

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

DISSERTATION

Kollagen XIV reduziert die Proliferation humaner,
CD44-positiver Tumorzelllinien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Paetow

aus Köln

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Somasundaram..

2. Priv.- Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski.

3. Prof. Dr. med. R. Duchmann

Datum der Promotion: 18.09.2009

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Extrazelluläre Matrix (EZM) und Kollagen XIV	6
1.2.	Der Rezeptor CD44	7
1.3.	Hämatopoese und Leukämie	10
1.4.	Fragestellung	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Chemikalien, Lösungen und Medien	13
2.2.	Geräte und Materialien	14
2.3.	Antikörper und Kollagen XIV	15
2.4.	Verwendete humane Zelllinien	16
2.5.	Zellkultur	17
2.5.1.	Medien für die Zellkultur	17
2.5.2.	Standardzellkultur von Suspensionszellen	17
2.5.3.	Standardzellkultur adhärenter Zellen	18
2.5.4.	Synchronisation adhärenter Zellen	19
2.6.	Kryokonservierung von Zellen	19
2.7.	Zellzählung mit Trypanblau-Vitalfärbung	21
2.8.	Vorbehandlung von Zellkulturplatten	22
2.9.	Bestimmung des Proteingehalts mit Sulforhodamin B (SRB)	22
2.10.	Bestimmung der DNS-Synthese durch [3H]-Thymidineinbau	24
2.11.	Durchflusszytometrie	26
2.12.	Statistische Auswertung	28
3.	Ergebnisse	29
3.1.	Expression von CD44 auf humanen Tumorzelllinien	29
3.2.	Zellzahlbestimmung mit SRB	30

3.3.	Wachstumsmessung humaner Tumorzelllinien mit [3H]-Thymidineinbau	31
3.3.1.	Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei CS-1-Zellen	31
3.3.2.	Serumreduktion bei CS-1-Zellen	34
3.3.3.	Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei U937-Zellen	35
3.3.4.	Serumreduktion bei U937-Zellen	38
3.3.5.	Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei HT1080-Zellen	39
3.3.6.	Synopsis der Wirkung von Kollagen XIV auf die Proliferation humaner Tumorzelllinien	40
4.	Diskussion	43
4.1.	Auswahl und Charakterisierung der Zelllinien	43
4.2.	Verwendete Methoden	44
4.3.	Proliferation von Zellen myeloischen Ursprungs unter dem Einfluss von immobilisiertem Kollagen XIV	46
4.4.	Einfluss von Serumfaktoren auf die Kollagen XIV-induzierte Proliferationsreduktion myeloischer Zellen	48
4.5.	Einfluss der Adhäsion an immobilisiertes Kollagen XIV auf die Proliferation myeloischer Zellen	50
5.	Zusammenfassung und Ausblick	53
6.	Literaturverzeichnis	55
7.	Abkürzungen	62

1. Einleitung

1.1. Extrazelluläre Matrix (EZM) und Kollagen XIV

Die EZM ist ein Netzwerk, an dessen Aufbau die Makromolekül-Großgruppen Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Glykoproteine und Kollagene beteiligt sind. Auch die von den Zellen produzierten Zytokine werden zu den Bestandteilen der EZM hinzugezählt. Die EZM ist kein starres Gebilde, sondern sowohl strukturell als auch funktionell ein flexibles Netzwerk. Sie wird einerseits durch die sie bildenden Zellen beeinflusst, gestaltet andererseits aber auch die zelluläre Zusammensetzung in ihrer unmittelbaren Umgebung mit, z.B. durch Zurückhalten von Wachstumsfaktoren oder durch enzymatische Freisetzung von Molekülen mit Wachstumsfaktoreigenschaften. Das Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Matrix wird über Matrix-Metalloproteinasen und ihre spezifischen Inhibitoren, die so genannten TIMPs, reguliert [1-6].

Wesentlicher strukturbildender Bestandteil der EZM sind Kollagene. Dies sind Glykoproteine, die über eine charakteristische tripelhelikale, sog. kollagene (COL) Domäne klassifiziert werden. Schuppan *et al.* isolierten 1990 aus humanen Plazenten und Hautfibroblasten ein Glykoprotein und gaben ihm wegen seines welligen Aussehens in der mikroskopischen Darstellung den treffenden Namen Undulin. Kollagen XIV betrachtete man zunächst als eine Spleißvariante dieses Moleküls. 1997 konnte schließlich gezeigt werden, dass Undulin und Kollagen XIV identische Moleküle sind. Das Gen für humanes Undulin wurde auf Chromosom 8 (q23-24.1) lokalisiert [7-13].

Kollagen XIV gehört zu der Gruppe der Fibrillen-assoziierten Kollagene mit unterbrochenen tripelhelikalen Bereichen (FACIT). Diese Kollagene bilden selbst keine Fibrillen aus, sondern lagern sich an Fibrillen anderer Kollagentypen, insbesondere Kollagen I, an [14-16].

In den meisten Geweben sind Fibroblasten die Hauptquelle von Kollagen XIV, im Knochenmark wird es von den fibroblastischen Retikulumzellen synthetisiert. Daneben sind jedoch auch andere Zellen zur Kollagen XIV-Synthese befähigt: Osteoblasten bilden es im Knochen. In der Leber lagern fettspeichernde Zellen und sinusoidale Endothelzellen Kollagen XIV im Portalfeld, in den Sinusoiden und in der Adventitia der hepatischen Gefäße ab. Als weitere Organe, in denen Kollagen XIV nachgewiesen wurde, seien Lunge und Mamma, die Haut und das Auge erwähnt [17-25].

Kollagen XIV setzt sich aus drei identischen $\alpha 1$ -Ketten zusammen, die ausschließlich durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Da jede Kette des Homotrimerers 210 bis 220 kDa wiegt, beträgt das Gewicht des gesamten Moleküls etwa 650 kDa. Kollagen XIV ist, wie alle FACIT, ein Protein mit multiplen Domänen. Es besitzt zwei kollagene COL- und vier nichtkollagene NC-Domänen (Abbildung 1).

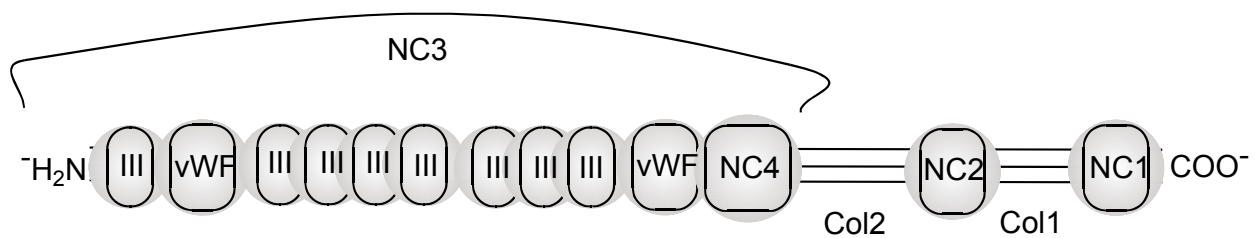


Abbildung 1: Struktur von Kollagen XIV. NC1 bildet das carboxyterminale Ende des Moleküls und existiert in zwei unterschiedlich langen Spleißvarianten. Die sich anschließende COL1-Domäne ist mit einer Länge von 106 Aminosäuren relativ kurz und besitzt in ihrer tripelhelikalen Sequenz zwei Unregelmäßigkeiten, Gly-X und X-Y. COL2 ist mit 149 Aminosäuren ebenfalls kurz, weist jedoch nur eine Unregelmäßigkeit auf. COL2 besitzt eine RGD-Sequenz zur Integrin-vermittelten Zellbindung. Beide kollagenen Domänen sind hochgradig hydroxyliert und glykosyliert und sind durch die NC2-Domäne getrennt. VWF: von Willebrand-Faktor. Bzgl. der Domäne NC3 siehe Text.

Die NC3-Domäne ist aminoterminal lokalisiert und formt zu 63% eine β -Faltblatt- und zu 11% eine α -Helix-Struktur aus. NC3 ist ein typisches Beispiel für den modulartigen Aufbau der Moleküle der EZM: $7\frac{1}{4}$ Fibronectin-III-Wiederholungen, zwei von-Willebrand-Faktor-A-Motive und eine Thrombospondin-Domäne sind nachweisbar; NC3 ist daher ausgesprochen groß. Auf der aminoterminalen Fibronectin-III-Wiederholung befindet sich eine Zellbindungsregion. Als zugehöriger Rezeptor wurde die Chondroitin-Dermatansulfat-Variante von CD44 identifiziert, die fast ausschließlich von hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten exprimiert wird [9, 26-33].

1.2. Der Rezeptor CD44

CD44 betrachtet man aufgrund seiner großen strukturellen und funktionellen Diversität nicht als einen einzigen, sondern als eine Familie von Rezeptoren. Es handelt sich um transmembranäre Typ-I-Glykoproteine, d.h. mit extrazellulärem N-Terminus, die ubiquitär verbreitet sind und von einer Vielzahl von Zellen, wie Epithel-, Endothel-,

Mesenchym- und hämatopoetischen Zellen einschließlich aller Leukozyten, exprimiert werden (Abbildung 2). Sämtliche CD44-Moleküle werden von einem einzigen Gen, das beim Menschen auf dem Chromosom 11p13 lokalisiert ist und aus 20 Exons besteht, codiert. Die Vielfalt unterschiedlicher Moleküle kommt im Wesentlichen durch zwei Prozesse zustande: Durch alternatives Spleißen und durch ausgeprägte posttranslationale Modifikation wie Sulfatierung, Glykosylierung und Anheften von Glykosaminoglykanen. Durch alternatives Spleißen der mittleren Exons werden in der membran-nahen Region der extrazellulären Domäne variable Exonprodukte (v2-v10) einzeln oder in Kombination eingefügt, so dass die CD44-Isoformen (CD44v) mit Molekulargewichten zwischen 80 und 250 kDa entstehen. Bisher sind mehr als 40 Varianten von CD44 nachgewiesen worden. Ihre Bedeutung liegt darin, dass einige von ihnen mit Genese und Metastasierung verschiedener Tumore assoziiert sind, wie etwa beim Mamma-, Colorectum-, Magen-, Bronchial- und Pankreas-Karzinom sowie bei Non-Hodgkin-Lymphomen. Der überwiegende Teil hämatopoetischer Zellen exprimiert normalerweise die Standardvariante von CD44 (CD44s) [34-39].

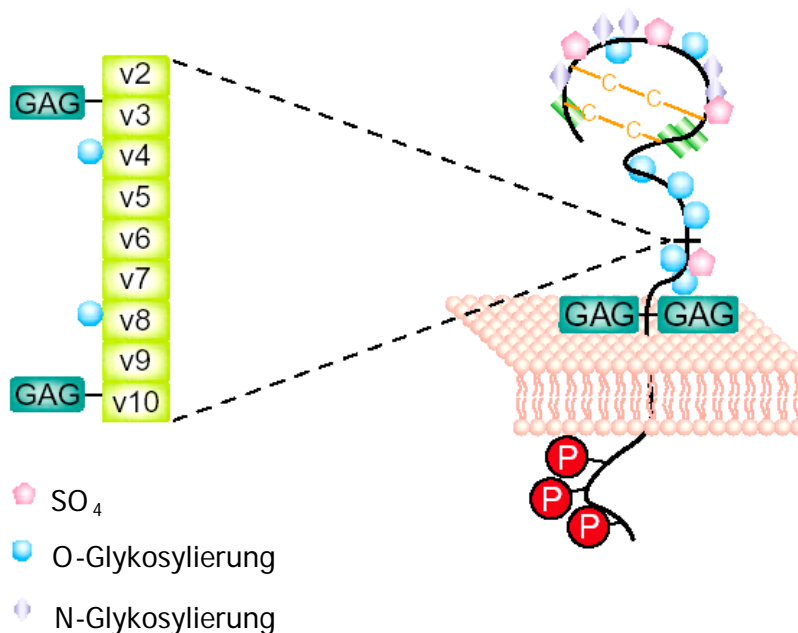


Abbildung 2: Struktur des Rezeptors CD44. Das CD44-Standardmolekül (CD44s) besteht aus einer carboxyterminal-zytoplasmatischen, einer transmembranären und einer aminoterminal-extrazellulären Domäne, die die Ligandenbindungsstelle enthält. CD44s ist dadurch gekennzeichnet, dass es kein variables Exonprodukt enthält. Werden durch alternatives Spleißen variable Exonprodukte (v2-v10) einzeln oder in Kombination eingefügt, entstehen CD44-Varianten. Das Molekül ist hochgradig sulfatiert und glykosyliert und kann Glykosaminoglykane wie z. B. Chondroitinsulfat besitzen. (Abbildung aus [40].)

Zu den Liganden von CD44 gehören zahlreiche Bausteine der EZM, z. B. Kollagen I und VI, Kollagen XIV, Fibronectin, Laminin, Versican, Aggrecan, Serglycin, Osteopontin sowie Hyaluronsäure. Hyaluronsäure ist ein wichtiger Bestandteil der EZM des Knochenmarks. Es ist mit 10^6 bis 10^7 Da ein ungewöhnlich großes Glykosaminoglykan, das zudem nicht sulfatiert und nicht an ein Kern-Protein gebunden ist [1, 27, 41-43].

CD44 vermittelt die Adhäsion CD34-positiver Zellen, d. h. myeloischer Stammzellen (der Linien KG-1 und KG1a), an Hyaluronsäure. Eine Behandlung mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat (TPA) vergrößert den Anteil bindender Zellen, jedoch erfolgt die Bindung durch ein anderes Protein als CD44. CD34-negative Zellen binden weder mit noch ohne TPA-Behandlung an Hyaluronsäure; was die Bedeutung von CD34 als Regulator zellulärer Adhäsion unterstreicht. Die CD44-vermittelte Adhäsion CD34-positiver Zellen an Hyaluronsäure kann auch durch einen anderen Phorbol-ester, Phorbol-12-Myristat-13-Azetat, durch den Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), Interleukin-3, Stammzellfaktor (SCF) sowie durch den CD44-spezifischen monoklonalen Antikörper H90 induziert werden. CD44 ist wesentlich für die physiologische Myelopoese von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, da diese durch den CD44-spezifischen Antikörper KM 201 vollständig verhindert wird. Weitere Funktionen von CD44 betreffen Zellmigration, das *homing* und *rolling* von Leukozyten sowie die Sekretion und Präsentation von Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ), des basalen Fibroblastenwachstumsfaktors (b-FGF) und heparinbindenden epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF). Auch die Matrix-Metalloproteinase 7 wird von CD44 gebunden und ist an der Bildung von HB-EGF beteiligt. CD44 ist auch in der Lage, zelluläre Differenzierung zu induzieren, wie es z. B. bei dendritischen Zellen und Vorläufern natürlicher Killerzellen beobachtet wurde. Die Tatsache, dass Zellen der Granulopoese mit zunehmender Reifung weniger CD44 exprimieren, weist ebenfalls auf eine Beteiligung des Rezeptors an der Differenzierung unreifer myeloischer Zellen hin [44-49].

Der Mechanismus, durch den auf der Zelloberfläche exprimierte CD44-Moleküle wieder entfernt werden, scheint vornehmlich in einem proteolytischen Abspalten und nicht in der Internalisierung und Rezyklierung zu bestehen. Daneben können gelöste CD44-Moleküle auch durch alternatives Spleißen gebildet werden. In der Folge lassen sich im Serum gelöste CD44-Moleküle nachweisen [50, 51].

1.3. Hämatopoese und Leukämie

Die Blutbildung oder Hämatopoese findet im Knochenmark statt und wird durch komplexe Interaktionen von hämatopoetischen Zellen mit Knochenmarkstromazellen und EZM reguliert. Zu den Stromazellen zählen fibroblastenähnliche Retikulumzellen, Endothelzellen, Makrophagen sowie Adipozyten; bekannte Regulatoren der Hämatopoese sind neben koloniestimulierenden Faktoren und Interleukinen auch Substanzen wie der Hepatozytenwachstumsfaktor, der Tumornekrosefaktor (TNF)- α , SCF und der Stromazellfaktor SDF-1. Durch vielfältige Wechselwirkungen von hämatopoetischen Zellen, Stromazellen und Zytokinen werden zelluläre Adhäsion, Migration, Wachstum, Differenzierung sowie Apoptose gesteuert. Dabei spielen Adhäsionsmoleküle (Rezeptoren) auf der zellulären Oberfläche eine entscheidende Rolle, denn sie sind es, die sowohl den Kontakt zu anderen Zellen und Matrixmolekülen als auch die Interaktion mit Zytokinen vermitteln. Auf der Oberfläche hämatopoetischer Zellen wurden bislang Integrine, Selektine, Sialomucine (z.B. CD34), Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, Glycoproteine (z.B. CD44) und Zytokinrezeptoren nachgewiesen. Das Muster der Oberflächenrezeptor-Expression hängt vom Typ und vom Differenzierungsgrad der hämatopoetischen Zellen ab, so dass Zellen anhand ihres Rezeptormusters charakterisiert werden können. Beispielsweise wird CD34 nur von Stammzellen und nicht mehr von ausdifferenzierten Zellen exprimiert und gilt daher als Stammzellmarker. Ähnlich verhält es sich mit CD44, das von Vorläuferzellen aller drei myeloischen Linien, also der Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese, stark exprimiert wird und dessen Expression im Rahmen der Granulo- und Erythropoese abnimmt [1, 52-55].

Bei Leukämien handelt es sich um maligne Neoplasien des hämatopoetischen Systems. Man unterscheidet akute von chronischen und je nach betroffener Zellreihe myeloische von lymphatischen Formen. Die Pathogenese akuter myeloischer Leukämien (AML) ist gekennzeichnet durch eine klonale neoplastische Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen. Für diese Zellen ist ein Differenzierungsblock charakteristisch; dieser befindet sich je nach Subtyp in unterschiedlichen Stadien der Reifung und wird nach der Französisch-Amerikanisch-Britischen Kooperationsgruppe (FAB) zur Einteilung der AML in acht Unterformen (AML-M0 bis M7) herangezogen. Die Erkrankung wird von einer Population von Zellen unterhalten, die neben dem Differenzierungsblock ein enthemmtes Wachstum aufweisen und daher stark

expandieren. Dadurch akkumulieren unreife Vorläuferzellen im Knochenmark und verdrängen die normale Hämatopoese. Klinisch resultieren Zeichen der Knochenmarkinsuffizienz, d. h. Anämie, Blutungs- und Infektneigung. Fakultativ kommt es zur Ausschwemmung maligner Zellen ins periphere Blut und zur Absiedlung in extramedulläre Organe. In diesen Fällen wird die gestörte Interaktion zwischen den Zellen und der Matrix, die nicht nur für Leukämien, sondern für Tumore im Allgemeinen kennzeichnend ist, besonders deutlich, da normale hämatopoetische Vorläuferzellen das Knochenmark nicht verlassen können. Bei Leukämien hingegen ist die zelluläre Adhäsion an Bestandteile der EZM des Knochenmarks gestört. Dies geht mit einer veränderten Regulation des Zellverhaltens insgesamt einher, d.h. auch Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose werden beeinflusst. Strukturelle und funktionelle Veränderungen lassen sich sowohl bei den Zellen als auch in der EZM nachweisen. Dabei ist noch unklar, welche Erscheinungen primär und welche sekundär sind. Außerdem konnte bislang noch kein AML-typisches, einheitliches Deviationsmuster von Zellen oder EZM festgestellt werden, was den heterogenen Charakter dieser Erkrankung verdeutlicht. Bekannt ist beispielsweise, dass AML-Blasten gegenüber normalen Zellen eine veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren aufweisen. Beispielsweise exprimieren normale CD34-positive Zellen nicht gleichzeitig die Integrin-Kette CD11b, ein Marker für reife Monozyten und Granulozyten, AML-Blasten hingegen schon. Ebenso exprimieren myeloische Vorläuferzellen normalerweise kaum CD44-Isoformen, bei AML hingegen schon. Die bei Leukämien beobachteten Veränderungen der Knochenmark-Matrix betreffen die Anzahl an Stromazellen und produzierten Zytokinen, beide sind verringert.

