

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet man die Strukturen, die den Raum zwischen den Zellen der verschiedenen Gewebe ausfüllen und für deren Integrität essentiell sind. Aus der Vielfalt der verschiedenen Anforderungen an die EZM ergibt sich eine in ihrem Aufbau und ihrer Funktion komplexe Struktur, die sich je nach Gewebe und Organ unterscheidet und die typische Histoarchitektur bestimmt. Sie entwickelt sich in der frühen embryonalen Entwicklung aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm. In einigen Geweben nimmt sie nur einen schmalen Raum ein (Muskulatur, Leber etc.), in anderen stellt sie dagegen den eigentlichen Funktionsträger des Gewebes dar (Knochen, Knorpel, Sehnen etc.). Sie erfüllt auf der einen Seite verschiedene mechanische Funktionen wie die Ausbildung eines Stützgerüsts zur Anhaftung und Migration der Zellen oder die Bildung von Gleitlagern in Gelenken und Sehnenscheiden. Auf der anderen Seite stehen regulative Aufgaben. So versorgt die EZM die Zellen mit bestimmten biologischen Informationen und nimmt damit Einfluss auf Zellaktivitäten, wie die Adhäsion, Zellproliferation und -differenzierung, Migration und Apoptose (1). Diese gegenseitige Beeinflussung zwischen Zellen und EZM findet entweder direkt über Zellrezeptor-Matrix-Bindungen statt oder indirekt über assoziierte Faktoren, die in diesem Zusammenspiel von größter Bedeutung sind. Zu diesen Faktoren gehören Chemokine, Wachstumsfaktoren und die auf die Matrix einwirkenden Enzyme sowie deren Inhibitoren (2). Funktionell bildet diese Gruppe aus EZM, Zellen und den angesprochenen assoziierten Faktoren eine Einheit, die sowohl im Rahmen physiologischer als auch pathologischer Mechanismen eine wichtige Rolle spielt. Als Beispiel für pathologische Vorgänge seien hier Organfibrosen (3), Tumorwachstum und Metastasierung sowie Autoimmunerkrankungen genannt (2).

Hauptkomponente der EZM sind die Kollagene. Daneben unterteilt man noch in nichtkollagene Glykoproteine, Proteoglykane und Glykosaminoglykane. Eine scharfe Abgrenzung der strukturellen Gruppen voneinander ist aber nicht immer möglich, da beispielsweise einige Kollagene Glykosaminoglykanseitenketten oder auch sehr lange nichtkollagene Domänen aufweisen.

1.2 Kollagene

Kollagene stellen quantitativ den größten Anteil der EZM dar. Sie machen rund ein Drittel der Körperproteinmasse aus. Die bislang 28 bekannten Kollagene werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe sind Fibrillen-bildende Kollagene, die eine relativ homogene Gruppe darstellen (Kollagen I, II, III, V und XI). Die charakteristische Tripelhelix, die das gemeinsame Merkmal für alle Kollagene darstellt, steht hier als typisches Strukturmerkmal ganz im Vordergrund. Diese Tripelhelix ist durch eine bestimmte sich wiederholende Tripeptidsequenz definiert, die die Aminosäuren (Gly-X-Y)_n enthalten – wobei jede dritte Aminosäure Glycin ist, an Position X häufig Prolin und an Position Y häufig Hydroxyprolin oder ebenfalls Prolin steht (4). Bestimmte Variationen in der Aminosäuresequenz oder Unterbrechungen der Tripelhelix ermöglichen eine spezifische supramolekulare Organisation der Moleküle (5). Die zweite Gruppe ist im Gegensatz zur ersten sehr heterogen. Hier fasst man alle nicht-fibrillären Kollagene zusammen, die eine oder mehrere nichtkollagene Domänen aufweisen. Diese können bis zu 90% ihrer molekularen Masse ausmachen (6, 7).

Nach der jeweiligen Struktur und Funktion werden sie nochmals in verschiedene Untergruppen eingeteilt: Netzwerk-bildende Kollagene (IV, VIII und X), Kollagen, das sich zu perlenkettartigen Mikofilamenten zusammenlagert (VI), Kollagen, das verankernde Filamente bildet (VII), Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (IX, XII, XIV, XVI, XIX und XX), transmembranäre Kollagene (XVII) und Multiplexine (multiple tripelhelikale Domänen mit Unterbrechungen) (XIII, XV und XVIII) (8).

