

Aus dem Institut/der Klinik für  
Gastroenterologie/Infektiologie/Rheumatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mesenchymale Wachstumsinhibition und Induktion der  
Differenzierung durch signalgebende Domänen von Kollagen  
XIV, insbesondere die N-terminale Fibronectin Typ III  
Homologie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christine Wagner  
aus Waldstetten (Württemberg)

Gutachter: 1. ....  
2. ....  
3. ....

Datum der Promotion: .....

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die extrazelluläre Matrix	3
1.2	Kollagene	4
1.3	Kollagen XIV	6
1.4	Zellrezeptoren für die extrazelluläre Matrix	10
1.5	Der CD44-Rezeptor	11
1.6	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Weitere Materialien	13
2.1.3	Medien, Lösungen und Reagenzien	14
2.1.4	Zelllinien	15
2.1.5	Kollagene	15
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultivierung	18
2.2.2	Beschichtung der Zellkulturflaschen mit EZM-Proteinen	19
2.2.3	Direkter Zusatz von gelösten Kollagen XIV-Fragmenten	19
2.2.4	Zellproliferationsuntersuchung	20
2.2.5	Zellzahlbestimmung mit Sulforhodamin B	21
2.2.6	Zelladhäsionsversuche	22
2.2.7	Reaktivierungsversuche mit Hautfibroblasten	22
2.2.8	Durchflusszytometrie	23
2.2.9	Zellmorphologie	24

2.2.10	Zelldifferenzierungsassay mit 3T3-L1 Präadipozyten	24
2.2.11	Statistische Auswertung	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Natives, immobilisiertes Kollagen XIV hemmt konzentrationsabhängig die Proliferation von Hautfibroblasten, 3T3, HT1080 und Melanomzellen	26
3.2	Immobilisierte rekombinante Kollagen XIV-Fragmente zeigen unterschiedliche Effekte auf die [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Aufnahme von HF und 3T3-Zellen	27
3.3	Einfluss von gelösten rekombinanten Kollagen XIV-Fragmenten auf die Proliferation von HF und 3T3-Zellen.	29
3.4	Adhäsion	31
3.5	Reaktivierungsversuch mit Hautfibroblasten	32
3.6	Kollagen XIV verändert das Wachstumsmuster von 3T3-Zellen	35
3.7	Transformation von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten durch eine Exposition mit Kollagen XIV	38
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	44

## Abstract

Kollagen XIV ist ein Molekül der extrazellulären Matrix, das insbesondere in differenziertem Gewebe und in späten Stadien der embryonalen Entwicklung exprimiert wird. Da Kollagen XIV in stark proliferierendem oder entdifferenziertem Gewebe fast nicht nachweisbar ist, ist eine funktionelle Rolle in der Erhaltung der Zelldifferenzierung anzunehmen.

In dieser Arbeit wurde eine antiproliferative, Quieszenz- und Differenzierung-induzierende Wirkung von humanem Kollagen XIV und seinen rekombinaten Fragmenten auf mesenchymale Zellen nachgewiesen. Bei humanen Hautfibroblasten, Mausfibroblasten und 3T3-L1 Präadipozyten konnte die Proliferation signifikant reduziert werden, während die Zellzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen unbeeinflusst blieben. Die Zellen zeigten keine Zeichen einer verstärkten Apoptose und durch erhöhtes Nährstoffangebot konnte wieder eine maximale Proliferation erreicht werden. Das weist darauf hin, dass durch Kollagen XIV eine reversible zelluläre Quieszenz ausgelöst wird. Die Gegenwart von Kollagen XIV führte bei Fibroblasten *in vitro* zu einer Veränderung des Wachstumsmusters dahingehend, dass sich Zellaggregate und Ringstrukturen ausbildeten, die als Differenzierungshinweis interpretiert wurden. Außerdem konnte durch Kollagen XIV eine Transformierung von 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten angestoßen werden, die durch eine Vermehrung von intrazellulären Fetttröpfchen nachgewiesen wurde.

Mittels rekombinanter Fusionspeptide konnte die für diese Effekte verantwortliche Domäne auf Kollagen XIV identifiziert werden: Das aminoternale Kollagen XIV-Teilstück Gln29-Pro154, das die erste Fibronectin-Typ III-Domäne und die carboxyterminal angrenzenden 39 Aminosäuren beinhaltet, induzierte die gleichen Effekte – nur stärker – wie das Kollagen XIV-Molekül. Interessanterweise trägt dieses Teilstück auch die Zellrezeptor-Bindungsstelle. Bei den übrigen Kollagen XIV-Fragmente konnten diese Wirkungen nicht beobachtet werden.

Somit konnte die Hypothese, dass Kollagen XIV Differenzierung induziert mittels der durchgeführten Experimente bestätigt und die hierfür verantwortliche Domäne auf Kollagen XIV identifiziert werden.

Daraus lassen sich möglicherweise für die Zukunft neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen ableiten, z.B. die Entwicklung von Kollagen XIV-Analoga, um Prozesse wie das Tumorstadium oder die Differenzierung von Stammzellen zu modulieren.

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Erklärung

„Ich, Christine Wagner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Mesenchymale Wachstumsinhibition und Induktion der Differenzierung durch signalgebende Domänen von Kollagen XIV, insbesondere die N-terminale Fibronektin Typ III Homologie 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.“

Datum

Unterschrift