Typisch für hämatologische Neoplasien einschließlich der AML ist das Vorliegen von strukturellen Chromosomenaberrationen. Am häufigsten sind Translokationen nachweisbar, seltener sind Insertionen oder Deletionen. Durch die genannten Vorgänge gehen Proto-Onkogene in Onkogene über; dies sind physiologischerweise im Genom vorhandene Gene, deren Produkte oft starke Strukturhomologien zu Transkriptionsfaktoren aufweisen und an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt sind. Durch die Aberration werden sie verstärkt exprimiert, was Störungen des Wachstums- und Proliferationsverhaltens der Zellen nach sich zieht. Leukämiezellen sind außerdem in der Lage, ihr Wachstum autokrin oder parakrin zu regulieren. Hinweise dafür liefert u. a. der Befund, dass Leukämiezellen oftmals Gene für von ihnen benötigte Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF, exprimieren [56-60].

Ein möglicher, aus der Pathogenese ableitbarer Therapieansatz der AML besteht in einer Differenzierungsinduktion sowie Wachstumshemmung der unreifen Vorläuferzellen. Dies ist bislang nur durch Retinolsäure bei der akuten Promyelozytenleukämie (AML-M3) klinisch verfügbar. Bei der Suche nach Alternativen zu Retinolsäure fand man heraus, dass auch CD44-spezifische monoklonale Antikörper (Klone H90 bzw. A3D8) die Differenzierung frisch isolierter AML-Zellen der Subtypen M1-M5 bzw. Zellen mehrerer AML-Modelle (HL60 als Modell für AML-M2; NB4 als Modell für AML-M3 und THP-1 als Modell für AML-M5) induzieren und ihr Wachstum inhibieren können. Der Differenzierungsblock der sehr unreifen KG1a-Zelllinie (AML-M0) konnte nur durch eine Kombination von CD44-Antikörper mit Retinolsäure überwunden werden, die für sich alleine diesen Effekt nicht bewirken konnte. Auch Hyaluronsäure, ein Hauptbestandteil der EZM und bekannter Ligand von CD44, war in der Lage, in primären Zellen der AML-Subtypen M1, M2 und M5 Differenzierung zu induzieren [24, 56, 61-63].

1.4. Fragestellung

Diese Befunde führten zu der Frage, ob auch Kollagen XIV das Wachstum von AML-Zellen inhibieren kann. Die Fragestellung wurde in dieser Arbeit in folgende Teilaspekte untergliedert, die sukzessive untersucht wurden:

1. Exprimieren die ausgewählten Tumorzelllinien CS-1, U937 und HT1080 den potentiellen Rezeptor für Kollagen XIV, CD44?
2. Welche Methode ist geeignet, das Wachstum der verwendeten Zelllinien zu messen?
3. Beeinflusst immobilisiertes Kollagen XIV die Proliferation dieser Zelllinien?
4. Welcher Einfluss kommt dabei der Zelldichte, der Kulturdauer und dem Serumgehalt des Mediums zu?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Lösungen und Medien

	Hersteller
[6- ³ H]-Thymidin, spezifische Aktivität 5 Ci/mmol, sterile Lösung in PBS	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Cacodylsäure, Natriumsalz, Trihydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Diethylaminoethyl(DEAE)-Zellulose	Sigma, Deisenhofen, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Essigsäure (HAc)	Merck
Ethanol, absolut	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen Life Technologies, Groningen, Niederlande
Glutaraldehyd	Merck
Grundmedium: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I	Invitrogen Life Technologies
Grundmedium: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit 25 mM HEPES	Invitrogen Life Technologies
Harnstoff	Merck
Isopropanol	Merck
L-Glutamin, 200 mM, sterile Lösung	Biochrom, Berlin, BRD
NaCl	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat, 100 mM, sterile Lösung	Biochrom
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma
Penicillin-/Streptomycin, 10.000 U/10 mg/ml, sterile Lösung	Biochrom
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ , pH 7,2 (PBS), steril	Biochrom
Propidiumiodid (PI)	ICN Biochemicals, Costa Mesa, USA
Salzsäure (HCl)	Merck
Serum-Albumin vom Rind (BSA)	Dade Behring, Marburg, BRD
Stickstoff, flüssig	Messer Giesheim, Oberhausen, BRD

	Hersteller
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma
Szintillatorcocktail, Betaplate Scint	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Merck
Trypanblau, 0,5% (w/v) in PBS	Biochrom
Trypsin/EDTA (0,05%)/(0,02%), sterile Lösung	Biochrom
Trypsininhibitor aus Sojabohne	Sigma
Vitamin C	Sigma

2.2. Geräte und Materialien

	Hersteller
Amicon-Ultrazentrifugationseinheit, molekulare Ausschlussgröße: 10 kDa	Millipore, Bedford, USA
Anlage zur Herstellung von deionisiertem Wasser (Milli-Q-RG)	Millipore
Begasungsbrutschrank B 5060 EK-CO2	Heraeus, Hanau, BRD
<i>Cell Harvester</i> 1295-001	LKB Wallac, Turku, Finnland
Combitips für Multipette, steril	Eppendorf, Hamburg, BRD
<i>Dewar</i> -Gefäß, Nalgene	Nunc, Roskilde, Dänemark
Durchflusszytometer FACScan mit CellQuest® Software	Becton Dickinson, San Jose, USA
Einwegpipetten, steril	Becton Dickinson
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories, Burlington, USA
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel, BRD
Flüssigkeitsszintillationszähler 1205 Betaplate	LKB Wallac
Folienschweißgerät für Probenbeutel	LKB Wallac
Glasfaser-Filtermatte	LKB Wallac
Kryoröhrchen, steril	Nunc
Kühlschrank, +4°C	Bosch, Stuttgart, BRD
Kühlzentrifuge GPKR mit Zentrifugeneinsatz für Zellkulturplatten	Beckman Instruments, Palo Alto, USA

	Hersteller
Kühlzentrifuge Minifuge RF	Heraeus
Mehrkanalpipette	Labsystems, Hayward, USA
Mikrowelle Mikro-Chef, 175 W	Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande
Multipette	Eppendorf
Phasenkontrastmikroskop Labovert FS mit Wild MPS 46 Photoautomat	Wild Leitz, Heerbrugg, Schweiz
Probenbeutel für Glasfaser-Filtermatte	LKB Wallac
Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie	Becton Dickinson
Schüttelautomat TPM-2	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Sicherheitswerkbank BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim, BRD
Spritzenvorsatzfilter, Porengröße 0,22 µm, modifiziertes Zelluloseazetat (Rotrand)	Schleicher & Schüll
Spritzenvorsatzfilter, Porengröße 0,22 µm, Polyvinylidenfluorid (Millex GV)	Millipore
Temperierbares Wasserbad, Typ U3	Julabo, Seelbach, BRD
Tiefkühlschrank (-80 °C), Forma 900 ULT Plus	Life Sciences, Frankfurt/M., BRD
Tiefkühlschrank, -20°C	Bosch
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, BRD
Zellkulturflaschen, Bodenfläche 75 cm ²	Nunc
Zellkulturplatten, 96-Loch, flacher Boden, Fläche 0,32 cm ² /Loch, Polystyrol,steril	Becton Dickinson
Zellstofflagen, steril	Johnson&Johnson, Fremont, USA
Zentrifuge J2-21M/E	Beckman Instruments
Zentrifugenröhrchen, 50 ml, Polypropylen	Becton Dickinson

2.3. Antikörper und Kollagen XIV

Antigen	Herkunft, Subtyp	Klon	Markierung	Hersteller
CD44	Maus, IgG	DF1485	FITC	Dako, Glostrup, Dänemark
Negativkontrolle	Maus, IgG1	polyklonal	FITC	Immunotech Marseille,F

Es wurde humanes, gereinigtes Kollagen XIV aus Plazenten verwendet. In der SDS-PAGE wurde die Reinheit, insbesondere von Laminin und Fibronectin, dokumentiert. Es wurde bis zum Gebrauch in Konzentrationen von 100-200 µg/ml in Tris-Harnstoffpuffer bei -20 °C gelagert. Die Präparation erfolgte in der eigenen Arbeitsgruppe (Dissertation Tobias Ehnis, Freie Universität Berlin).

2.4. Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Wachstum	Literatur
HT1080 (ATCC CCL-121)	humanes Fibrosarkom	adhärent	[64]
CS-1	AML-M5a	in Suspension	[65]
U937 (DSMZ ACC 5)	Myelomonozytische Leukämie	in Suspension	[66]

CS-1-Zellen sind Modell für eine AML des Subtyps M5a. Sie exprimieren den myelomonozytischen Marker CD13 und die Progenitorantigene CD33, CD34 und HLA-DR. Die Expression des SCF-Rezeptors c-kit ist sehr stark, die der Zelladhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD58 in Abwesenheit von SCF mäßig. Die Reifungsmarker CD14 und CD15 werden nicht exprimiert. Die Zellen sezernieren kein SCF. Sie haben eine sphärische Form und wachsen einzeln oder in kleinen Clustern in Suspension mit einer Generationszeit von $57,6 \pm 10,8$ h [65].

U937-Zellen stammen aus Zellen eines histiozytisches Lymphoms und gelten als Modell für eine myelomonozytische Leukämie. Sie haben eine rundlich-ovale Form und wachsen in Einzellzell-Suspension mit einer Populations-Verdopplungszeit von 30-40 h. Ebenso wie CS-1 exprimieren sie CD13, CD33, CD34 und zeigen kein CD14. Im Gegensatz zu CS-1 tragen U937-Zellen den Marker für reife Granulozyten, CD15 [66].

HT1080-Zellen sind ein Modell für humanes Fibrosarkom und wachsen einschichtig-adhärenz ohne Kontaktinhibition. Dabei sitzen sie dem Plastik des Zellkulturplattenlochs längsoval auf, um sich bei Überkonfluenz abzulösen und eine sphärische Form anzunehmen. Ihre Populations-Verdopplungszeit beträgt 26 h [64].

2.5. Zellkultur

2.5.1. Medien für die Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten fanden grundsätzlich in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung statt. Die Standardbedingungen im Brutschrank waren sowohl bei der Kultur von Zellen als auch bei der Durchführung von Versuchen 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit.

Das Kulturmedium für Suspensionszellen enthielt Grundmedium RPMI 1640, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Das Kulturmedium für adhärenente Zellen enthielt Grundmedium DMEM, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 mg/l Vitamin C.

Vor der Verwendung in Zellkulturmedien wurde tief gefrorenes FKS bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Inaktivierung des Komplements anschließend für 30 min bei 56°C inkubiert [67]. Den Medien wurde hitzeinaktiviertes FKS in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

FKS (% v/v)	Bezeichnung des Mediums	
	für Suspensionszellen „1“	für adhärenente Zellen „2“
10,0	1/10	2/10
5,0	1/5	2/5
2,0	1/2	-
0,5	1/0,5	2/0,5
ohne	-	2/0

2.5.2. Standardzellkultur von Suspensionszellen

Medien: Medium 1/10

Geräte: Begasungsbrutschrank, Kühlzentrifuge GPKR, Sicherheitswerkbank

CS-1-Zellen aus der Kultur wurden gezählt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.500 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurde der Überstand dekantiert, die Zellen mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in frischem Medium 1/10 resuspendiert und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Das Gesamtvolumen betrug 20 ml.

U937-Zellen wurden im Volumenverhältnis 1:10 mit frischem Medium 1/10 in neue Kulturflaschen überführt. Medium 1/10 wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ml hinzugegeben. Die Zellkonzentration betrug 2×10^5 Zellen/ml.

Beide Zelllinien wurden in aufrecht stehenden Zellkulturflaschen inkubiert und alle drei bis vier Tage passagiert.

2.5.3. Standardzellkultur adhärenter Zellen

Lösungen und Medien: PBS, Trypsin/EDTA-Lösung, Medium 2/10

Geräte: Begasungsbrutschrank, Phasenkontrastmikroskop,
Zentrifuge Minifuge RF, Sicherheitswerkbank

Medienwechsel: Alle zwei bis drei Tage wurde das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abpipettiert, der Zelloberfläche einmal mit 20 ml PBS gespült und anschließend mit 20 ml frischem Medium 2/10 weiter inkubiert.

Suspendieren und Passagieren: Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen bedeckten die Zellen 80% des Zellkulturplattenbodens (Konfluenz). Das verbrauchte Medium wurde dann abpipettiert, der Zelloberfläche zweimal mit 20 ml PBS gespült und anschließend für 1 min mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Nach Absaugen dieser Lösung wurden die Zellen für eine weitere Minute im Brutschrank inkubiert. Das Abrunden und Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden mit 20 ml Medium vom Boden abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und durch Zugabe von 5 ml Medium eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde zur weiteren Kultur mit frischem Medium im Verhältnis 1:2 bis 1:30 in neue Kulturflaschen überführt. Vor dem Einfrieren oder der Verwendung in einem Versuch wurde durch eine Trypanblau-Vitalfärbung die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt.

2.5.4. Synchronisation adhärenter Zellen

Mesenchymale, adhärent wachsende Zellen können durch Reduktion des Serums in der Kultur in die G₀-Phase des Zellzyklus gebracht werden, was eine sensitivere Untersuchung der Proliferation ermöglicht. Vor der Verwendung in einem Versuch wurden HT1080-Zellen bei einer Konfluenz von 80% einer Serumreduktion unterzogen.

Lösungen und Medien: PBS, Kulturmedium 2/0,5

Geräte: Begasungsbrutschrank

Das Kulturmedium 2/10 wurde abpipettiert und der Monolayer einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml Kulturmedium 2/0,5 wurden die Kulturflaschen weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

2.6. Kryokonservierung von Zellen

Um einer intrazellulären Kristallbildung entgegenzuwirken, sollte das Einfrieren langsam und schrittweise erfolgen. Darüber hinaus verhindert das zugesetzte DMSO eine solche Kristallbildung. Im Gegensatz zum Einfrieren muss das Auftauen der Zellen möglichst rasch erfolgen, um die Exposition der zunehmend stoffwechselaktiven Zellen gegenüber dem auf sie toxisch wirkenden DMSO zu verkürzen.

Suspensionszellen wurden in einem Einfriermedium aus 80% (v/v) FKS und 20% (v/v) DMSO, adhärenente Zellen mit 50% (v/v) DMEM, 45% (v/v) FKS und 5% (v/v) DMSO tiefgefroren.

Medien und Chemikalien: Einfriermedium (80% (v/v) FKS, 20% (v/v) DMSO), Stickstoff (flüssig), Medium 1/10 und 2/10, Ethanol (70% v/v)

Geräte: Dewar-Gefäß, Kryoröhrchen, Kühlzentrifuge GPKR, Tiefkühlschrank -80°C, temperierbares Wasserbad

Suspensionszellen aus der laufenden Kultur wurden gezählt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Sie wurden 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit einer Konzentration von 10⁷ Zellen/0,9 ml in eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig im

Volumenverhältnis 1:1 zu vorgekühltem Medium 1/10 hinzugegeben und durchmischt. Schließlich wurde jedes Kryoröhrchen mit 1,8 ml des Gemisches bzw. 10^7 Zellen befüllt. Nach mindestens 2 h bei -80°C konnten die Röhrchen dauerhaft in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden.

Adhärente Zellen aus der laufenden Kultur wurden in Suspension gebracht und gezählt. Sie wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/0.9 ml in eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig im Volumenverhältnis 1:1 zu vorgekühltem Medium 2/10 hinzugegeben und durchmischt. Jedes Kryoröhrchen wurde mit 1,8 ml der Suspension befüllt und 24 h bei -80°C gekühlt. Danach konnte es dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Zum Auftauen wurde jedes Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C so lange angetaut, bis nur noch ein Kegel gefrorener Zellen in der Mitte des Röhrchens verblieb. Vor dem Öffnen der Röhrchen wurde das Äußere mit Ethanol (70% v/v) desinfiziert. Sukzessive wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in ein Zentrifugenröhrchen hinüberpipettiert, welches 40 ml des Kulturmediums 1/10 bzw. 2/10 enthielt. Suspensionszellen wurden anschließend 5 min bei 1.500 rpm, adhärente Zellen 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 20 ml des Kulturmediums 1/10 bzw. 2/10 resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Bei adhärenen Zellen wurde am folgenden Tag das Medium gewechselt.

2.7. Zellzählung mit Trypanblau-Vitalfärbung

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff. Zellen mit intakter Plasmamembran, d.h. vitale Zellen, nehmen ihn aufgrund seiner Größe und Ladung nicht auf und erscheinen im Mikroskop ungefärbt. Tote Zellen hingegen werden blau angefärbt. Zum Zählen dient eine Neubauer-Zählkammer (Abbildung 3).

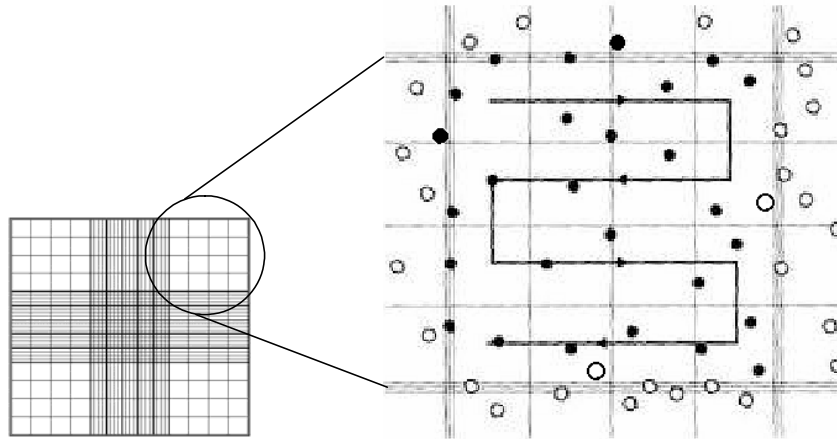


Abbildung 3: Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes der vier äußeren Großquadrate (Ausschnitt) wird mäandrierend ausgezählt (Pfeil). Bei der Zählung werden alle Zellen berücksichtigt, die innerhalb der vier äußeren Großquadrate liegen und keinen Kontakt zu einer Begrenzungslinie aufweisen oder die untere oder rechte Grenzlinie eines solchen Quadrates berühren – gleichgültig, ob von innen oder außen (weiße Punkte). Nicht mitgezählt werden Zellen auf oder an der linken oder oberen Begrenzungslinie (schwarze Punkte).

Lösungen: Trypanblaulösung

Materialien und Geräte: Zählkammer nach Neubauer, Phasenkontrastmikroskop

50 µl Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammer eingefüllt. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden die vitalen, d.h. farblosen Zellen gezählt und die ihre Konzentration (C) mit folgender Formel errechnet:

$$C = z/4 \times 2 \times 10^4$$

Dabei ist z die Summe der in 4 Großquadraten gezählten Zellen, der Divisor 4 entspricht den 4 gezählten Quadraten und der Faktor 2 korrigiert die Verdünnung der Zellsuspension durch die Trypanblaulösung. Der Multiplikator 10^4 dient der Umrechnung von $0,1 \text{ mm}^3$ (dem Volumen eines Großquadrates, Kantenlänge 1 mm, Höhe 0,1 mm) auf 1 ml.

2.8. Vorbehandlung von Zellkulturplatten

Die verwendeten Zellkulturplatten bestanden aus hydrophobem Polystyrol. Für Proliferationsversuche wurden sie zur Hälfte mit Kollagen XIV beschichtet. Dabei ist zu beachten, dass von der einpipettierten Kollagen-Gesamtmasse lediglich ein Anteil von 25% am Zellkulturplattenboden haften bleibt [68]. Ferner verbleiben trotz Beschichtung unspezifische Bindungsstellen. Diese müssen mit inerten Proteinen, wie z. B. BSA, blockiert werden.