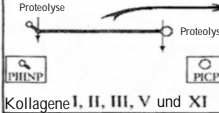
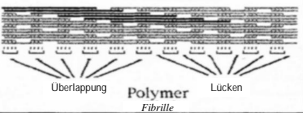

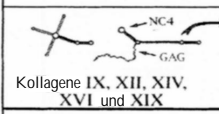
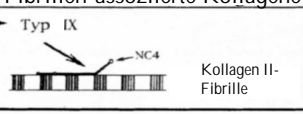
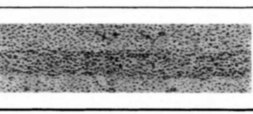
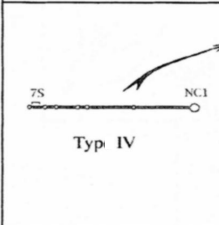
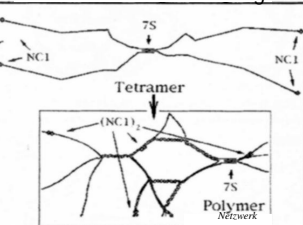
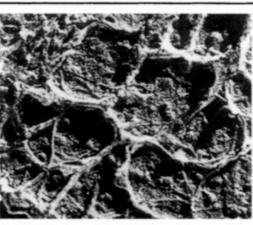
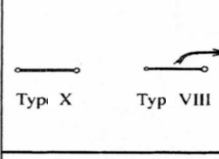
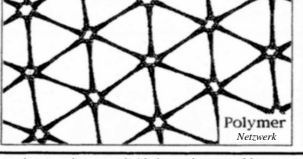
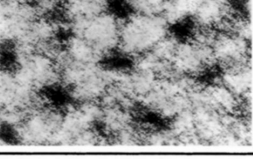
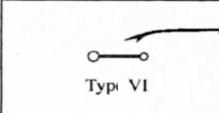
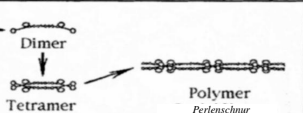
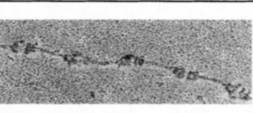
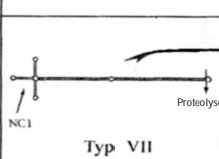
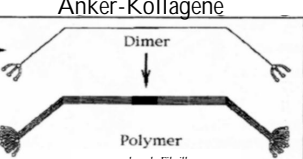
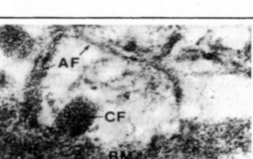
Moleküle N-Terminus 100 nm C-Terminus	Struktur 100 nm	Ultrastruktur
Proteolyse  Kollagene I, II, III, V und XI	 Überlappung Polymer Lücken Fibrille	
 Kollagene IX, XII, XIV, XVI und XIX	 Typ IX Kollagen II-Fibrille	
 Typ IV	 7S NC1 Tetramer Polymer Netzwerk	
 Typ X Typ VIII	 Polymer Netzwerk	
 Typ VI	 Dimer Tetramer Polymer Perlschnur	
 Typ VII	 Dimer Polymer verankerte Fibrille	
transmembranäre Kollagene		
Kollagen XVII		
multiple tripelhelikale Domänen-bildende Kollagene		
Kollagene XIII, XV, XVIII		

Abb. 1

Unterschiedliche Gruppen der Kollagenmoleküle mit schematischer und elektronenmikroskopischer Darstellung der Struktur. Modifiziert nach (6).

Die Fibrillen-bildenden Kollagene werden intrazellulär als Prokollagene mit langen N- und C-terminalen globulären Propeptiden synthetisiert. Auch die α -Tripelhelixbildung findet bereits hier statt. Die Zusammenlagerung einzelner Prokollagene zu einer reifen Kollagenfibrille ist erst möglich nach der extrazellulären enzymatischen Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide durch Prokollagen-Propeptidasen, die zur Gruppe der Metalloproteinasen gehören (9, 10). Die entstandenen Kollagenfibrillen werden durch kovalente Vernetzung an spezifischen Lysin- und Hydroxylysinresten stabilisiert (4).

1.3 Kollagen XIV

Kollagen XIV gehört zu der Gruppe der Fibrillen-assoziierten Kollagene (fibril-associated collagens with interrupted triple-helices = FACITs). Die Struktur dieser Moleküle zeichnet sich dadurch aus, dass ihre kollagenen Strukturen durch globuläre, nichtkollagene Domänen unterbrochen sind (8).

