

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte des humanen FACIT-Kollagens XIV, einem Molekül der extrazellulären Matrix und seiner rekombinaten Fragmente auf Zellen im Hinblick auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung untersucht. Die bisher bekannten Eigenschaften von Kollagen XIV, insbesondere das als typisches Merkmal hervorzuhebende Auftreten in hoch differenziertem Gewebe in Nachbarschaft zu reifen Kollagenfibrillen, führte zu der Hypothese, dass möglicherweise Kollagen XIV selbst Proliferation und Apoptose beeinflussen und Differenzierung induzieren kann. Dieser Hypothese sollte durch *in vitro* Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass immobilisiertes, natives Kollagen XIV Quieszenz und Differenzierung bei verschiedenen Zelllinien (u.a. humane Hautfibroblasten, 3T3-Mausfibroblasten) induziert. Durch Einsatz rekombinanter Fusionsproteine von Kollagen XIV wurde die elongierte, N-terminale Fibronectin-Typ-III-Homologie (Q29-P154) als verantwortliche Domäne identifiziert. Diese aminoterminal Domäne beherbergt die Hauptbindungsstelle für einen Kollagen XIV-Rezeptor und bindet Heparin und das kleine Dermatan sulfat Proteoglykan Decorin (55, 56). Nur eine Sequenz, das Fragment P478-V580 wirkte kompensatorisch, also eher stimulierend auf das Zellwachstum. Die übrigen Sequenzen, die 85% des Gesamtmoleküls ausmachen, zeigten keine signifikanten Effekte auf die Zellproliferation oder die Quieszenz.

Da eine Reduktion der Proliferation auch durch Zellnekrose oder Apoptose hervorgerufen werden kann, wurden auch die Zellzahlen der vitalen Zellen bestimmt, nachdem die Zellen Kollagen XIV bzw. seinem Fragment Q29-P154 ausgesetzt worden waren. Diese Untersuchungen zeigten keinen erhöhten Zellverlust an vitalen Zellen. Desweiteren zeigten sich bei Zellzyklusuntersuchungen durch FACS-Analysen keine vermehrten DNS-Bruchstücke durch Apoptosereaktionen. In weiteren Untersuchungen konnten die in ihrer Proliferation durch Kollagen XIV gehemmten Zellen durch hohes Nährstoffangebot wieder zur Proliferation angeregt werden. Auch dieses Ergebnis spricht für eine durch Kollagen XIV hervorgerufenen Quieszenz der Zellen, die durch entsprechende Stimuli (hohe FKS-Konzentrationen) wieder aufgehoben wird.

Die vorgelegten Ergebnisse, die alle für eine starke Fähigkeit von Kollagen XIV sprechen, Quieszenz in Zellen zu induzieren, stimmen gut mit den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur überein.

Insbesondere der Befund, dass Kollagen XIV im Gegensatz zu einer Reihe fibrillärer Kollagene in der Stress-induzierenden Umgebung der zweidimensionalen Zellkultur nur gering exprimiert wird, ist hier anzuführen. In dreidimensionalen Matrix-Systemen hingegen, in der auch aktivierte Zellen nachweislich wieder quieszent werden, kann wieder Kollagen XIV produziert werden (15, 34). Die Ergebnisse dieses bemerkenswerten biologischen Effektes von Kollagen XIV stehen im Einklang mit den publizierten Eigenschaften von Kollagen XIV als Zelladhäsionsmolekül. So konnte gezeigt werden, dass das Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 die Adhäsion von hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen vermittelt (20, 56, 67). In anderen Arbeiten konnte ein 16 kDa großes, aminotermiales Fragment von Kollagen XIV der Ratte, ähnlich dem rekombinanten humanen Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 als potentes Chemokin für Neutrophile identifiziert werden (68).

Bei dem Zellrezeptor handelt es sich vermutlich um ein membrangebundenes Heparansulfat-Proteoglykan sowie um eine Variante des CD44-Zellrezeptors, der eine Chondroitin-Sulfat-Seitenkette besitzt (56). Diese CD44-Variante ist nahezu ausschließlich auf Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die in dieser Arbeit häufig eingesetzten Hautfibroblasten exprimieren diesen Rezeptor besonders stark (55). Es ist gut möglich, dass die Zelladhäsion und die Induktion der Zellquieszenz über denselben Rezeptor – entweder die CD44-Variante oder das Heparansulfat Proteoglykan – vermittelt werden, was aber eine weitere Untersuchung schwierig macht, da Adhäsion eine wichtige Voraussetzung für das Überleben von Fibroblasten ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit immobilisiertem Kollagen XIV und gelöstem Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 deuten auf eine synergistische Wirkungsweise, bei dem ein dreidimensionales Kollagen XIV-Signal – wie es auch *in vivo* vorkommt – in einer optimalen Aktivierung des oder der Kollagen XIV-Rezeptoren resultiert, was zur Induktion von Quieszenz und Differenzierung führt.