Lösungen und Medien: PBS (eisgekühlt), Kollagen XIV-Stammlösung (eisgekühlt),
Blockierungslösung (0,1% (w/v) BSA in PBS)

Geräte: Eisbad, Kühlschrank 4°C, Begasungsbrutschrank

Beschichten der Zellkulturplatten mit Kollagen XIV: Kollagen XIV-Stammlösung wurde mit PBS auf eine Konzentration von 30 µg/ml verdünnt. Die Spalten eins bis einschließlich sechs jeder Zellkulturplatte wurden mit 100 µl dieser Lösung befüllt. Sie wurden anschließend 24 h bei 4°C belassen.

Blockieren nichtspezifischer Bindungsstellen: Das Beschichten der Zellkulturplatten mit Kollagen XIV wurde durch Abkippen der Lösung und Ausschlagen der Platten auf sterilem Zellstoff beendet. Anschließend wurden jeweils 200 µl Blockierungslösung in sämtliche, d.h. auch in nicht mit Kollagen XIV beschichtete Löcher, einpipettiert. Die Platten wurden eine Stunde im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung abgekippt. Jedes Loch wurde zweimal mit 200 µl PBS und abschließend einmal mit 200 µl des für den nachfolgenden Versuch benötigten Mediums gewaschen. Zwischen den Wasch-Schritten wurden die Lösungen durch Abkippen und Ausschlagen der Platten auf sterilem Zellstoff möglichst vollständig entfernt.

2.9. Bestimmung des Proteingehalts mit Sulforhodamin B (SRB)

Wachstum im engeren Sinn meint Zellteilung. Sie führt durch die Bildung neuer Zellen zu einer Vermehrung des Gesamtproteingehalts der Kultur. Darauf beruht die Idee ihrer Messung mittels SRB-Proteinfärbung. Bei dieser Methode wird der Proteingehalt einer Mikrokultur photometrisch gemessen. Skehan, Storeng et al. hatten sie als Zytotoxizitätsmessung für diverse adhärent und in Suspension wachsende Zelllinien

etabliert und festgestellt, dass die gemessene Extinktion direkt proportional zur Zellzahl und zum Proteingehalt der Mikrokultur war [69]. Mit der Methode können die gefärbten Zellen auch morphologisch beurteilt werden.

SRB ist ein Aminoxanthen-Farbstoff, der in saurem Milieu an basische Aminosäurereste von Proteinen bindet. Voraussetzung für die Proteinfärbung ist, dass die Zellen - und somit auch die Proteine - vorher mit TCA fixiert und immobilisiert worden sind. Nach Entfernung des ungebundenen Farbstoffs mit HAc wird mit Tris-Base das SRB freigesetzt. Dann wird die Extinktion jedes Zellkulturplattenlochs bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

Lösungen und Medien: Kulturmedium 1/10, Kulturmedium 2/10, deionisiertes Wasser, 10% (w/v) TCA, 1% (v/v) HAc, 10 mM Tris-Base, SRB-Lösung (0,4% (w/v) SRB in HAc),

Geräte: Begasungsbrutschrank, Zentrifuge Minifuge RF mit Zentrifugeneinsatz für Zellkulturplatten, Schüttelautomat, ELISA-Reader, Phasenkontrastmikroskop

Zellsuspensionen wurden hergestellt, mit einem Volumen von 200 µl/Loch als 3-fach-Werte in Zellkulturplatten einpipettiert und 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturplatten wurden nicht mit Kollagen XIV oder BSA vorbehandelt. Platten, die mit Suspensionszellen befüllt waren, wurden nach Beendigung der Inkubation 10 min bei 1000 rpm ohne Bremse zentrifugiert, um die Adhäsion zu unterstützen. Platten mit adhärent wachsenden Zellen wurden nicht zentrifugiert. Das Medium wurde abgegossen und die Platte so vorsichtig wie möglich auf Zellstoff ausgeschlagen. Pro Loch wurden 100 µl 10% (w/v) TCA hinzupipettiert und 30 min bei RT belassen. Das Fixieren wurde durch Abgießen, fünfmaliges Spülen mit deionisiertem Wasser und anschließendem Lufttrocknen der Platten beendet.

Zu den fixierten Zellen wurden pro Loch 100 µl SRB-Lösung hinzupipettiert, 30 min bei RT belassen und dann abgegossen. Jedes Zellkulturplattenloch wurde 4 Mal mit 1% (v/v) HAc gewaschen, luftgetrocknet und im Phasenkontrastmikroskop auf Qualität und Quantität der enthaltenen, gefärbten Zellen kontrolliert. Es wurden 100 µl 10 mM Tris-Base pro Loch hinzupipettiert und die Platten 5 min bei 500 rpm geschüttelt. Schließlich wurde die Extinktion jedes Lochs bei 560 nm im ELISA-Reader gemessen. Von jedem erhaltenen Messwert wurde der Leerwert subtrahiert. Die Leerwert-Löcher enthielten

ausschließlich Medium und wurden ansonsten wie alle übrigen Löcher behandelt. Die Subtraktion entspricht einer rechnerischen Eliminierung der geringen - aber extinktionswirksamen - Anfärbbarkeit sowohl des Zellkulturplatten-Polystyrols als auch des proteinreichen FKS des Mediums. Die auf diese Weise korrigierte Extinktion ΔE ist proportional zum Proteingehalt der Mikrokultur.

2.10. Bestimmung der DNS-Synthese durch [³H]-Thymidineinbau

Mit Proliferation wird in dieser Arbeit DNS-Neusynthese, d. h. das erneute Durchlaufen der S-Phase des Zellzyklus, bezeichnet. Zur Bestimmung dieses physiologischen Ablaufs werden Nukleoside wie das Thymidin radioaktiv markiert, üblicherweise mit Tritium, einem weichen β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 12,3 Jahren. Anders als die SRB-Färbung misst diese Methode somit Wachstum unabhängig von Zellteilung und Proteingehalt.

Tritiummarkiertes Thymidin wird während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNS eingebaut. Anschließend werden die Zellen durch Einfrieren lysiert, was zum Synthesestop und Freisetzen der DNS führt. Diese wird durch Absaugen auf einem Glasfaserfilter mit hoher Bindungsaffinität für Nukleinsäuren fixiert. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Erste Ernte der DNS bezeichnet.

Durch das Absaugen werden sehr kleine DNS-Stücke und das nicht in DNS eingebaute Thymidin entfernt, da sie nicht auf dem Filter haften. Bekannterweise verbleibt jedoch DNS im Zellkulturplattenloch. Dieses muss zunächst durch partielle alkalische Hydrolyse in Lösung gebracht werden. Es folgt die Neutralisation und das Fixieren auf einem separaten Glasfaserfilter durch Absaugen; dieser Vorgang wird im Folgenden als Zweite Ernte der DNS bezeichnet.

Zu jedem Filter wird ein Flüssigszintillatorcocktail hinzugegeben, der die β -Strahlung der DNS in Szintillationen umwandelt, die im Szintillationszähler als Maß für die DNS-Neusynthese gemessen werden. Die Summe der Messwerte aus erster und zweiter Ernte entspricht dem Gesamt-³H]-Thymidineinbau einer Mikrokultur.

Lösungen und Medien: Kulturmedien 1/10, 1/5, 1/2, 1/0,5, 2/10, 2/5, 2/0,5, 2/0; 25 $\mu\text{Ci/ml}$ [³H]-Thymidin in PBS, PBS, 800 mM HCl, 200 mM NaOH, 10% (w/v) TCA, Flüssigszintillatorcocktail

Geräte: Begasungsbrutschrank, Phasenkontrastmikroskop, Kühlzentrifuge GPKR, Mehrkanalpipette, Cell Harvester, Tiefkühlschrank - 80°C, Zentrifuge Minifuge RF, Folienschweißgerät, Mikrowelle, Szintillationszähler

Um sicherzustellen, dass sie sich bei jedem Versuch in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden Suspensionszellen immer zwei Tage nach dem letzten Umsetzen verwendet. Die Zellen wurden gezählt, die für den Versuch benötigte Zellmenge aus der Kulturflasche entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml des für den jeweiligen Versuch benötigten Kulturmediums (1/10, 1/5, 1/2 oder 1/0,5) resuspendiert. Um die Zellkonzentration exakt einstellen zu können, wurden die Zellen erneut gezählt und mit Medium auf Konzentrationen von 2×10^3 bis 4×10^5 Zellen/200 μ l verdünnt.

Adhärente Zellen wurden zunächst in ihrem Wachstum synchronisiert. Anschließend wurden sie mit dem für den jeweiligen Versuch benötigten Kulturmedium (2/10, 2/5, 2/0,5 oder 2/0) in Suspension gebracht und gezählt. Durch Medienzugabe wurde die Konzentration auf 1×10^3 bis $1,6 \times 10^5$ Zellen/200 μ l Medium eingestellt. Alle Zellsuspensionen wurden kurzfristig bis zu ihrer unmittelbaren Verwendung in einem Zentrifugenröhrchen im Brutschrank aufbewahrt.

Die Zellen wurden entweder in einer einzigen, festgelegten Konzentration oder als serielle Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 2 in beschichtete und blockierte Zellkulturplatten pipettiert. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden zuerst in die Reihen B bis H der Zellkulturplatte 100 μ l/Loch des für den folgenden Versuch benötigten Mediums vorgelegt. In Reihe A wurden pro Loch 200 μ l Zellsuspension vorgelegt und mit der Mehrkanalpipette mehrfach durchmischt. Es wurden 100 μ l/Loch entnommen und in Reihe B überpipettiert, wo erneut durchmischt wurde. So wurde bis einschließlich Reihe H verfahren, wo nach Durchmischung ebenfalls nur 100 μ l Volumen verblieben und die übrigen 100 μ l verworfen wurden. Schließlich wurde jedes Loch mit 100 μ l Medium auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Die Zellkulturplatten wurden zum Schutz vor Kontamination in Aluminiumfolie eingeschlagen und im Brutschrank inkubiert. Für die letzten 4 bis 18 h Wachstumszeit wurden zu jeder Mikrokultur 0,5 μ Ci [3 H]-Thymidin in 10 μ l PBS hinzu gegeben. Danach

wurden die Zellen lichtmikroskopisch begutachtet und die Platten mindestens 4 h bei -80°C eingefroren.

Die Zellkulturplatten wurden im Brutschrank bei 37°C innerhalb einer Stunde aufgetaut. Mit Hilfe des *Cell Harvesters* wurde der lösliche Inhalt jedes Lochs auf ein dieses Loch repräsentierendes Feld der Glasfaserfiltermatte übertragen und mit deionisiertem Wasser gespült. Nach der ersten Ernte wurde jede Platte über Zellstoff abgekippt, um verbliebenes Spülwasser zu entfernen. Pro Loch wurden 200 µl 10% (w/v) TCA vorsichtig hinzupipettiert und 30 min bei RT belassen. Das Fixieren wurde durch Ausklopfen der Platten auf Zellstoff beendet. In jedes Loch wurden 50 µl 200 mM NaOH pipettiert und für 30 min bei RT belassen. Die alkalische Hydrolyse wurde durch Hinzufügen von 50 µl 800 mM HCl gestoppt. Anschließend wurde mit Hilfe des *Cell Harvesters* der Inhalt jedes Lochs auf einen neuen Glasfaserfilter gebracht.

Jede Filtermatte wurde in der Mikrowelle 20 min bei 175 W getrocknet, in einen Probenbeutel verpackt und nach Zugabe von 12 ml Flüssigszintillatorcocktail mit einem Folienschweißgerät verschlossen. Die von jedem Filterfeld emittierte β -Strahlung wurde als radioaktive Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen.

2.11. Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden Zellen aus einer Suspension einzeln an einer Laser-Lichtquelle vorbeigeführt. Im Kreuzungspunkt von Lichtstrahl und Zelle entsteht Streulicht, das in unterschiedlichen Raumwinkeln abgelenkt wird. Bei Leukozyten beispielsweise wird im Engwinkel die Zellgröße und im rechten Winkel die Granulierung der Zellen gemessen. Zudem können zelluläre Antigene mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Der Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Fluorescein-Isothiozyanat (FITC), muss ein Absorptionsmaximum haben, das der Wellenlänge des verwendeten Laserlichts entspricht. Die Fluoreszenzintensität wird simultan zum oben erwähnten Streulicht gemessen. Unter der Voraussetzung vollständig mit Antikörper gesättigter Zelloberflächenmarker ist die Fluoreszenzintensität der Einzelzelle direkt proportional zu Antigengehalt und -dichte der Zelloberfläche. Um vom Antigengehalt einer Einzelzelle auf den der gesamten Zellpopulation schließen zu können, wird aus den Fluoreszenzintensitäten aller Zellen der arithmetische Mittelwert gebildet und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bezeichnet (Abbildung 4). Die

Wellenlänge des hier verwendeten Argonlasers betrug 488 nm, das Emissionsmaximum von FITC liegt bei 515 nm [67, 70].

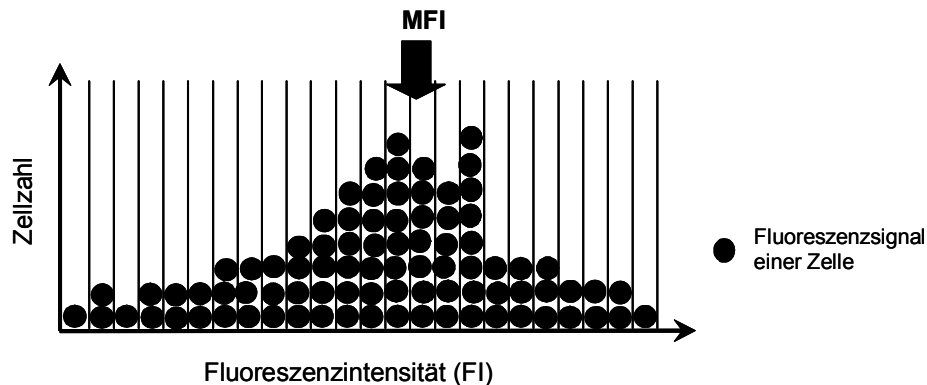


Abbildung 4: Relativer Antigengehalt einer Zellpopulation (schematisch). Die Intensität der von jeder gefärbten Zelle emittierten Fluoreszenz (FI) wird separat erfasst und ist ein Maß für den individuellen Antigengehalt. Alle Zellen mit gleicher FI bilden eine Säule und diese in ihrer Verteilung ein Kurvendiagramm.

Die Antikörper können unspezifisch an tote Zellen oder über die Interaktion mit zellulären Fc-Rezeptoren gebunden werden. Die Bindung an tote Zellen kann mit dem DNS-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI), der durch nicht-intaktes Plasmalemma toter Zellen diffundiert, unterschieden werden. Bei der Auswertung werden dann nur PI-ungefärbte Zellen berücksichtigt. Zum Block von Fc-Rezeptoren verwendet man einen Überschuss irrelevanter Immunglobuline z.B. aus Kaninchenserum.

Lösungen und Medien: FACS-Puffer (0,5% (w/v) BSA, 0,01% (w/v) NaN_3 in PBS), Kaninchenserum, Antikörperlösungen, PI-Lösung (0,05 mg/ml PI in FACS-Puffer)

Geräte: Kühlzentrifuge GPKR, FACS-Scan

Suspensionszellen wurden aus der kontinuierlichen Kultur direkt entnommen, adhärenente Zellen wurden zunächst in Suspension gebracht. Je Ansatz wurden 2×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 2 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Waschlösung wurde 5 min bei 1.500 rpm abzentrifugiert und das Röhrchen auf Zellstoff ausgetropft. Das Zellsediment wurde in 50 μl Kaninchenserum, bei dem zuvor das Komplement durch 30 min Inkubation bei 56°C inaktiviert worden war, gelöst. Die FITC-konjugierten Antikörper wurden in einem Volumen von 20 μl zu der Zellsuspension

hinzupipettiert. Nach 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 2 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 100 µl PI-Lösung resuspendiert und 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Sie wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für die sich anschließende durchflusszytometrische Messung in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, BRD). Die Standardabweichung vom Mittelwert (SA) wurde bei mindestens sechs parallelen Proben nach der folgenden Formel abgeschätzt:

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

(n = Anzahl der Proben, x_i = Einzelmesswert, x_{quer} = arithmetischer Mittelwert (MW))
Stichprobenpaare in den Kurvendiagrammen wurden nur dann getestet, wenn sie eines der beiden folgenden Kriterien erfüllten: Die Standardabweichungen des Stichprobenpaares berührten oder überschritten sich nicht. Berührten oder überschritten sich die Standardabweichungen des Stichprobenpaares, durfte der Mittelwert einer Stichprobe nicht innerhalb der doppelten Standardabweichung der anderen Stichprobe liegen.

Waren die Stichprobenwerte normalverteilt, wurde ein t-Test für zwei unabhängige Stichproben angewandt; waren sie nicht normalverteilt, ein Mann-Whitney Rangsummen-Test. Ein Testergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde per Vereinbarung als signifikant (**), eines mit $p \leq 0,001$ als hochsignifikant (***) bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von CD44 auf humanen Tumorzelllinien

Zunächst war zu klären, ob die ausgewählten Zelllinien CD44, den potentiellen Rezeptor für Kollagen XIV, exprimieren. Eine durchflusszytometrische Analyse mit einem monoklonalen CD44-Antikörper zeigte für die myeloischen Zelllinien CS-1 und U937 sowie für die Fibrosarkomzelllinie HT1080 folgende Resultate (Abbildung 5).

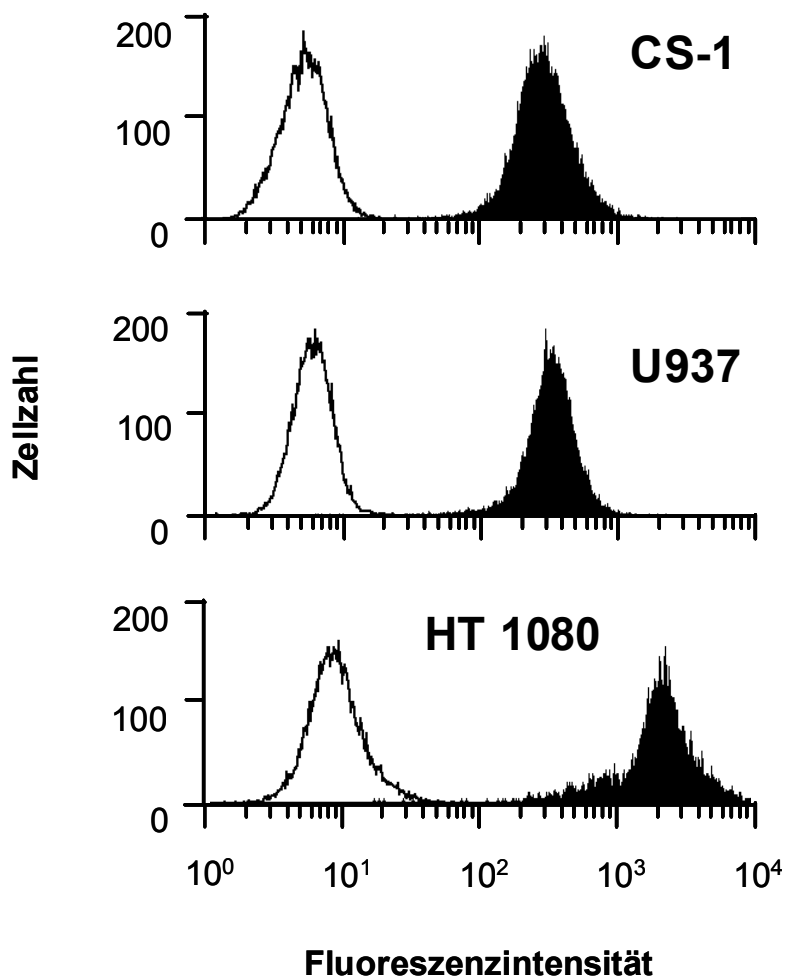


Abbildung 5: CD44-Expression humaner Tumorzelllinien. Aus der fortlaufenden Kultur der Zelllinien CS-1, U937 und HT1080 wurden jeweils 2×10^5 Zellen mit einem FITC-gekoppelten, CD44-spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon DF1485) 20 min inkubiert (schwarz). Irrelevantes Maus-IgG1 (weiß) diente als Negativkontrolle. Die FI vitaler Zellen wurde nach Gegenfärbung mit PI durchflusszytometrisch bestimmt.