Ursprünglich wurde Kollagen XIV der beschreibende Name Undulin gegeben, da es sich im Lichtmikroskop in charakteristischen gleichförmig welligen und parallel zueinander verlaufenden Fasern darstellte (11, 12). Durch die Bestimmung der kompletten Primärstruktur von Undulin bzw. Kollagen XIV wurde gezeigt, dass diese Moleküle identisch sind (12, 13).

Es handelt sich um ein Homotrimer (3 α 1[XIV]-Ketten) von insgesamt ca. 650 kDa Molekulargewicht (pro Kette 210-220 kDa) (8, 12, 14, 15). Die drei Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden, die sich zwischen Cystein-Resten bilden (16). An den einzelnen Ketten befinden sich carboxyterminal jeweils zwei kurze kollagene Domänen (COL1 und COL2), die weniger als 14% des Moleküls ausmachen und die von nichtkollagenen, globulären Domänen umgeben sind (NC1-3) (17) (siehe Abb. 2). Aminoterminal findet sich der längste globuläre Anteil (NC3), der u.a. zwei von Willebrand-Faktor-A-Domänen und 7¼ Fibronectin-Typ-III-Wiederholungen enthält (13, 18). Kollagen XIV zeigt starke strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Kollagen aus der Gruppe der FACITs. Die COL1-Domäne ist beispielsweise zu 64% identisch mit der Primärstruktur der COL1-Domäne von Kollagen XII (19).

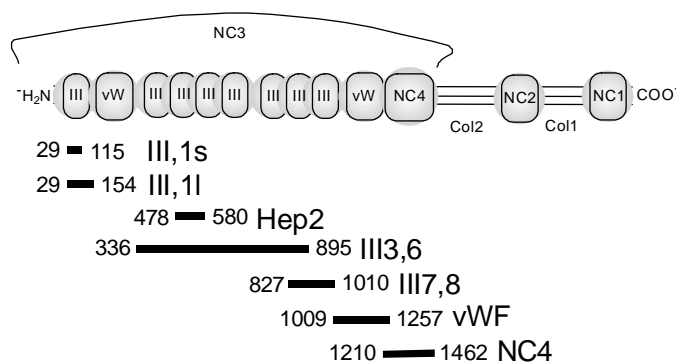


Abb. 2

Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus von humanem Kollagen XIV.

'III' kennzeichnet die Fibronectin Typ III Homologien, 'A' von Willebrand Faktor A Domänen, 'NC4' eine nicht kollagene Domäne, die innerhalb des langen, aminoterminalen nicht kollagenen Bereichs 'NC3' liegt, 'COL1' und 'COL2' die beiden kollagenen Segmente, 'NC1' und 'NC2' die beiden carboxyterminalen, nicht-kollagenen Domänen. Modifiziert nach (20).

Kollagen XIV wird hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert. Aber auch andere Zellen, wie Fettzellen (z.B. hepatische Sternzellen), Endothelzellen, Osteoblasten oder endo- und perineurale Zellen peripherer Nerven besitzen diese Fähigkeit (11, 15, 21).

In Bindungsstudien mit gereinigtem Kollagen XIV wurden Affinitäten zu den Kollagenen Typ I, Typ III, der tripelhelikalen Domäne von Kollagen Typ VI (15, 22) sowie den Proteoglykanen Perlecan und Decorin und zu Heparin beobachtet (15, 23). Für die Bindung mit den Glykosaminoglykanen wurden zwei unterschiedliche Stellen auf Kollagen XIV beschrieben: die eine ist auf der N-terminalen NC3-Domäne lokalisiert (24); die andere liegt auf der entgegengesetzten Seite des Moleküls, auf der C-terminalen NC1-Domäne (25, 26).

Bei Untersuchungen kollagener Makromoleküle fand man an der Oberfläche reifer Kollagenfibrillen, typischerweise bei Kollagen I, eine Anlagerung von Kollagenen aus der FACIT-Gruppe (27, 28). Bei Kollagen XIV findet diese Verbindung indirekt über Proteoglykane, wie dem eben erwähnten Decorin statt (23). Dabei ragt der lange aminoternale nicht-kollagene Anteil von Kollagen XIV hervor, so dass sich an dieser Stelle keine weiteren tripelhelikalen Kollagenmonomere mehr an die Kollagenfibrille anlagern können (5). Das laterale Dickenwachstum wird dadurch gestoppt. Kollagen XIV scheint somit eine Funktion in der supramolekularen Regulation der Fibrillenordnung zu haben. Außerdem bindet Kollagen XIV auch ein für die Bildung von Kollagenen aus Prokollagenen wichtiges Enzym, die Prokollagen I N-Proteinase. Das legt die Vermutung nahe, dass Kollagen XIV zusätzlich das Wachstum von Kollagenfibrillen beeinflusst, indem dieses Enzym in der Nähe von Kollagen I-Fibrillen immobilisiert wird (9).

