lechmann, M., S. Berchtold, et al. (2002). "CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation." *Trends Immunol* 23(6): 273-5.
- Legras, S., J. P. Levesque, et al. (1997). "CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines." *Blood* 89(6): 1905-14.
- Loercher, A., E. Tank, et al. (2005). "MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A." *J Cell Biol* 168(1): 35-40.
- Lowell, B. (1999). "PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function." *Cell* 99(3): 239-42.
- Mott, J. and Z. Werb (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 558-564.
- Murdoch, C. and A. Finn (2000). "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious disease." *Blood* 95(10): 3032-3043.
- Nakagawa, H., K. Takano, et al. (1999). "A 16-kDa fragment of collagen type XIV is a novel neutrophil chemotactic factor purified from rat granulation tissue." *Biochem Biophys Res Commun* 256(3): 642-5.
- Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." *J Nutr* 130(12): 3122S-3126S.
- Nurse, P. (2000). "A long twentieth century of the cell cycle and beyond." *Cell* 100(1): 71-8.
- Pinzani, M., K. Rombouts, et al. (2005). "Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management." *J Hepatol* 42(1): 22-36.
- Ponta, H., L. Sherman, et al. (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1): 33-45.
- PROW (2006). "Protein reviews on the web." (Zugang am 07.02.06): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow>.
- Pure, E. and C. A. Cuff (2001). "A crucial role for CD44 in inflammation." *Trends Mol Med* 7(5): 213-21.
- Ramirez-Zacarias, J. L., F. Castro-Munozledo, et al. (1992). "Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O." *Histochemistry* 97(6): 493-7.

- Reche, P. and E. Reinherz (2003). "Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms." *J Mol Biol* 331(3): 623-41.
- Ricard-Blum, S., B. Dublet, et al. (2000). "Unconventional Collagens. Types VI, VII, VIII, IX, X, XIV and XIX." Oxford University Press(New York): 93-99.
- Rieder, C. and R. Cole (2002). "Cold-shock and the Mammalian cell cycle." *Cell Cycle* 1(3): 169-75.
- Rühl, M., U. Erben, et al. (2005). "The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes." *J Biol Chem* 280(46): 38537-43.
- Rühl, M., C. Wagner, et al. (2000). "Collagen XIV (Undulin) induces quiescence and differentiation in fibroblasts and hepatic stellate cells." *Gastroenterology* 116: 118 (Abst).
- Schnittger, S., H. Herbst, et al. (1995). "Localization of the undulin gene (UND) to human chromosome band 8q23." *Cytogenet Cell Genet* 68(3-4): 233-4.
- Schuppan, D., M. C. Cantaluppi, et al. (1990). "Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils." *J Biol Chem* 265(15): 8823-32.
- Schuppan, D., M. Rühl, et al. (2001). "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis." *Semin Liver Dis* 21(3): 351-72.
- Sellmayer, A., H. Obermeier, et al. (1997). "Intrinsic cyclooxygenase activity is not required for monocytic differentiation of U937 cells." *Cell Signal* 9(1): 91-6.
- She, H., S. Xiong, et al. (2005). "Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells." *J Biol Chem* 280(6): 4959-67.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." *Int. J. Cancer* 17: 565-577.
- Trojanowska, M. (2000). "Ets factors and regulation of the extracellular matrix." *Oncogene* 19(55): 6464-71.
- Trueb, J. and B. Trueb (1992). "Type XIV collagen is a variant of undulin." *Eur J Biochem* 207(2): 549-57.
- Virag, L., C. Kerekgyarto, et al. (1995). "A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol Methods* 185(2): 199-208.
- Walchli, C., M. Koch, et al. (1994). "Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV." *J Cell Sci* 107 (Pt 2): 669-81.
- Walchli, C., J. Trueb, et al. (1993). "Complete primary structure of chicken collagen XIV." *Eur J Biochem* 212(2): 483-90.

- Walzog, B. and P. Gaehtgens (2000). "Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation." *News Physiol Sci* 15: 107-113.
- Yu, Y. and H. Ginsberg (2005). "Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue." *Circ Res* 96(10): 1042-52.
- Zheng, Z., S. Kato, et al. (1995). "Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition." *J Cell Biol* 130(2): 485-95.

Danksagung

Über die Zeit hinweg sind mir viele Menschen zur Seite gestanden, um diese Doktorarbeit fertig zu stellen. Bei Prof. Dr. Rajan Somasundaram und Dr. Martin Rühl möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die hepatologische Arbeitsgruppe, für interessante Einblicke in die wissenschaftliche Tätigkeit und eine hervorragende (zu gleichen Teilen inspirierende wie stützende) Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die Arbeit würde in der jetzigen Form nicht existieren, ohne die beharrliche und unermüdliche Hilfe von Dr. Ulrike Erben, die mich mit vielen Anregungen und konstruktiver Kritik unterstützte. Gerne erinnere ich mich zurück an die freundschaftliche Atmosphäre im Labor der Arbeitsgruppe. Dort standen mir viele gute Geister mit Rat und Tat zur Seite. Stellvertretend für viele andere möchte ich mich bei Christine Wagner, Christian Paetow und Christian Freise bedanken.

Meine Eltern verdienen Dank für so Vieles. Da ist es schon fast eine Nebensache, dass ich ohne ihre Unterstützung mein Studium nicht absolvieren und diese Arbeit nicht hätte schreiben können. All das wäre aber nichts ohne meinen Sohn Jakob, meine Tochter Juna und meinen Mann Bob.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Ruehl, M., Erben, U., Schuppan, D., Wagner, C., **Zeller, A.**, Freise, C., Al-Hasani, H., Loesekann, M., Notter, M., Wittig, B. M., Zeitz, M., Dieterich, W., Somasundaram, R.

The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes.

Journal of Biological Chemistry, 2005, 280:38537-38543.

Erklärung

„Ich, Anita Zeller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Kollagen XIV und CD44 – Einfluss auf Proliferation und Differenzierung bei mesenchymalen und hämatopoetischen Zellen“ 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.

Hamburg, den 17.02.2010

Anita Zeller