Auf allen untersuchten Zelllinien wurde CD44 nachgewiesen, so dass die ausgewählten Zellen für Untersuchungen mit Kollagen XIV geeignet erschienen. Der Kurvenverlauf zeigt, dass der Rezeptor in der jeweiligen Zellpopulation mit einheitlicher Dichte

exprimiert wird. Mit einer MFI von 320 exprimierten U937-Zellen den Rezeptor am geringsten. CS-1-Zellen zeigten eine um 16% höhere Expression (MFI 370). Die höchste CD44-Rezeptordichte besaßen HT1080-Zellen. Mit einer MFI von 2.228 war sie 6-7fach höher als bei den Leukämiezelllinien.

3.2. Zellzahlbestimmung mit SRB

Da sich bei den laufenden Versuchen Zeichen einer Adhäsion der sonst eigentlich in Suspension wachsenden CS-1-Zellen an Kollagen XIV fanden, wurde geprüft, ob nicht die SRB-Proteinfärbung zur Wachstumsmessung dieser Zelllinie geeignet wäre. SRB ist zur Wachstumsmessung verschiedener, sowohl adhärent als auch in Suspension wachsender Zelllinien, etabliert.

CS-1-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe ausgesät und der Proteingehalt durch Färbung mit SRB gemessen. Als Kontrolle wurden adhärent wachsende HT 1080-Zellen gefärbt. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse von jeweils zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

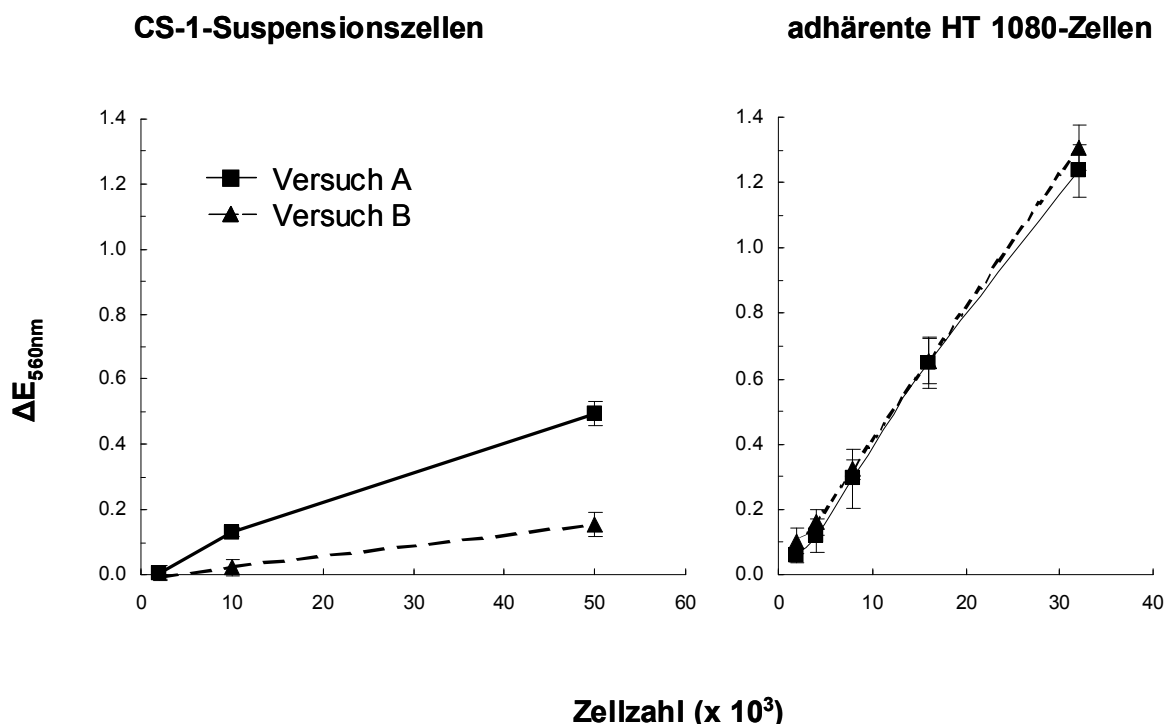


Abbildung 6: Beziehung von Zellzahl und Extinktion nach SRB-Färbung. CS-1- und HT 1080-Zellen wurden in jeweils unterschiedlicher Konzentration für 2 h in Medium mit 5% FKS inkubiert. Nach 2 h wurde der Zellrasen in den Mikrokulturen mit SRB gefärbt und die Extinktion bei 560 nm als Maß für den Proteingehalt photometrisch gemessen. Vor der TCA-Fixierung wurden die mit CS-1-Suspensionszellen befüllten Kulturplatten 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Jeder Punkt repräsentiert den MW ± SA aus drei Mikrokulturen.

Bei den Suspensionszellen zeigte sich eine recht große Schwankung der Extinktion zwischen den Versuchen. Zudem lagen die maximalen Extinktionswerte weit unter denen, die mit adhärennten Zellen erreicht wurden; lichtmikroskopisch waren nur noch vereinzelt Zellen in den vormals dicht befüllten Zellkulturplattenlöchern sichtbar.

Bei den HT 1080-Zellen nahm die Extinktion proportional zur eingesetzten Zellzahl zu. Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse war groß, wie die nahezu identische Steigung und maximal erreichte ΔE_{560} nm der einzelnen Versuche belegen. Auch bei hohen Zellzahlen führte das Waschen der Zellen nicht zu relevanten Verlusten. Dies belegt die Eignung der Methode zur Quantifizierung von adhärennten HT 1080-Zellen, nicht jedoch der in Suspension wachsenden CS-1-Zellen.

3.3. Wachstumsmessung humaner Tumorzelllinien mit [³H]-Thymidineinbau

Neben der oben beschriebenen Zellzahlbestimmung durch SRB-Färbung wurde Zellwachstum über den [³H]-Thymidineinbau gemessen. Eine zusammenfassende Darstellung des experimentellen Vorgehens bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Variation der Kulturparameter in Proliferationsexperimenten mit CS-1-, U937- und HT1080-Zellen

	Ausgangszellzahl pro Mikrokultur	Inkubationszeit (h)	FKS- Konzentration (%)
CS-1	1,6 x 10 ³ - 2,0 x 10 ⁵ 3,9 x 10 ² - 5,0 x 10 ⁴	66 und 162	10 und 5
U937	1,6 x 10 ³ - 2,0 x 10 ⁵ 8,0 x 10 ¹ - 1,0 x 10 ⁴	66 und 114	10 und 2
HT1080	6,3 x 10 ² - 8,0 x 10 ⁴	12 und 60	0,5

3.3.1. Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei CS-1-Zellen

Ausgehend von den Erfahrungen aus Proliferationsexperimenten mit anderen Zelllinien wurden für die ersten Versuche 2x10⁵ CS-1-Zellen pro Mikrokultur für eine Gesamtinkubationszeit von 48 h in Medium mit 10% FKS ausgesät (nicht gezeigt). Die Versuche zeigten widersprüchliche, nicht-reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der

Wirkung von Kollagen XIV auf die Proliferation. Es schien eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen Proliferationsrate von der ausgesäten Zelldichte und Kulturdauer zu bestehen. Um diesen Zusammenhang systematisch erfassen zu können, wurden CS-1-Suspensionszellen für die nachfolgenden Versuche in einer Verdünnungsreihe über einen weiten Konzentrationsbereich ausgesät (Abbildung 7).

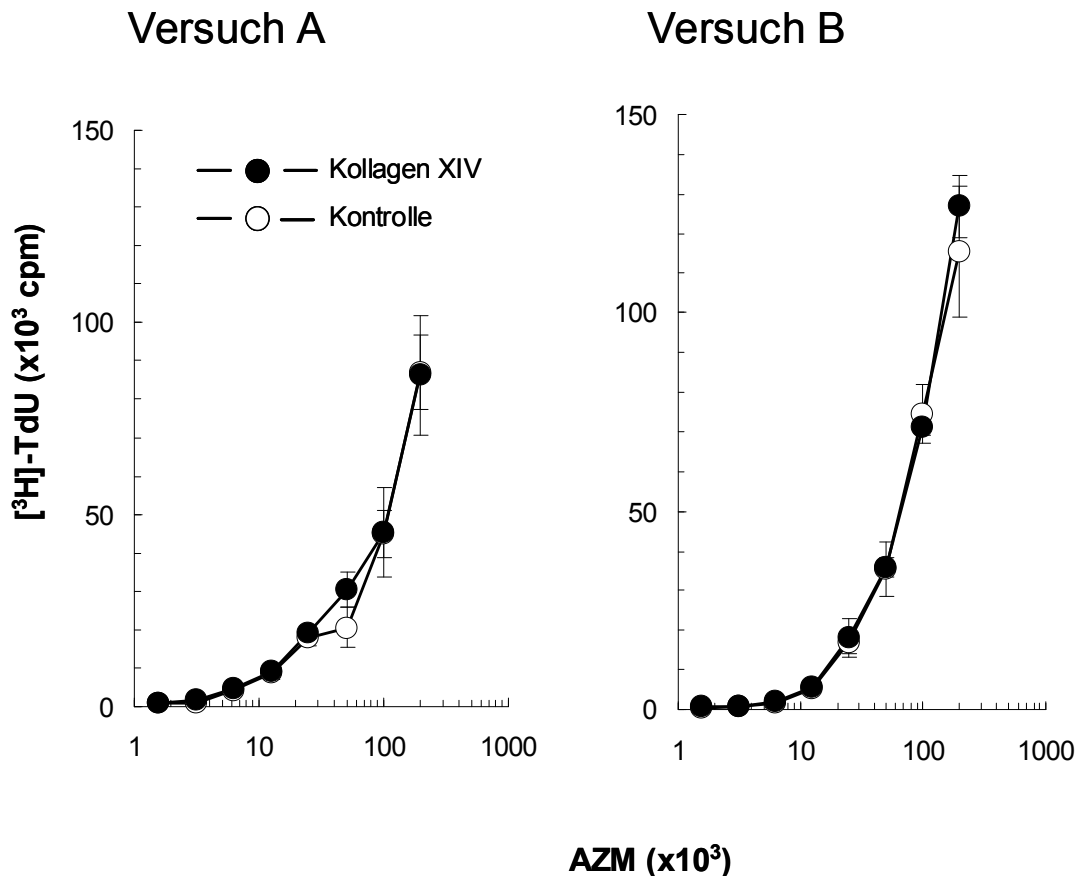
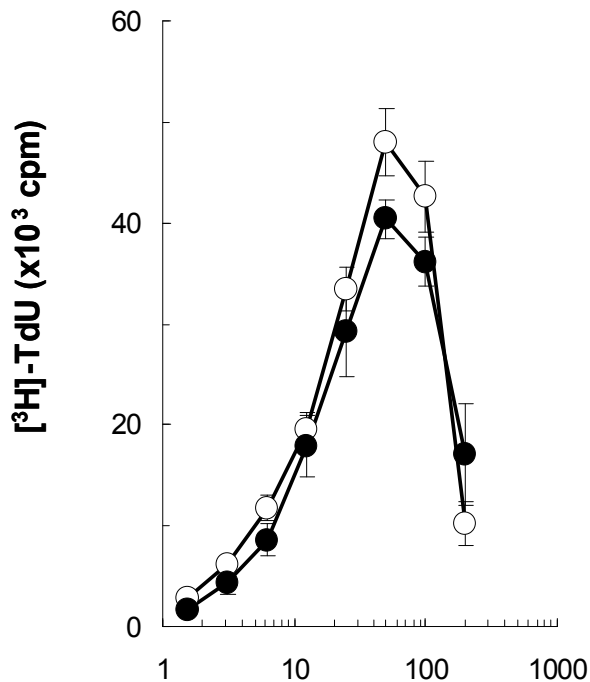


Abbildung 7: Wirkung von Kollagen XIV auf CS-1-Zellen nach 66 h Inkubation. CS-1-Zellen wurden jeweils 48 h in Medium mit 10% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h 0,5 µCi [³H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW ± SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

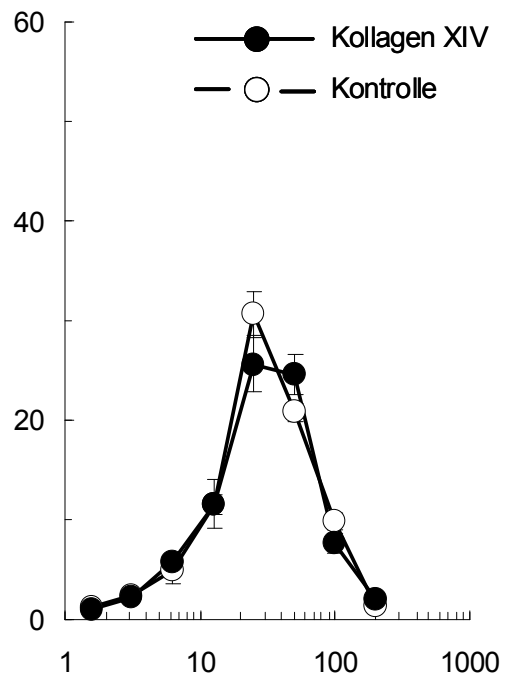
Bei der kurzen Kulturdauer von 66 h beeinflusste Kollagen XIV die Proliferation nicht. Die Kulturbedingungen waren bei keiner AZM wachstumslimitierend, erkennbar an dem Anstieg der Kurven.

Es resultierte die Frage, ob eine Verlängerung der Kulturdauer zu der hypothetisierten Reduktion der Proliferation in Gegenwart von Kollagen XIV führen würde. Es wurde ein Zeitraum von 162 h gewählt (Abbildung 8).

Versuch A



Versuch B



AZM (x10³)

Abbildung 8: Wirkung von Kollagen XIV auf CS-1-Zellen nach 162 h Inkubation. CS-1-Zellen wurden jeweils 144 h in Medium mit 10% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h 0,5 µCi [³H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW ± SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

In beiden hier gezeigten Versuchen reduzierte Kollagen XIV die Zellproliferation. In Versuch A betrug der maximale Effekt 14% gegenüber der Kontrolle (AZM 5x10⁴), in Versuch B 16% (AZM 2,5x10⁴); jeweils berechnet als Differenz der Mittelwerte. In den Mikrokulturen mit hoher Ausgangszellzahl sank der pH-Wert des Kulturmediums während der Inkubation, erkennbar am Umschlag des pH-Farbindikators des Mediums und am Abknicken der Kurven - in Versuch A ab einer AZM von mehr als 5x10⁴, in Versuch B von mehr als 2,5x10⁴.

Als Konsequenz für nachfolgende Versuche wurde die lange Inkubationszeit von 162 h beibehalten und die AZM auf maximal 5x10⁴ begrenzt.

3.3.2. Serumreduktion bei CS-1-Zellen

Um den Einfluss von FKS auf die Proliferation von CS-1-Zellen zu reduzieren und damit den Effekt von Kollagen XIV besser untersuchen zu können, wurden Versuche mit reduzierter FKS-Volumenkonzentration im Kulturmedium durchgeführt (Abbildung 9).

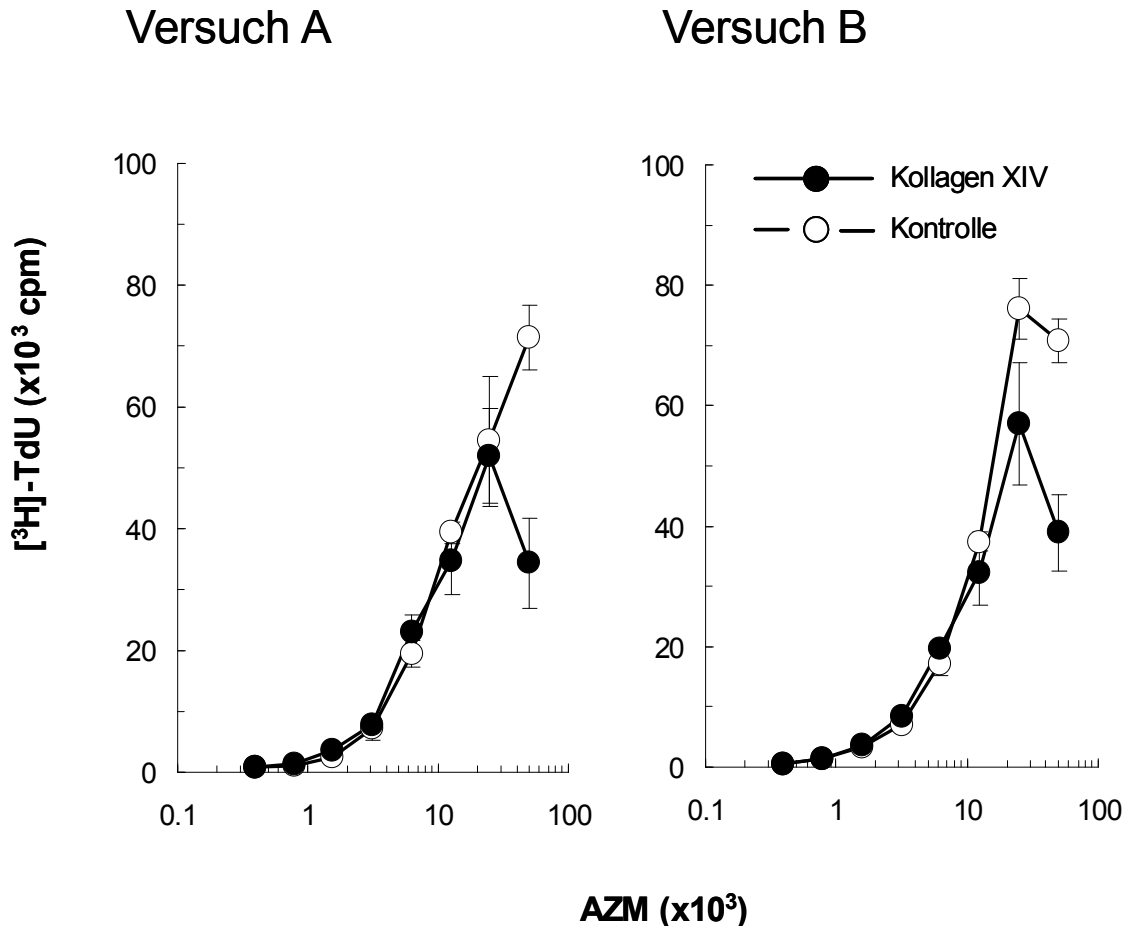


Abbildung 9: Einfluss einer Serumreduktion auf den Kollagen XIV-Effekt bei CS-1-Zellen. CS-1-Zellen wurden jeweils 144 h in Medium mit 5% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h $0,5 \mu\text{Ci}$ [^3H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den $\text{MW} \pm \text{SA}$ aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

In den gezeigten Versuchen wurde der maximale Kollagen XIV-Effekt durch die Serumreduktion auf 5% verstärkt. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Kollagen XIV betrug die Proliferationsreduktion in Versuch A maximal 52% (AZM 5×10^4), in Versuch B maximal 25% (AZM $2,5 \times 10^4$). Die maximale Reduktion der Proliferation war statistisch hochsignifikant. In Versuch A waren die Kulturbedingungen nicht wachstumslimitierend, erkennbar am kontinuierlichen Anstieg der Kontrollkurve. In Versuch B hingegen wurde bei einer AZM von 5×10^4 das Kulturmedium in den Ansätzen mit und ohne Kollagen XIV

verbraucht, erkennbar am Absinken beider Kurven. Zur statistischen Auswertung vergleiche Tabelle 2.