Untersuchungen zum Wachstumsmuster der Zellen auf Kollagen XIV zeigten eine typische Bildung von Ringstrukturen durch Zellkomplexe nach 44stündiger Inkubationszeit auf. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Literatur mit humane dendritischen Zellen beschrieben, die mit verschiedenen Antikörpern gegen CD44 und gegen bestimmte CD44-Isoformen, mit Kontroll-IgG oder Hyaluronsäure kultiviert wurden. Dabei fiel nach 24-stündiger Inkubation eine Zellaggregatbildung der Zellen in Gegenwart der immobilisierten Antikörper J173, anti-CD44v6, anti-CD44v9 sowie Hyaluronsäure auf. Auf dem immobilisierten Kontrollantikörper war dieses Phänomen dagegen nicht zu beobachten. Bei der Untersuchung der Oberflächenantigene stellte sich bei den aggregierten Zellen eine signifikant erhöhte Expression von Antigenen dar, die charakte-

ristisch für differenzierte Zellen sind. Als besonders typisches Merkmal wurde hier CD83 beschrieben (65). Diese Beobachtungen deuten auf eine Differenzierung der Zellen hin, die über den CD44-Rezeptor induziert worden ist und die sich als morphologisches Korrelat in dem Phänomen der Zellaggregat-Bildung widerspiegelt. Als weiteres Beispiel kann die morphologische und Wachstums-Veränderung von Zellen angeführt werden, die in Kontakt mit Quieszenz-induzierenden Basalmembran-ähnlichen Substraten stehen. Diese bestehen aber aus einer schlecht-definierten Mischung von u.a. Laminin-1, Kollagen IV und Heparansulfat Proteoglykanen (48, 69). Dagegen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit mit hochreinem Kollagen XIV und dem rekombinanten Kollagen XIV-Fragment Q29-P154, welche keine Kontaminationen von anderen extrazellulären Matrixkomponenten oder Wachstumsfaktoren/inhibitoren enthalten und einen eindeutigen, dem Kollagen XIV-Fragment zuzuordnenden Quieszenz- und Differenzierungs-induzierenden Effekt zeigt. Außerdem muss das Kollagen IV immobilisiert werden, um Zellquieszenz zu induzieren, im Gegensatz zu dem löslichen Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 (1, 70).

Das Induzieren von Quieszenz ist als Voraussetzung für eine zelluläre Differenzierung und vor dem Hintergrund einer Reihe von Erkrankungen wie Tumoren oder Organfibrosen von größtem biologischen Interesse (71, 72). Dass Kollagen XIV auch Differenzierung induzieren kann, wurde durch die Ergebnisse zur Transformierung von 3T3-L1-Zellen (Präadipozyten) zu Adipozyten, einem gut etablierten System zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen (62, 63), weiter gestützt: als typisches mikroskopisch identifizierbares Merkmal zeigten sich hierbei die intrazellulären Fetttropfchen der reifen Adipozyten, wobei Kollagen XIV ebenso stark diese Differenzierung in den 3T3-L1 Präadipozyten induzierte wie der adäquate Stimulus durch einen speziellen Hormoncocktail. Diese Reversion ähnelt der von aktivierten Myofibroblasten in quieszente hepatische Sternzellen. Morphologieänderung, Quieszenzinduktion und Adipozyten-differenzierung geben sehr starke Evidenzen für das einzigartige Potential von Kollagen XIV, Differenzierung von Fibroblasten zu induzieren.

Der genaue Signaltransduktionsweg vom Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 über den potentiellen Rezeptor - die CD44-Variante oder das Heparansulfat Proteoglykan – muss in weiteren Studien ermittelt werden. Deren Signaltransduktion vermittelt Zytoskelettlagerung und Zellüberleben über die Phosphoinositol-3 Kinase und c-Akt (73); Signalwege, die auch bei den 3T3-L1 Präadipozyten eine wichtige Rolle spielen (74, 75). Da vermehrte Expression von PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) adipogene Faktoren und die Quieszenz in hepatischen Sternzellen steuert, könnte ein gemeinsamer Signalweg von Kollagen XIV und PPAR- $\gamma$  eine

Rolle spielen (72). Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass humanes Kollagen XIV und insbesondere das aminoternale Kollagen XIV-Fragment Q29-P154 Quieszenz und Differenzierung in Fibroblasten und Präadipozyten induziert. Perspektivisch könnte dieses Fragment die Basis für die Entwicklung von Kollagen XIV-abgeleiteten kleinen Analoga für die Induzierung von Quieszenz in biologischen Prozessen wie Wundheilung oder Leberfibrose darstellen.