3.3.3. Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei U937-Zellen

Der Nachweis eines Effekts von Kollagen XIV auf CS-1-Zellen warf die Frage auf, ob auch andere Leukämiezellen in ihrer Proliferation inhibiert werden können. Analog zu dem Vorgehen bei CS-1-Zellen wurden bei der Zelllinie U937 zunächst die Parameter Zellzahl und Inkubationszeit optimiert und anschließend der Einfluss einer Serumreduktion untersucht.

U937-Suspensionszellen wurden in einer Verdünnungsreihe über einen weiten Konzentrationsbereich ausgesät und anschließend 66 h in Medium mit 10% FKS inkubiert (Abbildung 10).

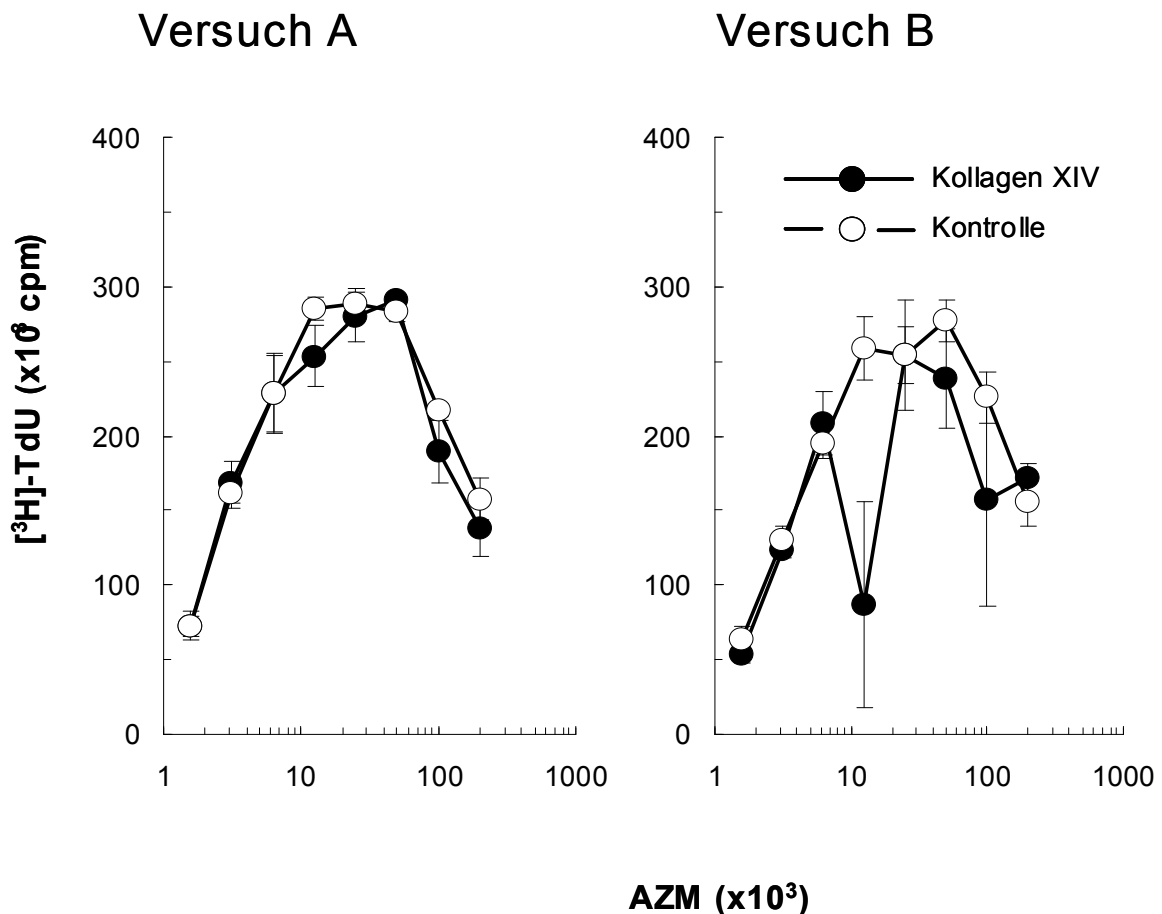


Abbildung 10: Wirkung von Kollagen XIV auf U937-Zellen nach 66 h Inkubation. U937-Zellen wurden jeweils 48 h inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h 0,5 µCi [³H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW ± SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

Bei der kurzen Kulturdauer von 66 h beeinflusste Kollagen XIV die Proliferation nicht. In beiden Versuchen kam es in jeweils beiden Ansätzen - Kollagen XIV und Kontrolle - ab einer AZM von 5×10^4 zu einem pH-Wert Abfall des Kulturmediums, erkennbar am Abknicken der Kurven.

Es resultierte die Frage, ob eine Verlängerung der Kulturdauer zu der hypothetisierten Reduktion der Proliferation in Gegenwart von Kollagen XIV führt. Es wurde ein Zeitraum von 114 h gewählt (Abbildung 11).

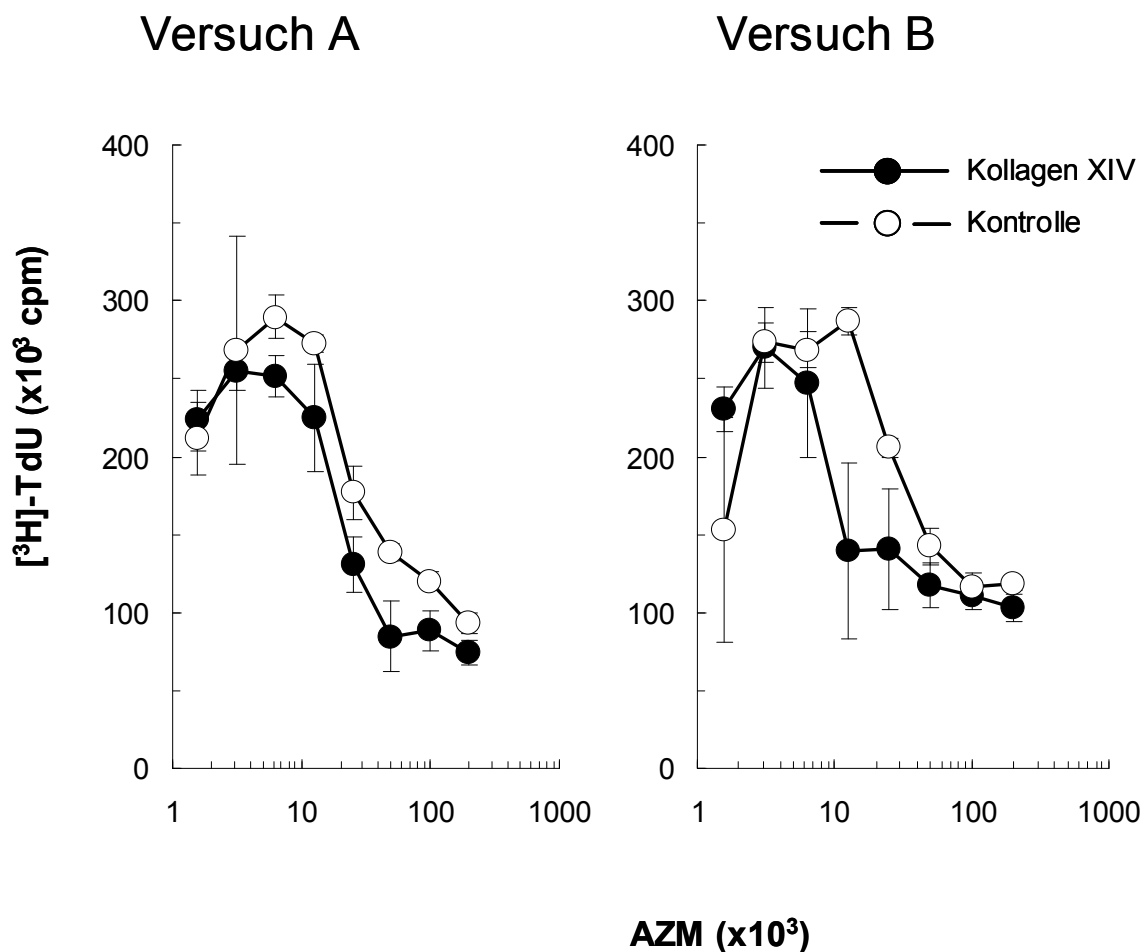


Abbildung 11: Wirkung von Kollagen XIV auf U937-Zellen nach 114 h Inkubation. U937-Zellen wurden jeweils 96 h in Medium mit 10% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h $0,5 \mu\text{Ci}$ [^3H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW \pm SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

Auch bei der langen Inkubationszeit von 114 h ließ sich in Gegenwart von Kollagen XIV keine Reduktion der Proliferation nachweisen. Das Abknicken jeweils beider Kurven - Kollagen XIV und Kontrolle - im Bereich der ersten fünf Titrationsstufen (2×10^5 bis

$1,25 \times 10^4$) deutet auf einen pH-Wert-Abfall des Mediums durch Stoffwechselprodukte während der Inkubation und somit suboptimale Kulturbedingungen hin.

Als Konsequenz wurde für nachfolgende Versuche die AZM auf maximal 1×10^4 begrenzt (Abbildung 12).

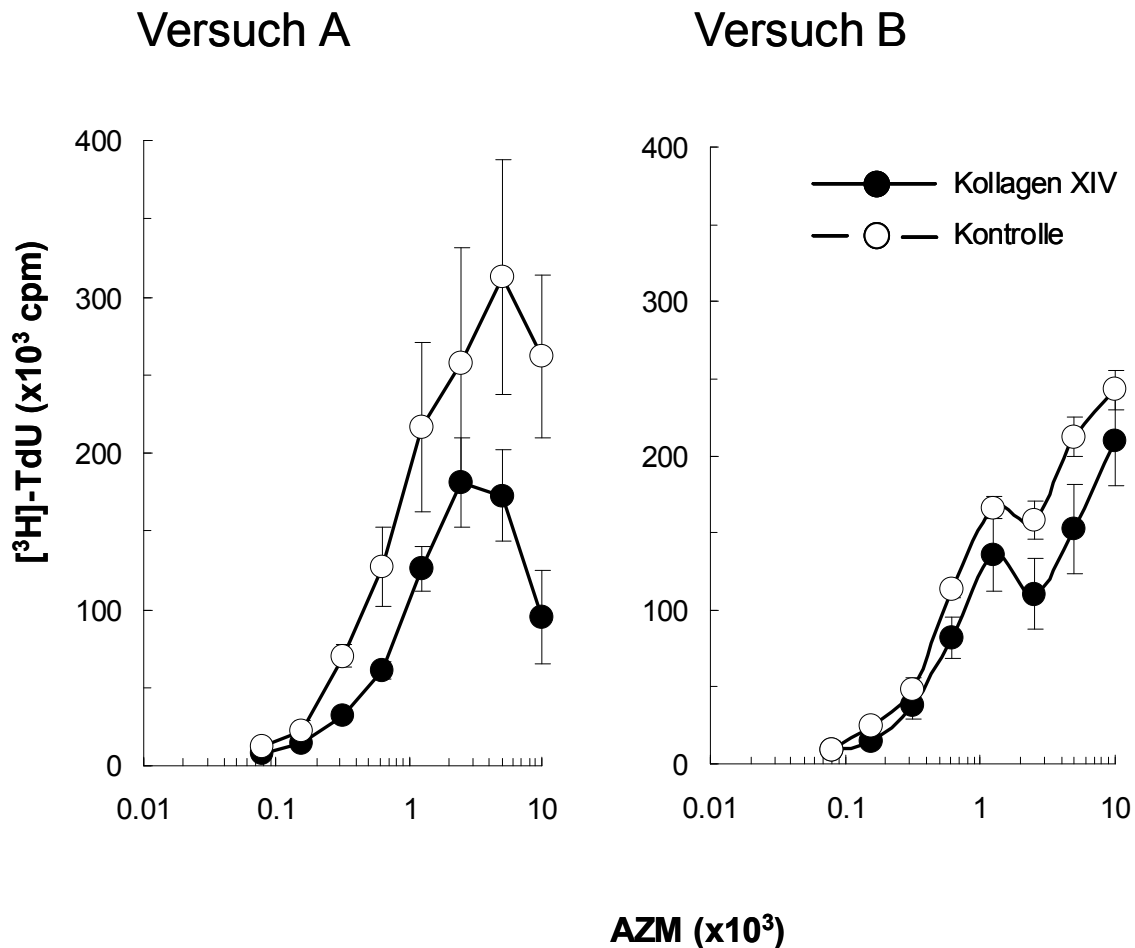


Abbildung 12: Wirkung von Kollagen XIV auf U937-Zellen mit einer AZM von maximal 10^4 U937-Zellen wurden mit einer maximalen AZM von 10^4 ausgesät und 96 h in Medium mit 10% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h $0,5 \mu\text{Ci}$ $[\text{}^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW \pm SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

In beiden Versuchen reduzierte Kollagen XIV gegenüber der Kontrolle die Zellproliferation, und zwar über einen weiten AZM-Bereich. In Versuch A betrug die maximale Reduktion 52% (AZM 5×10^3), in Versuch B 30% (AZM $2,5 \times 10^3$). Abgesehen von der AZM 10^4 in Versuch A waren die Wachstumsbedingungen in keiner Mikrokultur wachstumslimitierend, erkennbar am kontinuierlichen Ansteigen der Kontrollkurven.

Als Konsequenz wurden für nachfolgende Versuche die maximale AZM von 10^4 sowie die Gesamtinkubationszeit von 114 h beibehalten.

3.3.4. Serumreduktion bei U937-Zellen

Es schloss sich die Frage an, ob eine Reduktion der FKS-Konzentration im Kulturmedium den Kollagen XIV-Effekt verstärkt. Es wurde Medium mit 2% FKS verwendet (Abbildung 13).

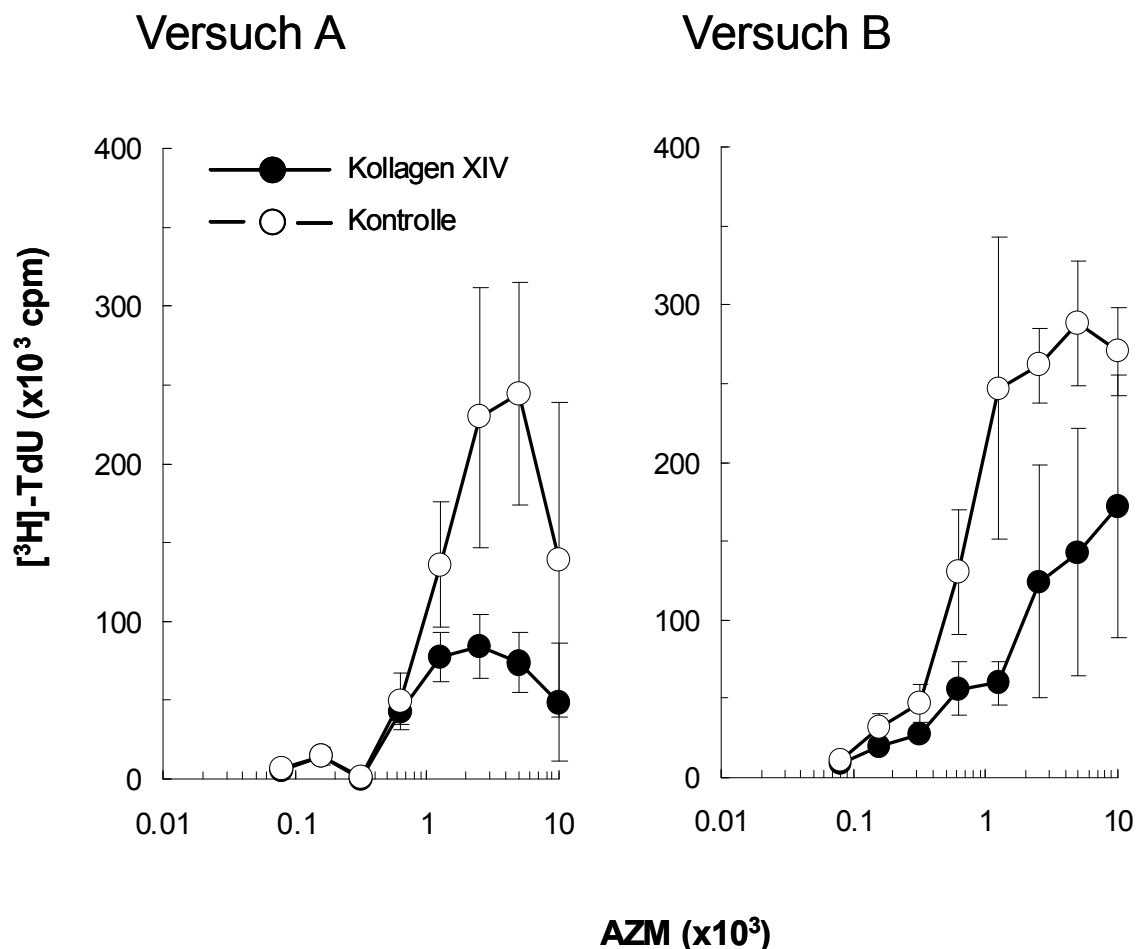


Abbildung 13: Einfluss einer Serumreduktion auf den Kollagen XIV-Effekt bei U937-Zellen. U937-Zellen wurden jeweils 96 h in Medium mit 2% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 18 h $0,5 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW \pm SA des ^3H -Thymidineinbaus aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

Die Reduktion der Proliferation in Gegenwart von Kollagen XIV wurde durch die Serumreduktion verstärkt: In Versuch A wurde die Proliferation durch Kollagen XIV im Vergleich zur Kontrolle um maximal 70% reduziert (AZM 5×10^3). In Versuch B betrug

die maximale Reduktion 76% (AZM $1,25 \times 10^3$). In beiden Versuchen trat bei einer AZM von 10^4 ein Medienverbrauch ein, erkennbar am Abknicken der Kontrollkurven. Die maximale Proliferationsreduktion war statistisch hochsignifikant, vergleiche hierzu Tabelle 3.

3.3.5. Variation von Zellzahl und Inkubationszeit bei HT1080-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob Kollagen XIV auch das Wachstum adhärent wachsender CD44-positiver Tumorzelllinien wie HT1080 inhibieren kann. Analog zu dem Vorgehen bei den Leukämiezelllinien wurden zunächst die Zellzahl und anschließend die Inkubationszeit optimiert. HT1080-Zellen tolerieren einen Serumentzug bis zu einem Mindestgehalt von 0,5% FKS. HT1080-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe über einen weiten Konzentrationsbereich ausgesät und anschließend 12 h in Medium mit 0,5% FKS inkubiert (Abbildung 14).

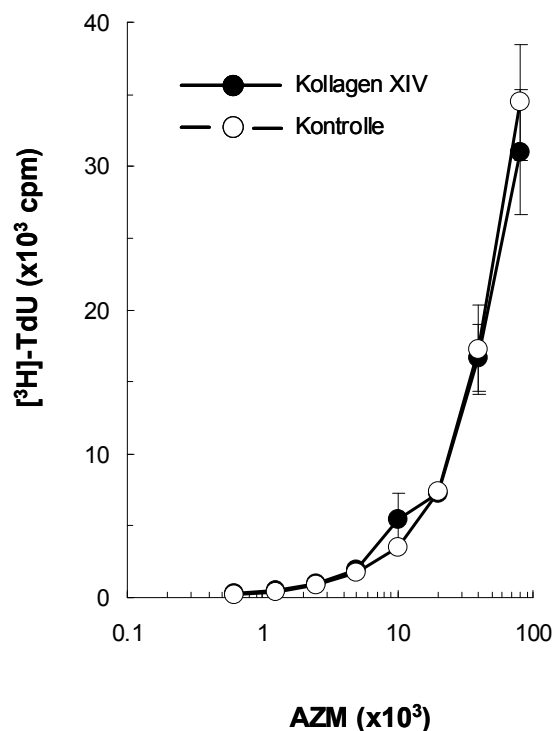


Abbildung 14: Wirkung von Kollagen XIV auf HT1080-Zellen nach 12 h Inkubation. HT1080-Zellen wurden 4 h in Medium mit 0,5% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 8 h $0,5 \mu\text{Ci}$ [^3H]-Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW \pm SA aus sechs Mikrokulturen. AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

Während der kurzen Inkubationszeit von 12 h beeinflusste Kollagen XIV die Proliferation nicht. Die Kulturbedingungen waren nicht wachstumslimitierend, erkennbar am stetigen Anstieg der Kurven.

Es schloss sich die Frage an, ob eine Verlängerung der Kulturdauer zu der hypothetisierten Proliferationsreduktion in Gegenwart von Kollagen XIV führt (Abbildung 15).

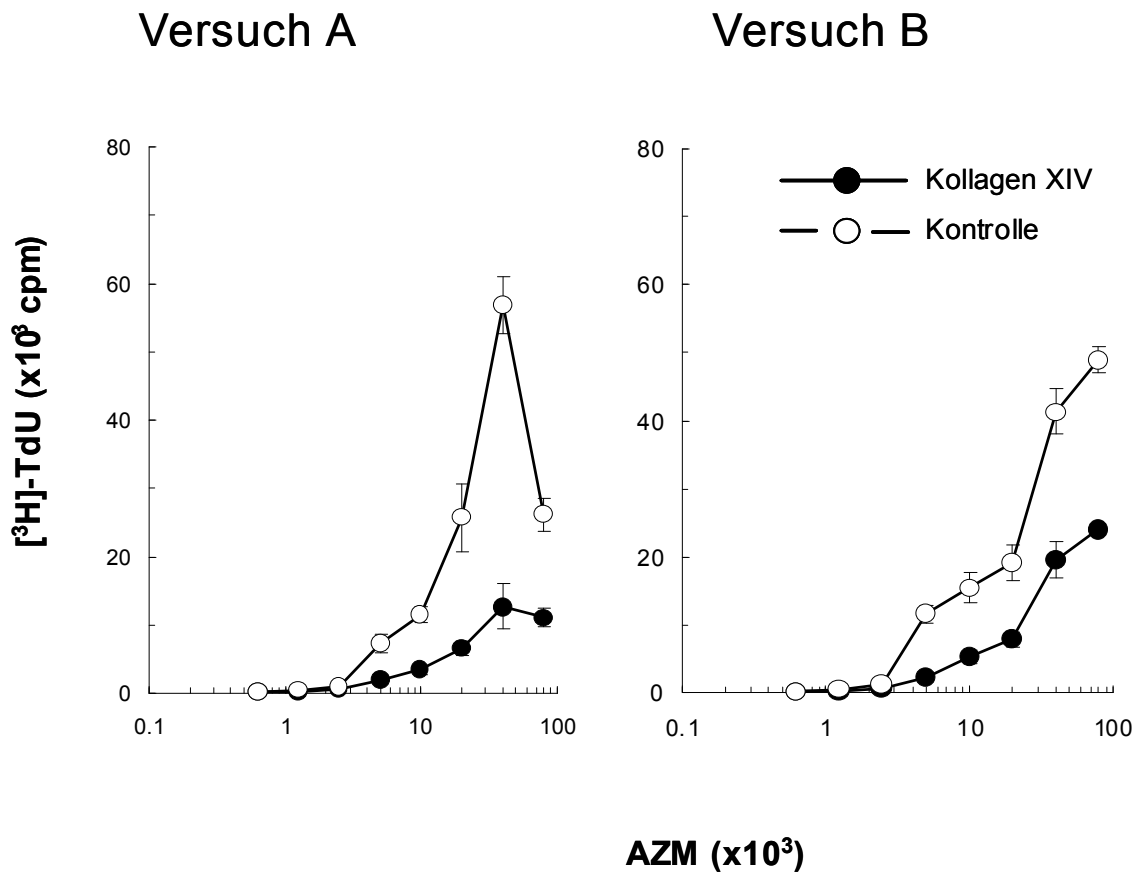


Abbildung 15: Wirkung von Kollagen XIV auf HT1080-Zellen nach 60 h Inkubation. HT1080-Zellen wurden jeweils 52 h in Medium mit 0,5% FKS inkubiert. Anschließend wurde jeder Mikrokultur für weitere 8 h 0,5 μCi ^3H -Thymidin zugesetzt. Jeder Punkt repräsentiert den MW \pm SA aus sechs Mikrokulturen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente (A, B). AZM: Ausgangszellzahl pro Mikrokultur.

In beiden Versuchen reduzierte Kollagen XIV gegenüber der Kontrolle die Zellproliferation, und zwar über einen weiten AZM-Bereich. In Versuch A betrug die maximale Reduktion 78% (AZM 4×10^4), in Versuch B 81% (AZM 5×10^3). Die maximale Reduktion der Proliferation war statistisch hochsignifikant. Abgesehen von der Maximal-AZM in Versuch A waren die Wachstumsbedingungen in keiner Mikrokultur wachstumslimitierend, erkennbar am stetigen Ansteigen der Kurven. Vergleiche Tabelle 4.

3.3.6. Synopsis der Wirkung von Kollagen XIV auf die Proliferation humaner Tumorzelllinien

Die nachfolgenden Tabellen 2 bis 4 fassen die unter den jeweiligen optimalen Bedingungen ermittelten Effekte von Kollagen XIV auf die Proliferation von CS-1-, U937- und HT1080-Zellen zusammen. Dargestellt ist die Reduktion der Proliferation, wie sie bei der entsprechenden AZM im Vergleich zur Kontrolle ohne Kollagen XIV in dem betreffenden Versuch erreicht wurde.

Tabelle 2: Synopsis der maximalen Effekte von Kollagen XIV auf die Proliferation von CS-1-Zellen unter optimalen Bedingungen. CS-1-Zellen wurden insgesamt 162 h bei einem FKS-Gehalt von 5,0% inkubiert und erhielten während der letzten 18 Stunden jeweils 0,5 μCi [^3H]-Thymidin. n.s. - nicht signifikant

Ausgangszellzahl pro Mikrokultur	Reduktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Kollagen XIV		
	(%)	p <	Art des Tests
5,0x10 ⁴	52	0,001	Mann-Whitney
2,5x10 ⁴	4	n.s.	Mann-Whitney
	25	0,01	Mann-Whitney

Tabelle 3: Synopsis der maximalen Effekte von Kollagen XIV auf die Proliferation von U937-Zellen unter optimalen Bedingungen. U937-Zellen wurden insgesamt 114 h bei einem FKS-Gehalt von 2,0% inkubiert und erhielten während der letzten 18 Stunden jeweils 0,5 μCi [^3H]-Thymidin. n.s. - nicht signifikant

Ausgangszellzahl pro Mikrokultur	Reduktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Kollagen XIV		
	(%)	p <	Art des Tests
5,0x10 ³	70	0,01	t-Test
	50	0,001	Mann-Whitney
2,5x10 ³	64	0,05	Mann-Whitney
	52	0,001	t-Test
1,3x10 ³	43	0,01	t-Test
	76	0,001	Mann-Whitney
6,3x10 ²	15	n.s.	Mann-Whitney
	57	0,001	Mann-Whitney

Tabelle 4: Synopsis der maximalen Effekte von Kollagen XIV auf die Proliferation von HT1080-Zellen unter optimalen Bedingungen. HT1080-Zellen wurden insgesamt 60 h bei einem FKS-Gehalt von 0,5% inkubiert und erhielten während der letzten 18 Stunden jeweils 0,5 μCi [^3H]-Thymidin.

Ausgangszellzahl pro Mikrokultur	Reduktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Kollagen XIV		
	(%)	p <	Art des Tests
8,0x10 ⁴	51	0,001	t-Test
4,0x10 ⁴	78	0,001	t-Test
	53	0,001	t-Test
2,0x10 ⁴	74	0,001	t-Test
	59	0,001	t-Test
1,0x10 ⁴	70	0,001	t-Test
	66	0,001	t-Test
5,0x10 ³	75	0,001	t-Test
	81	0,001	t-Test

Gebundenes Kollagen XIV hat also bei Kulturbedingungen, die hinsichtlich des Angebotes an Wachstumsfaktoren und Supplementen für die untersuchten Zelllinien als optimal betrachtet werden können, eine robuste Wirkung im Sinne einer Proliferationshemmung. Dabei konnte die größte Proliferationsreduktion bei Zellen der humanen Fibrosarkomzelllinie HT 1080 erreicht werden. Hier und bei U937-Zellen war die Erzielung eines Effekts nahezu unabhängig von der AZM möglich, im Gegensatz zu CS-1-Zellen, wo nur bei einer AZM von 2,5x10⁴ bzw. 5x10⁴ eine Proliferationsreduktion zu verzeichnen war.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die biologischen Wirkungen von hochgereinigtem, humanem Kollagen XIV auf das Wachstumsverhalten von humanen Tumorzelllinien untersucht. Gemäß der Fragestellung soll an dieser Stelle zunächst auf Aspekte der verwendeten Zelllinien und Methoden eingegangen werden, bevor die beobachteten Einflüsse von Kollagen XIV auf die zelluläre Proliferation besprochen werden.

4.1. Auswahl und Charakterisierung der Zelllinien

Als Modelle dienten CS-1-, U937- und HT1080-Zellen. CS-1 sind CD34-positive, in Suspension wachsende Zellen einer akuten Monoblastenleukämie des Subtyps AML-M5a, die den SCF-Rezeptor c-kit sehr stark exprimieren [65]. Ein immobilisiertes Fusionsprotein aus SCF und dem Fc-Teil aus humanem Immunglobulin G1 vermindert in Kulturen mit einem FKS-Serumgehalt von 5-10% die Proliferation von CS-1-Zellen und induziert zugleich eine Bindung an die Zellkulturplattenoberfläche, die partiell mit einer Änderung der Morphologie der Einzellzellen im Sinne von beginnender Differenzierung einhergeht. Die Frage war, ob diese Zellen auch an Kollagen XIV adhären und ihre Proliferation als Ausdruck beginnender Differenzierung reduzieren würden [71].

Die Zelllinie U937, ein histiozytisches Lymphom, wurde ausgewählt, da bekannt war, dass ihre Proliferation durch Hyaluronsäure hemmbar ist (bei gleichzeitiger Induktion von Apoptose) und als Hyaluronsäure-Rezeptoren auf dieser Zelllinie bislang nur CD44 und der so genannte *Receptor of Hyaluronat Mediated Motility* nachgewiesen worden waren [72-74]. Eine Proliferationsreduktion und zugleich Differenzierungsinduktion von U937-Zellen war auch mit dem Phorbolster TPA, mit Vitamin D₃-Derivaten und Retinoiden erreicht worden; TPA vermittelt zusätzlich eine Fibronectin-abhängige Adhäsion der Zellen [75-77].

Die Untersuchung der Proliferation der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 war interessant, da bekannt war, dass die Zellen an Kollagen XIV adhären können, was ebenfalls mit einer Änderung der Morphologie verbunden ist [10, 27].

Im Zusammenhang mit der Feststellung, dass eine Chondroitin-Dermatansulfat-Variante von CD44 einen potentiellen Rezeptor für Kollagen XIV darstellt, wurde die Oberflächenexpression von CD44 bei den gewählten Zelllinien geprüft [27]. Seiner weiten Verbreitung entsprechend, war CD44 auch auf allen drei Tumorzelllinien

nachweisbar [78, 79]. Dabei bindet der in dieser Arbeit für den Nachweis verwendete Antikörper aus dem Klon DF1485 sowohl an das Standardmolekül als auch an die Varianten von CD44; das Epitop des Variantenantigens ist nicht bekannt [80]. Die CD44-Varianten (CD44v) werden durch alternatives Spleißen der mittleren Exons oder durch posttranslationale Modifikation synthetisiert und stellen sowohl strukturell als auch funktionell unterschiedliche Moleküle dar [81-87]. Von der Variante CD44v3 ist beispielsweise bekannt, dass sie Wachstumsfaktoren und Chemokine, wie z.B. Interferon- γ , den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor oder den Heparin-bindenden epithelialen Wachstumsfaktor immobilisieren und anderen Zellen präsentieren kann [47, 88]. Normalerweise werden CD44-Varianten von null bis maximal 14% aller normalen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert. Dieser Anteil steigt bei malignen hämatologischen Erkrankungen, einschließlich der AML, deutlich an. In einer Untersuchung von Bendall et al. wurde die Splice-Variante CD44v3 bei 62% der untersuchten AML nachgewiesen; bei CD44v6 liegt der Anteil positiver AML-Zellen zwischen 5% und 80% [59, 60, 89, 90]. Ob Unterschiede in Expressionsmuster und –höhe der CD44-Varianten eine Rolle für die nachfolgend diskutierten Effekte von Kollagen XIV auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien spielen, könnte zum weiteren Verständnis der Interaktion von Kollagen XIV mit seinem Rezeptor beitragen, war aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

4.2. Verwendete Methoden

Das Wachstum von Zellen kann über verschiedene physiologische Parameter erfasst werden. Grundsätzlich kann dabei zwischen dynamischer und Endpunktmessung unterschieden werden. Die dynamische Messung der metabolischen Aktivität beruht darauf, dass ausschließlich lebende Zellen bestimmte Tetrazoliumsalze zu Formazan reduzieren, welches anschließend photometrisch bestimmt wird. Gebräuchliche Tetrazoliumsalze sind 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), 3'-[1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzen-Sulfonsäurehydrat (XTT) und 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat (WST-1) [91-94]. MTT wird im endoplasmatischen Retikulum und WST-1 an der extrazellulären Seite der Zellmembran umgesetzt [95]. Der eigentliche Reduktionsschritt erfordert hydrogeniertes Nicotinamid-Adenindinucleotid(phosphat) und ist damit von der Glykolyserate der Zellen abhängig. Diese Messungen sind

unabhängig von der DNS-Synthese, somit werden auch nicht-replizierende Zellen erfasst. Ein Nachteil der Bestimmung mit MTT ist, dass bei Zelllinien mit geringer metabolischer Aktivität, so auch Leukozyten, hohe Zelldichten eingesetzt werden müssen. XTT und WST-1 werden nicht durch alle Zelltypen metabolisiert. Aus den genannten Gründen wurden diese Tests nicht verwendet.

Geeigneter erschien die Proteinfärbung SRB. Dies ist eine Endpunktmessung, mit der viele verschiedene Tumorzelllinien anfärbbar sind. Sie ist sensitiver als die Bestimmung der metabolischen Aktivität mit MTT und zeigt bei adhärenenten Zellen eine ebenso gute oder sogar bessere lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Zellzahl [96-98]. Für die Zellzahlbestimmung von CS-1-Zellen durch SRB-Färbung wurde eine Ausgangszellzahl pro Mikrokultur/well gewählt, die bei verschiedenen Zelllinien zu guten Ergebnissen geführt hatte [99]. In der hier vorliegenden Arbeit führten die notwendigen Waschschriffe und das damit verbundene Abgießen und Ausschlagen der Platten zu großen, unregelmäßigen Zellverlusten, die in ihrem Ausmaß nicht kalkulierbare Schwankungen der Extinktion nach sich zogen. Auf das Problem des Verlusts nicht ausreichend stark adhärerender Zellen hatten bereits Papazisis et al. hingewiesen und vorgeschlagen, vor der TCA-Zugabe das Medium vorsichtig zu aspirieren [100]. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit nicht genutzt, da im mikroskopischen Bild (nicht gezeigt) die Zellen in den Ansätzen mit Kollagen XIV stärker adhärirten als in den Kontrollansätzen und daher die Gefahr ungleichen Zellverlusts durch das Absaugen vor der Fixierung zu groß war. Auch die Fixierung durch 7% (v/v) Glutaraldehyd in 200 mM Cacodylatpuffer anstelle von TCA sowie eine forcierte Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation über max. 30 min bei 1900 g (nicht gezeigt) reduzierten die methodisch bedingten Zellverluste nicht. Für die Bestimmung der Zellzahl von Suspensionszellen in Mikrokulturen war daher die Proteinfärbung mit SRB nicht geeignet.

Die DNS-Neusynthese, ein anderes Maß für die Proliferation, kann anhand der Inkorporation von [³H]-Thymidin oder von Bromdesoxyuridin bestimmt werden [101, 102]. Für diese Arbeit war der [³H]-Thymidineinbau vorteilhaft, da Suspensionszellen und unterschiedlich stark adhärerende Zellen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen untersucht werden konnten.

Zur Beurteilung der DNS-Neusynthese ist es vorteilhaft, wenn der überwiegende Anteil der Zellpopulation zeitgleich die S-Phase durchläuft [103]. Sind die Zellen einer Population nicht synchron, befinden sie sich in unterschiedlichen Phasen des

Zellzyklus. Dadurch entgeht der während des Einbaus des radioaktiven Thymidins nicht die S-Phase durchlaufende Anteil der Messung. Aus diesem Grund wurden Suspensionszellen immer zwei Tage nach dem letzten Umsetzen für einen Versuch verwendet; somit waren gute Bedingungen für exponentielles Wachstum, verbunden mit wiederholtem Durchlaufen des Zellzyklus, gegeben. Mit den so vorbereiteten Zellen war der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin nach 18 h (CS-1 und U937) bzw. 8 h (HT1080) hoch genug, so dass auf eine explizite Synchronisierung der Zellen, z.B. durch Serumentzug oder Kälte, verzichtet werden konnte. Neben der Synchronisation im Zellzyklus entscheiden im Übrigen auch die Dauer der vorangegangenen permanenten Kultur und die daraus resultierende Anzahl von Umsetzungen über die Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse aus der Zellkultur.

4.3. Proliferation von Zellen myeloischen Ursprungs unter dem Einfluss von immobilisiertem Kollagen XIV

Nach Gesamtkubationszeiten von insgesamt 66 h für CS-1- und U937-Zellen bzw. 12 h für HT1080-Zellen hatte Kollagen XIV keinen Effekt auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien. Da die - mit Differenzierung einhergehende - Reduktion der Proliferation von HL-60-Zellen durch Retinolsäure ihr Maximum erst nach sieben Tagen Kulturdauer erreicht und auch die Induktion der Differenzierung primärer AML-Zellen der Subtypen M1, M2 und M5 durch Hyaluronsäure erst nach fünf Tagen deutlich wird, wurden die Kulturzeiten deutlich verlängert. Die gegenüber den CS-1-Zellen kürzeren Inkubationszeiten der U937- und HT1080-Zellen trugen dabei deren kürzeren Populations-Verdopplungszeiten Rechnung [63, 104].

In den Langzeitkulturen von 162 und 114 Stunden für CS-1- bzw. U937-, sowie von 60 Stunden für HT1080-Zellen reduzierte immobilisiertes Kollagen XIV die DNS-Neusynthese aller untersuchten Zelllinien (Vgl. Abb. 9, 13 und 16). Durch die Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblaufärbung (Daten nicht gezeigt) wurde ausgeschlossen, dass diese Proliferationsreduktion auf einem Rückgang der Zahl vitaler Zellen in den Kulturen beruhte. Die Notwendigkeit langer Inkubationszeiten können als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die proliferationsinhibitorische Wirkung von Kollagen XIV Ausdruck einer beginnenden Differenzierung ist. Die biochemische Kopplung beider Vorgänge wird durch das Modell des Zellzyklus verständlich und ist insbesondere für U937-Zellen gut untersucht. Für jede der

ineinander übergehenden Phasen des Zellzyklus sind bestimmte Kombinationen von Cyclinen, Cyclin-abhängiger Kinasen (cdk) und cdk-Inhibitorproteinen charakteristisch. Mit Hilfe von Cyclin-cdk-Komplexen werden so genannte Kontrollpunkte überschritten, nach deren Durchlauf der Zyklus selbstständig weiterläuft. Bekannte Kontrollpunkte liegen in der späten G1- und späten G2-Phase [105]. Bei U937-Zellen geht die Induktion der Differenzierung durch Vitamin D3 und Retinoide mit einer verstärkten Transkription des Gens für den Zellzyklusinhibitor p21 einher; p21 inhibiert die Kinaseaktivität des Cyclin E/cdk2-Komplexes und bewirkt somit einen G1-Arrest [106-108]. In diesen Prozess ist auch der transformierende Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1) im Sinne eines autokrinen Mediators involviert, der für sich alleine aber keine Differenzierung zu induzieren vermag [104, 109]. Eine ektope Überexpression von p21 und/oder p27 führt zur Differenzierung von U937-Zellen mit Expression des Markers für reife myeloische Zellen, CD11b [110]. Die Proliferation von AML-Zellen kann mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44, wie dem Klon A3D8, inhibiert werden [62]. A3D8 bewirkt eine Verringerung der Expression des Protoonkogens c-Jun, das als Transkriptionsfaktor Wachstum fördert, sowie eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Zellzyklusinhibitors p27. Wie p21 bewirkt p27 einen G1-Arrest durch Inhibition des Komplexes aus Cyclin E und cdk2. Der Einsatz eines p27-Antisense-Vektors verhindert die A3D8-induzierte Proliferationsinhibition [111, 112]. Ob die in der vorliegenden Arbeit beobachteten proliferationsinhibitorischen Effekte von Kollagen XIV tatsächlich auf eine Aktivierung von CD44 zurückzuführen sind, konnte nicht abschließend geklärt werden, da kein blockierender Antikörper gegen CD44 verwendet wurde. Dies sollte Gegenstand weitererführender Arbeiten sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde stets auf Zellkulturplattenböden immobilisiertes Kollagen XIV verwendet. Das moderne Konzept der Matrikryptine geht davon aus, dass wahrscheinlich viele der Matrixproteine, die multiple Domänen und repetitive Module besitzen, kryptische Funktionen wie Bindungsstellen, enzymatische Aktivität oder Phosphorylierungsaktivität beherbergen, die erst durch mechanischen Stress aktiviert werden. Insbesondere für Fibronectin wurde gezeigt, dass es durch mechanische Zerrung aufgefaltet wird, so dass speziell im Fibronectin-III-Modul zusätzliche Rezeptorbindungsstellen verfügbar werden [113]. Da auch Kollagen XIV ein solches Multidomänenmolekül ist und Fibronectin-Typ-III-*repeats* besitzt, werden durch die Immobilisation möglicherweise zusätzliche Bindungsstellen freigesetzt, die die Interaktion mit der Zelle modifizieren, was in einem verändertem Expressionsmuster

von Oberflächenrezeptoren und Zellverhalten resultiert. Das Konzept der Matrikryptine erweitert das bisherige Funktionsmodell, das in Kollagen XIV vornehmlich einen Brückenbildner zwischen verschiedenen Bestandteilen der EZM sieht, was aus seiner molekularen Struktur (vgl. Abbildung 1) sowie aus seiner Assoziation und Kodistribution mit Kollagen I in verschiedenen Geweben hergeleitet wird [8, 16, 25]: Über seine tripelhelikale Domäne COL1 bindet Kollagen XIV an tripelhelikale Domänen anderer Kollagene, beispielsweise an die des Kollagen I oder VI [10]. COL2 wendet sich zum angrenzenden freien extrazellulären Raum und erlaubt das Hereinragen der großen globulären Domäne NC3. Hier, auf dem aminoterminalen Fibronectin-Typ-III-*repeat*, befindet sich die von der Chondroitin- bzw. Dermatansulfatvariante von CD44 erkannte Zellbindungsregion [27, 28]. Für Fibroblasten der Zelllinie 3T3 konnte gezeigt werden, dass sowohl immobilisiertes natives Kollagen XIV als auch die rekombinante, elongierte erste Fibronectin-Typ-III-Domäne von NC3, Q29-P154, die Proliferation der Zellen, gemessen anhand des [3H]TdU, reduziert. Zu Kulturen mit immobilisiertem Kollagen XIV hinzugegebenes lösliches Q29-P154 verstärkt den antiproliferativen Effekt. Weiterhin führten sowohl immobilisiertes natives Kollagen XIV als auch Q29-P154 in 3T3-L1-Präadipozyten zur Differenzierung in Adipozyten (A. Zeller, Charite Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unveröffentlichte Daten). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass Kollagen XIV und hier insbesondere die erste, elongierte Fibronectin-Typ-III-Domäne eine Proliferationsreduktion als notwendige Voraussetzung für Differenzierung zu induzieren vermag [68].

4.4. Einfluss von Serumfaktoren auf die Kollagen XIV-induzierte Proliferationsreduktion myeloischer Zellen

Ein weiterer wesentlicher Faktor, der mit der biologischen Wirkung definierter Einzelkomponenten interferiert, ist das in der Zellkultur wichtige Serum. Es enthält für das Zellwachstum notwendige Stoffe, d.h. Glucose, Salze, Aminosäuren, Lipide, Vitamine, Spurenelemente, Enzyme, Immunglobuline sowie Hormone und Wachstumsfaktoren. Da Serum und das in dieser Arbeit verwendete FKS ein nicht vollständig definierbares Naturprodukt ist, ist seine genaue Zusammensetzung chargenabhängig. Dieses Problem könnte durch die Verwendung kostenintensiver, definierter, serumfreier Medien umgangen werden, wie sie u.a. für die Kultur von Knochenmarkstromazellen beschrieben wurden [114]. Jedoch sind noch nicht alle

notwendigen Inhaltsstoffe ausreichend beschrieben, so dass viele andere Zellen, einschließlich AML, den vollständigen Ersatz des Serums nicht ohne weiteres tolerieren. In der Regel führen Mangelercheinungen zur Selektion und die Zusammensetzung der Population kann sich im Laufe der Kultur bzgl. der Morphologie, des bevorzugten Karyotyps, der Antigenexpression u.a. verändern [67].

Hier wurden alle Versuche mit variierten FKS-Konzentrationen aus einheitlichen Chargen durchgeführt. Um die Basiskonzentration von Stoffen, die mit Kollagen XIV um die Rezeptorbindung kompetitieren könnten, wie z.B. Hyaluronsäure, der b-Fibroblastenwachstumsfaktor oder Osteopontin, zu reduzieren, wurde eine Serumreduktion durchgeführt. Für das experimentelle Vorgehen ist dabei günstig, dass dadurch auch die Konzentrationen der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren abnehmen und so auch der generelle Wachstumsanreiz vermindert wird, was die Induktion einer Proliferationsreduktion erleichtert [47, 115-117]. In der Hepatomzelllinie HepG2 steigern 5 nmol/l Osteopontin die Expression von CD44v6, was eine erhöhte Adhäsion an Hyaluronsäure zur Folge hat; ein Einfluss auf die Proliferation wurde nicht beobachtet [118]. Osteopontin ist ein Zytokin, das Zelladhäsion vermittelt und ein Ligand von CD44 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. In der Leukämiezelllinie RAW 264.7 aus der Maus steigert es in Konzentrationen von 2-10 nmol/l konzentrations- und zeitabhängig die Oberflächenexpression und Halbwertszeit von membranständigem CD44 durch Interaktion mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin; die CD44v6-Expression wird hier nicht beeinflusst [119]. Neben der Konzentration potentieller Liganden vermindert eine Serumreduktion auch die Menge des löslichen CD44, das die Wirkung auf den membranständigen Rezeptor neutralisieren kann. So war gezeigt worden, dass 10 $\mu\text{g/ml}$ lösliches CD44s die Adhäsion von Melanomzellen an Hyaluronsäure vollständig inhibieren kann, was zu einer Hemmung der Proliferation führt [120].

In den Versuchen mit AZM von 5×10^4 bzw. $2,5 \times 10^4$ CS-1-Zellen und 10% FKS im Kulturmedium reduzierte plastikgebundenes Kollagen XIV die Proliferation um maximal 16% im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt verstärkte sich mit 5% FKS, so dass die Proliferation um maximal 52% gegenüber den Kontrollansätzen reduziert wurde (Abb. 9). Eine weitere Reduktion des Serumgehaltes tolerierten die CS-1-Zellen nicht (nicht gezeigt).

U937-Zellen sind weniger empfindlich und tolerieren einen minimalen FKS-Gehalt von 2% in der Kultur, was sich in einem konstant hohen $[^3\text{H}]\text{TdU}$ von etwa 250 bis 300×10^3 cpm der Zellen in den nicht behandelten Kontrollansätzen ausdrückt, unabhängig

davon, ob 10% oder 2% FKS vorliegt (vgl. Abb. 12 und 13). Dies stimmt mit Angaben aus der Literatur überein [66]. Ein Effekt des plastikgebundenen Kollagen XIV war bei den U937-Zellen unabhängig von der FKS-Konzentration über einen weiten AZM-Bereich nachweisbar. Mit einer Reduktion der Proliferation um maximal 76% im Vergleich zur Kontrolle war die Wirkung in Gegenwart von 2-% FKS stärker als mit der höheren FKS-Konzentration von 10%, mit der der $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau um nur maximal 52% verringert war. Der insgesamt hohe $[^3\text{H}]$ -TdU der U937-Zellen geht auf ihre kurze Populations-Verdopplungszeit innerhalb der mit 114 Stunden langen Gesamtinkubationszeit zurück. Als weitere mögliche Ursache für die im Vergleich zu CS-1 stärker ausgeprägte Proliferationsreduktion von U937-Zellen durch Kollagen XIV kommt neben der kürzeren Populations-Verdopplungszeit auch eine autokrine Sekretion proliferationsinhibitorischer Moleküle wie des transformierenden Wachstumsfaktors $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in Betracht. TGF- $\beta 1$ ist ein Zytokin, das von vielen Zellen einschließlich Makrophagen synthetisiert wird. In U937-Zellen inhibieren 1 ng/ml TGF- $\beta 1$ zusammen mit 250 ng/ml Vitamin D3 vollständig die Proliferation und führen zur Differenzierung in Richtung Makrophagen. TGF- $\beta 1$ allein hat keinen Effekt auf Proliferation oder Differenzierung. Während der Behandlung mit Vitamin D3 und/oder Retinolsäure kommt es neben zunehmender Lysozymproduktion und Phagozytoseaktivität zu einem zeitabhängigen Anstieg des TGF- β -Vorläufermoleküls im Überstand der U937-Mikrokulturen. Zugleich nimmt die Zellproliferation mit steigenden Konzentrationen (1-1000 pg/ml) rekombinanten TGF- $\beta 1$ ab. Diese Effekte können durch neutralisierende TGF- $\beta 1$ -Antikörper und/oder Antisense-Oligonukleotide ganz oder teilweise blockiert werden [109, 121, 122]. Ob TGF- $\beta 1$ auch von CS-1-Zellen gebildet wird, wurde bislang noch nicht untersucht, würde jedoch zur Klärung der Frage, wie es zu der unterschiedlich ausgeprägten Proliferationsinhibition bei den Leukämiezelllinien kommt, beitragen.

4.5. Einfluss der Adhäsion an immobilisiertes Kollagen XIV auf die Proliferation myeloischer Zellen

Alle Versuche mit HT1080-Zellen wurden mit 0,5% FKS im Medium durchgeführt [123]. Wie bei den U937-Zellen war eine Proliferationsreduktion über einen weiten AZM-Bereich nachweisbar. Mit einer Reduktion um 78-81% reduzierte Kollagen XIV bei HT1080-Zellen die Proliferation stärker als bei den Leukämiezelllinien (Abb. 15). Dies ist

zum einen durch eine höhere CD44-Rezeptordichte erklärbar. Offensichtlich besteht dabei jedoch kein linearer Zusammenhang zum Ausmaß der Proliferationsreduktion, denn trotz 6-7facher höherer CD44-Rezeptordichte von HT1080 erreichte ihre Proliferationsreduktion gegenüber den Leukämiezelllinien in keiner Mikrokultur den Faktor vier. Zum anderen könnte die starke Proliferationsreduktion bei den adhären, großflächig-breitbasig aufsitzenden HT1080-Zellen auch mit einer Polarisierung der Rezeptorverteilung zu tun haben. Es ist denkbar, dass nach einer Umverteilung auf diese Weise mehr CD44-Rezeptoren mit Kollagen XIV interagieren können als bei sphärischen AML-Zellen. Dass das physiologische Verhalten von Zellen von solchen Wachstumsbedingungen und sterischen Gegebenheiten beeinflusst wird, wurde für die Kollagen XIV-Produktion von Fibroblasten *in vitro* gezeigt. In Kulturen, die ihnen das Wachstum in dreidimensionalen Strukturen gestatten, produzieren sie Kollagen XIV. Sie verlieren diese Fähigkeit in herkömmlichen Kultursystemen mit *Monolayer*-Kultur, wie sie in Zellkulturschalen und -flaschen entstehen [20]. Maligne transformierte Fibroblasten, zu denen die hier verwendete Fibrosarkomzelllinie HT1080 gehört, können jedoch auch in der Monolayer-Kultur Kollagen XIV produzieren [8, 10]. Dieses wiederum könnte den Effekt des exogenen Kollagen XIV verstärken und so ein weiterer Grund für die starke Proliferationsinhibition bei dieser Zelllinie sein.

Bei den Leukämiezelllinien sprechen die gewonnenen Daten eindeutig gegen die Möglichkeit einer Verstärkung der Proliferationsinhibition durch Adhäsion und Rezeptorverteilung. Zwar ist bekannt, dass durch TPA stimulierte, d.h. partiell differenzierte U937-Zellen stärker an Proteine der EZM adhären und dabei im Vergleich zu den undifferenzierten Leukämiezellen sichtbar ihre Gestalt ändern können [24, 124]. Doch waren in der vorliegenden Arbeit die U937-Zellen lichtmikroskopisch betrachtet in allen Mikrokulturen jederzeit sphärisch geformt, unabhängig von der FKS-Konzentration des Mediums und vom Ausmaß des antiproliferativen Effekts (nicht gezeigt); es gab keinen Grund zur Annahme, die Zellen seien fest angeheftet gewesen. CS-1-Zellen hingegen adhärten an das Kollagen XIV der Kulturplattenoberfläche und zeigten dennoch gegenüber U937 eine deutlich geringere Proliferationsreduktion bei ähnlich hoher CD44-Rezeptordichte. Somit bleibt letztlich unklar, wie es bei U937 zu solch ausgeprägter Proliferationsinhibition ohne Anzeichen für Adhäsion oder partielle Differenzierung kommen kann. Für das unterschiedliche Adhäsionsverhalten beider Zelllinien könnte im Übrigen die Expression unterschiedlicher CD44-Varianten

ursächlich sein. So ist an der Adhäsion von Progenitorzellen an Knochenmarkstroma neben der Standardversion von CD44 auch CD44v10 wesentlich beteiligt [125].

Gebundenes Kollagen XIV hat also bei Kulturbedingungen, die hinsichtlich des Angebotes an Wachstumsfaktoren und Supplementen für die untersuchten Zelllinien als optimal betrachtet werden können, eine messbare proliferationsinhibitorische Wirkung. Ob dies eine Rolle bei der Regulation der Hämatopoese *in vivo* spielt, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein konstitutiver Bestandteil von Geweben und Organen. Sie besteht aus zahlreichen, miteinander interagierenden Komponenten und ist entscheidend für die Regulation von zellulärer Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Kollagen XIV gehört zu der Gruppe der FACIT, wird in den meisten Geweben von Fibroblasten synthetisiert und hauptsächlich in der EZM gut differenzierter mesenchymaler Gewebe vorgefunden. So ist es auch ein natürlicher Bestandteil der EZM des Knochenmarks. In stark proliferierendem Gewebe wie Tumorstroma oder während der frühen embryonalen Entwicklung fehlt es hingegen. Auf seiner NC3-Domäne beherbergt Kollagen XIV eine Zellbindungsregion, deren einzig bekannter Ligand eine Chondroitin/Dermatansulfatvariante von CD44 ist. CD44 ist eine Familie von weit verbreiteten Zelladhäsionsmolekülen, die von allen Leukozyten exprimiert werden. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob Kollagen XIV eine Proliferationsreduktion CD44-positiver humaner Tumorzelllinien bewirken kann. Ein solcher Effekt war bereits durch CD44-spezifische Antikörper bei verschiedenen Leukämiezelllinien gezeigt worden.

Als Modelle für eine akute myeloische Leukämie und ein histiozytisches Lymphom wurden die humanen Zelllinien CS-1 bzw. U937 verwendet, zudem wurde die Zelllinie HT1080 als Modell für ein humanes Fibrosarkom eingesetzt. Es wurde systematisch ein Zellkultursystem etabliert, das es ermöglicht, die Proliferation dieser Zelllinien zu messen. Diese Methodik ist prinzipiell auch auf andere Tumorzelllinien, primäre Tumorzellen und verschiedene Agenzien übertragbar.

Alle untersuchten Zelllinien tragen auf ihrer Oberfläche CD44, den bislang einzig bekannten Rezeptor für Kollagen XIV. Er ist durch einen CD44-spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon DF1865), der nicht zwischen den *Splice*- und Glykosylierungsvarianten des CD44-Moleküls unterscheidet, darstellbar. HT1080-Zellen zeigen mit einer MFI von 2.228 die höchste Rezeptordichte, CS-1 und U937 besitzen eine MFI von 370 bzw. 320.

Anschließend wurde das Zellwachstum mit der [³H]-Thymidineinbau-Methode gemessen; die SRB-Färbung erwies sich als ungeeignet. Dabei wurden für jede Zelllinie die Parameter Inkubationszeit, Ausgangszellzahl pro Mikrokultur (AZM) und FKS-Konzentration des Mediums schrittweise variiert. Auf diese Weise wurden Kulturbedingungen etabliert, die einerseits hinreichend lange Inkubationszeiten

aufweisen sowie andererseits daran angepasste AZM besitzen, so dass es während der Inkubation nicht zu Zelltod aufgrund suboptimaler Wachstumsbedingungen kommt. Unter den so etablierten Bedingungen wurde der Einfluss von hochgereinigtem humanem, immobilisiertem Kollagen XIV auf die Proliferation der verwendeten Zelllinien untersucht. Die Proliferation aller Zelllinien wurde durch seine Anwesenheit reduziert. Die maximale Kollagen XIV-induzierte Proliferationsreduktion betrug bei HT1080-Zellen 81%, bei U937-Zellen 76% und bei CS-1-Zellen 52%. Der Effekt trat bei HT1080- und U937-Zellen über einen weiten AZM-Bereich auf, bei CS-1-Zellen nur bei einer AZM von $2,5 \times 10^4$ bzw. 5×10^4 . Die Effekte wurden durch eine Beschichtung der Kulturplattenlöcher mit je $3 \mu\text{g}$ Kollagen XIV erzielt.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Kollagen XIV die Proliferation von AML-Zellen, aber auch von adhären wachsenden humanen Fibrosarkomzellen, inhibieren kann. Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob der einzige bisher beschriebene Rezeptor für Kollagen XIV, eine Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-Variante von CD44, ursächlich an dem gezeigten proliferationsinhibitorischen Effekt beteiligt ist. Experimente, die auf den hier gezeigten methodisch aufbauen, könnten den Einfluss blockierender CD44-spezifischer monoklonaler Antikörper auf den Kollagen XIV-Effekt untersuchen. Zusätzlich könnten weitere Rezeptorkandidaten wie z.B. die Matrixrezeptoren Integrine und DDR mit Hilfe von knock-out Zellen und Antikörpern bzw. synthetischen kompetitiven Liganden untersucht und Rezeptoren durch radioaktive Oberflächenmarkierung der Zellen und Rezeptor-fishing identifiziert werden. Auf Matrixebene könnten mit Hilfe rekombinanter Kollagen XIV-Fragmente, die ausgewählte funktionelle Domänen enthalten, die für Adhäsion und Proliferationsreduktion verantwortlichen Regionen näher eingegrenzt werden. Interessant ist auch die Frage, ob die fehlende Adhäsion bei gleichzeitiger Proliferationsinhibition möglicherweise auf eine unvollständige Differenzierung der U937-Zellen zurückzuführen ist. Dazu bietet sich eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression von differenzierungsassoziierten Oberflächenantigenen oder auf genetischer und proteinchemischer Ebene die Regulation von Zellzyklusinhibitoren wie p21 an. Ein Fernziel wäre die Beeinflussung der Tumorigenität dieser Zellen über ein von Kollagen XIV abgeleitetes Peptid bzw. Mimetikum.

6. Literaturverzeichnis

1. Schuppan, D., et al., *Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 351-72.
2. Humphries, M.J., et al., *Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**: p. 822-5.
3. Wozniak, M.A., et al., *Focal adhesion regulation of cell behavior*. Biochim Biophys Acta, 2004. **692**: p. 103-19.
4. Hirota A, E.T., Kusubata M, et al., *Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2003. **21**: p. 1317-21.
5. Van Kempen LC, R.D., van Muijen GN, Coussens LM, *The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution*. Eur J Cell Biol, 2003. **82**: p. 539-48.
6. Beaudeau J.L., G.P., Bruckert E., Foglietti M.J., Chapman M.J., *Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**: p. 121-31.
7. Fukai, N., S.S. Apte, and B.R. Olsen, *Nonfibrillar collagens*. Methods Enzymol, 1994. **245**: p. 3-28.
8. Schuppan, D., et al., *Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8823-32.
9. Trueb, J. and B. Trueb, *Type XIV collagen is a variant of undulin*. Eur J Biochem, 1992. **207**(2): p. 549-57.
10. Brown, J.C., et al., *Structure and binding properties of collagen type XIV isolated from human placenta*. J Cell Biol, 1993. **120**(2): p. 557-67.
11. Bauer, M., et al., *Complete primary structure of human collagen type XIV (undulin)*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1354**(3): p. 183-8.
12. Schnittger, S., et al., *Localization of the undulin gene (UND) to human chromosome band 8q23*. Cytogenet Cell Genet, 1995. **68**(3-4): p. 233-4.
13. Imhof, M. and B. Trueb, *Comparative cytogenetic mapping of COL14A1, the gene for human and mouse collagen XIV*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **84**(3-4): p. 217-9.
14. Shaw, L.M. and B.R. Olsen, *FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(5): p. 191-4.
15. Schuppan, D., *Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins*. Semin Liver Dis, 1990. **10**(1): p. 1-10.
16. Keene, D.R., et al., *Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils*. J Cell Biol, 1991. **113**(4): p. 971-8.
17. Gordon, M.K., et al., *Temporal expression of types XII and XIV collagen mRNA and protein during avian corneal development*. Dev Dyn, 1996. **206**(1): p. 49-58.
18. Linsenmayer, T.F., et al., *Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea*. Prog Retin Eye Res, 1998. **17**(2): p. 231-65.
19. Young, B.B., et al., *The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea*. J Cell Biochem, 2002. **87**(2): p. 208-20.
20. Berthod, F., et al., *Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(5): p. 737-42.

21. Atherton, A.J., et al., *Differential expression of type XIV collagen/undulin by human mammary gland intralobular and interlobular fibroblasts*. Cell Tissue Res, 1998. **291**(3): p. 507-11.
22. Castagnola, P., et al., *Tissue-specific expression of type XIV collagen--a member of the FACIT class of collagens*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(2): p. 340-7.
23. Knittel, T., et al., *Distribution and cellular origin of undulin in rat liver*. Lab Invest, 1992. **67**(6): p. 779-87.
24. Klein, G., et al., *Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells*. Matrix Biol, 1998. **16**(6): p. 307-17.
25. Walchli, C., et al., *Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 2)**: p. 669-81.
26. Aubert-Foucher, E., et al., *Purification and characterization of native type XIV collagen*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15759-64.
27. Ehnis, T., et al., *A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV (undulin)*. Exp Cell Res, 1996. **229**(2): p. 388-97.
28. Ehnis, T., et al., *Localization of a cell adhesion site on collagen XIV (undulin)*. Exp Cell Res, 1998. **239**(2): p. 477-80.
29. Just, M., et al., *Undulin is a novel member of the fibronectin-tenascin family of extracellular matrix glycoproteins*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17326-32.
30. Gordon, M.K., et al., *Cloning of a cDNA for a new member of the class of fibril-associated collagens with interrupted triple helices*. Eur J Biochem, 1991. **201**(2): p. 333-8.
31. Gerecke, D.R., et al., *Type XIV collagen is encoded by alternative transcripts with distinct 5' regions and is a multidomain protein with homologies to von Willebrand's factor, fibronectin, and other matrix proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 12177-84.
32. Dublet, B. and M. van der Rest, *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, 1991. **266**(11): p. 6853-8.
33. Brown, J.C., et al., *Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV*. Matrix Biol, 1994. **14**(4): p. 287-95.
34. Liu, D., et al., *[Multiparametric flow cytometry analyzes the expressions of immunophenotype CD133, CD34, CD44 in lung cancer naive cells]*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2008. **39**(5): p. 827-31.
35. Attarbaschi, A., et al., *CD44 deficiency is a consistent finding in childhood Burkitt's lymphoma and leukemia*. Leukemia, 2007. **21**(5): p. 1110-3.
36. Liu, Y.J., et al., *Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(42): p. 6601-6.
37. Chen, J.Q., et al., *Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(6): p. 776-82.
38. Akisik, E., S. Bavbek, and N. Dalay, *CD44 Variant Exons in Leukemia and Lymphoma*. Pathol Oncol Res, 2002. **8**(1): p. 36-40.
39. Naor, D., R. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function and association with the malignant process*. Adv Cancer Res, 1997. **71**: p. 241-319.
40. Pure, E. and C.A. Cuff, *A crucial role for CD44 in inflammation*. Trends Mol Med, 2001. **7**(5): p. 213-21.
41. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.

42. St Jacques, S., H.K. Dadi, and M. Letarte, *CD44 in human placenta: localization and binding to hyaluronic acid*. Placenta, 1993. **14**(1): p. 25-39.
43. Laurent, T.C. and J.R. Fraser, *Hyaluronan*. Faseb J, 1992. **6**(7): p. 2397-404.
44. Prosper, F. and C.M. Verfaillie, *Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 307-16.
45. Legras, S., et al., *CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines*. Blood, 1997. **89**(6): p. 1905-14.
46. Healy, L., et al., *The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12240-4.
47. Bennett, K.L., et al., *CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor*. J Cell Biol, 1995. **128**(4): p. 687-98.
48. Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade, *CD44 and its interaction with extracellular matrix*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 271-335.
49. Miyake, K., et al., *Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lymphohemopoiesis in long-term bone marrow cultures*. J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 477-88.
50. Bazil, V. and V. Horejsi, *Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 747-53.
51. Yu, Q. and B.P. Toole, *A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20603-7.
52. Whetton, A.D. and T.M. Dexter, *Influence of growth factors and substrates on differentiation of haemopoietic stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(6): p. 1044-9.
53. Metcalf, D., *Hemopoietic regulators*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(8): p. 286-9.
54. Mayani, H., L.J. Guilbert, and A. Janowska-Wieczorek, *Biology of the hemopoietic microenvironment*. Eur J Haematol, 1992. **49**(5): p. 225-33.
55. Eaves, C.J., et al., *Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer*. Blood, 1991. **78**(1): p. 110-7.
56. Appelbaum, F.R.R.J.M.R., J.; Dick, J. E., *Acute myeloid leukemia*. (Am Soc Hematol Educ Program), 2001: p. 62-86.
57. Lichtman, M., *Acute myelogenous leukemia*, in *Williams Hematology*, M.C. Beutler, B.; Kipps, T., Editor. 1995, Mc Graw-Hill: New York. p. 272-298.
58. Reuss-Borst, M.A., et al., *Adhesion molecules on CD34+ hematopoietic cells in normal human bone marrow and leukemia*. Ann Hematol, 1992. **65**(4): p. 169-74.
59. Khaldoyanidi, S., et al., *Expression of CD44 variant isoforms in peripheral blood leukocytes in malignant lymphoma and leukemia: inverse correlation between expression and tumor progression*. Leuk Res, 1996. **20**(10): p. 839-51.
60. Bendall, L.J., K.F. Bradstock, and D.J. Gottlieb, *Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells*. Leukemia, 2000. **14**(7): p. 1239-46.
61. Degos, L., et al., *All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2643-53.

62. Charrad, R.S., et al., *Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines*. Blood, 2002. **99**(1): p. 290-9.
63. Charrad, R.S., et al., *Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 669-76.
64. Rasheed, S., et al., *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*. Cancer, 1974. **33**(4): p. 1027-33.
65. Erben, U., et al., *CS-1, a novel c-kithi+ acute myeloid leukemia cell line with dendritic cell differentiation capacity and absent immunogenicity*. Int J Cancer, 2003. **105**(2): p. 232-40.
66. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
67. Lindl, T., in *Zell- und Gewebekultur*. 2000, Spektrum akademischer Verlag: Heidelberg Berlin.
68. Ruehl, M., U. Erben, and D. Schuppan, *The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 537-43.
69. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
70. Thomas, L., in *Labor und Diagnose*. 1998, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH: Frankfurt/Main. p. 1482 ff.
71. Erben, U., E. Thiel, and M. Notter, *Differential effects of a stem cell factor-immunoglobulin fusion protein on malignant and normal hematopoietic cells*. Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2924-30.
72. Turley, E.A., et al., *Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells*. J Cell Biol, 1991. **112**(5): p. 1041-7.
73. Savani, R.C., et al., *Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36770-8.
74. Sheehan, K.M., DeLott, L. B., West, R. A., Bonnema, J. D., DeHeer, D. H., *Hyaluronic acid of high molecular weight inhibits proliferation and induces cell death in U937 macrophage cells*, in *Life Sci*. 2004. p. 3087-3102.
75. Hass, R., et al., *TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens*. Eur J Cell Biol, 1989. **48**(2): p. 282-93.
76. Cavender, D.E., D. Edelbaum, and L. Welkovich, *Effects of inflammatory cytokines and phorbol esters on the adhesion of U937 cells, a human monocyte-like cell line, to endothelial cell monolayers and extracellular matrix proteins*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(6): p. 566-78.
77. James, S.Y., et al., *The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukaemia cells*. Biochem Pharmacol, 1997. **54**(5): p. 625-34.
78. Quackenbush, E.J., et al., *Confirmation by peptide sequence and co-expression on various cell types of the identity of CD44 and P85 glycoprotein*. Mol Immunol, 1990. **27**(10): p. 947-55.
79. Pals, S.T., et al., *Identification of a widely distributed 90-kDa glycoprotein that is homologous to the Hermes-1 human lymphocyte homing receptor*. J Immunol, 1989. **143**(3): p. 851-7.

80. Faleiro-Rodrigues, C. and C. Lopes, *E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study*. Pathobiology, 2004. **71**(6): p. 329-36.
81. Lokeshwar, V.B. and L.Y. Bourguignon, *Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 17983-9.
82. Brown, T.A., et al., *Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons*. J Cell Biol, 1991. **113**(1): p. 207-21.
83. Dougherty, G.J., et al., *Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells*. J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 1-5.
84. Cooper, D.L., et al., *The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**(2): p. 569-78.
85. He, Q., et al., *Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition*. J Cell Biol, 1992. **119**(6): p. 1711-9.
86. Jackson, D.G., J. Buckley, and J.I. Bell, *Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4732-9.
87. Tolg, C., et al., *Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(5): p. 1225-9.
88. Hurt-Camejo, E., et al., *CD44, a cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, mediates binding of interferon-gamma and some of its biological effects on human vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18957-64.
89. Rosel, M., S. Seiter, and M. Zoller, *CD44v10 expression in the mouse and functional activity in delayed type hypersensitivity*. J Cell Physiol, 1997. **171**(3): p. 305-17.
90. Legras, S., et al., *A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3401-13.
91. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
92. Roehm, N.W., et al., *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT*. J Immunol Methods, 1991. **142**(2): p. 257-65.
93. Nissen, E., G. Pauli, and D. Vollenbroich, *WST-1 assay--a simple colorimetric method for virus titration*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1997. **33**(1): p. 28-9.
94. Takamatsu, N., *[The new colorimetric assay (WST-1) for cellular growth with normal aging and Alzheimer's disease]*. Nippon Ronen Igakkai Zasshi, 1998. **35**(7): p. 535-42.
95. Berridge, M.V.T., A. S.; McCoy, C. D.; Wang, R., *The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts*. Biochemia, 1996. **4**: p. 14-19.
96. Keepers, Y.P., et al., *Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing*. Eur J Cancer, 1991. **27**(7): p. 897-900.

97. Perez, R.P., et al., *A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines*. Eur J Cancer, 1993. **29A**(3): p. 395-9.
98. Fricker, S.P. and R.G. Buckley, *Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents*. Anticancer Res, 1996. **16**(6B): p. 3755-60.
99. Kubota, T., et al., *Colorimetric chemosensitivity testing using sulforhodamine B*. J Surg Oncol, 1993. **52**(2): p. 83-8.
100. Papazisis, K.T., et al., *Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay*. J Immunol Methods, 1997. **208**(2): p. 151-8.
101. Gratzner, H.G., *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication*. Science, 1982. **218**(4571): p. 474-5.
102. Magaud, J.P., I. Sargent, and D.Y. Mason, *Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake*. J Immunol Methods, 1988. **106**(1): p. 95-100.
103. Stein, G.S., et al., *Cell synchronisation as a basis for investigating control of proliferation in mammalian cells*. Cell growth and apoptosis, 1995: p. 193-204.
104. Falk, L.A., et al., *Induction of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), receptor expression and TGF-beta 1 protein production in retinoic acid-treated HL-60 cells: possible TGF-beta 1-mediated autocrine inhibition*. Blood, 1991. **77**(6): p. 1248-55.
105. Coffman, F.D. and G.P. Studzinski, *Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication*. Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 58-73.
106. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
107. Liu, M., A. Iavarone, and L.P. Freedman, *Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31723-8.
108. Liu, M., et al., *Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937*. Genes Dev, 1996. **10**(2): p. 142-53.
109. Defacque, H., et al., *Transforming growth factor-beta1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids*. J Cell Physiol, 1999. **178**(1): p. 109-19.
110. Rots, N.Y., et al., *Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2721-9.
111. Zada, A.A., et al., *Downregulation of c-Jun expression and cell cycle regulatory molecules in acute myeloid leukemia cells upon CD44 ligation*. Oncogene, 2003. **22**(15): p. 2296-308.
112. Gadhoum, Z., et al., *CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27Kip1*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1059-68.
113. Vogel, V., *Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 459-88.
114. Nishikawa, S., et al., *Stromal cell-dependent bone marrow culture with a nearly protein-free defined medium*. Immunol Lett, 1994. **40**(2): p. 163-9.
115. Libby, P., *Long-term culture of contractile mammalian heart cells in a defined serum-free medium that limits non-muscle cell proliferation*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(9): p. 803-11.

116. Woessner, J.F., Jr., *Serum hyaluronan: a status report from the joint*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(7): p. 927-30.
117. Weber, G.F., et al., *Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)*. Science, 1996. **271**(5248): p. 509-12.
118. Gao, C., et al., *Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells*. Carcinogenesis, 2003. **24**(12): p. 1871-8.
119. Marroquin, C.E., et al., *Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells*. Immunol Lett, 2004. **95**(1): p. 109-12.
120. Ahrens, T., et al., *Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid*. Oncogene, 2001. **20**(26): p. 3399-408.
121. Assoian, R.K., Fleurdelys B.E., Stevenson H.C., *Expression and secretion of TGF β by activated human macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**: p. 6020-6024.
122. Testa, U., et al., *Transforming growth factor-beta potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines*. J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2418-30.
123. Ruehl, M., et al. *Kollagen XIV induziert Quieszenz und eine Differenzierung hepatischer Sternzellen und Fibroblasten*. in *55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten*. 2000. Hamburg, BRD.
124. Pucillo, C.E., et al., *Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix*. Immunology, 1993. **80**(2): p. 248-52.
125. Rosel, M., et al., *Involvement of CD44 variant isoform v10 in progenitor cell adhesion and maturation*. Exp Hematol, 1999. **27**(4): p. 698-711.

7. Abkürzungen

ΔE_{560} nm	Extinktionsdifferenz bei 560nm Wellenlänge
[³ H]	Tritium
[³ H]-TdU	<i>uptake</i> von tritiummarkiertem Thymidin
μ Ci	MikroCurie, Ci ist die alte Einheit der Radioaktivität
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
AML	Akute myeloische Leukämie
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Datenbank tierischer Zelllinien
AZM	Ausgangs-Zellzahl pro Mikrokultur, d. h. die Zellzahl einer Mikrokultur (je 200 μ l pro <i>well</i>) zum Versuchszeitpunkt 0
b-FGF	basaler Fibroblastenwachstumsfaktor
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BrdU	5'-Brom-2'-deoxyuridin, ein Thymin-Analogon
BSA	<i>bovine serum-albumine</i> - Serum-Albumin vom Rind
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
c-kit	SCF-Rezeptor, CD 117
cpm	<i>counts per minute</i> – radioaktive Zerfälle pro Minute
Da	Dalton, Molekulargewicht
DDR	<i>Discoidin domain receptor</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
F	Frankreich
FACIT	fibrillenassoziertes Kollagen mit unterbrochenen tripelhelikalen Bereichen

FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAM	<i>goat anti mouse</i> - Ziege gegen Maus
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	<i>hour</i>
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, Pufferlösung
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> – humanes Leukozytenantigen
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> – interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG1	Immunglobulin G1
M	mol/Liter
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT1	<i>membrane type 1</i> - Membrantyp 1
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
N ₃	Tristickstoff
NEM	N-Ethylmaleimid
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGD-Sequenz	Sequenz der Aminosäuren Arg-Gly-Asp in einem Protein
rpm	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Grundmedium

rSCF	rekombinanter Stammzellfaktor
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SCF	<i>stem cell factor</i> – Stammzellfaktor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRB	Sulforhodamin B
TCA	Trichloressigsäure
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>Unit</i> – Einheit für die biologische Aktivität
Uk	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> – Gewicht pro Volumen
<i>well</i>	Zellkulturplattenloch
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat
XTT	3'-[1-[(Phenylamino)-Carbonyl]-3,4-Tetrazolium]-bis(4-Methoxy-6-Nitro)Benzyl-Sulfonsäurehydrat

Erklärung

„Ich, Christian Paetow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Kollagen XIV reduziert die Proliferation humaner, CD44-positiver Tumorzelllinien“ 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.

Berlin, den 09.01.2009

Christian Paetow

Danksagung

All jenen, die mein Leben während der Promotionszeit begleitet haben, spreche ich meinen tiefen Dank aus. Ihnen habe ich die notwendige Kraft und Ausdauer zu verdanken, durch die ich den gewählten Weg beständig weiter gehen konnte - ohne sie hätte das Ziel niemals erreicht werden können.

Herrn Prof. Dr. Rajan Somasundaram und Herrn Dr. Martin Rühl möchte ich insbesondere für die Überlassung des Themas und die außergewöhnlich enge Betreuung danken. Durch die von Ihnen geschaffene freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe machte es stets viel Freude, dort zu arbeiten.

Frau Dr. Urike Erben möchte ich ganz besonders herzlich danken für die zahlreichen Gespräche, Anregungen, Korrekturen und die stets konstruktive Kritik.

Frau Kathrin Thomsen-Mund sowie Frau Renate Ackermann danke ich für die Einarbeitung in die Methoden.