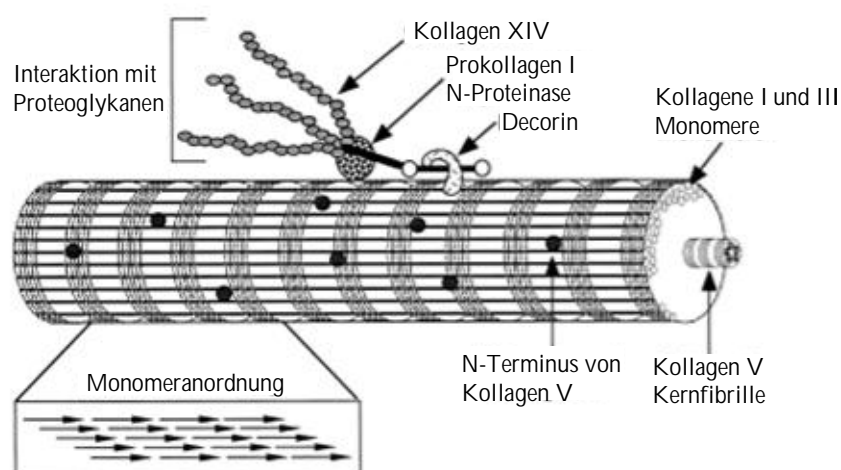


Abb. 3
Schematische Darstellung einer Kollagen I-enthaltenden Fibrille mit Anlagerung von Kollagen XIV über Decorin an der Oberfläche. Modifiziert nach (5).

Die Verteilung von Kollagen XIV im Gewebe zeigt eine Assoziation zu dicht gepackten, reifen Kollagenfibrillen, vor allem zu Kollagen I und Kollagen III. Hauptsächlich findet man es in ausdifferenzierten und sehr geordnet ausgerichteten mesenchymalen Geweben. Typische Beispiele für das Vorkommen von Kollagen XIV sind Knorpel, Periost, Perichondrium, die Dermis, Bändern, Sehnen, Skelettmuskel, Herzmuskel, Nerven, die Adventitia von Blutgefäßen, das Stroma der Lunge, das Knochenmark und die Portalfelder der Leber (8, 11, 29).

In proliferierendem Mesenchym, das sich stetig in Veränderung und Erneuerung befindet, wie z.B. im Perisinusoidalraum der Leber, ist dagegen fast kein Kollagen XIV nachzuweisen. Auch in undifferenziertem Embryonalgewebe, in eher ungeordnet aufgebautem Bindegewebe oder im Stroma von Tumoren liegt es nicht oder nur in auffallend geringen Mengen vor (21). Untersuchungen des Gewebes von oralem Kaposi-Sarkom haben z.B. ein völliges Fehlen von Kollagen XIV gezeigt (30).

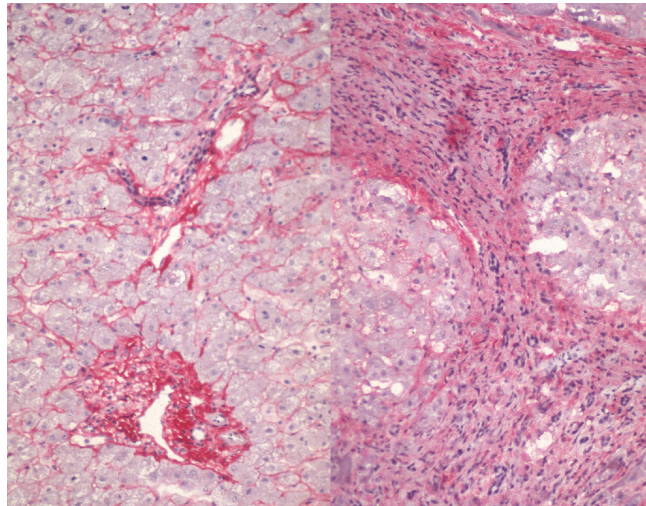


Abb. 4
Immunhistologische Färbung (APAAP) von Kollagen XIV (Undulin) in normaler (links) und fibrotischer Leber (rechts) (31). Kollagen XIV ist vermehrt in den fibrotischen Septen (hauptsächlich Kollagene I, III) lokalisiert.

Eine gesteigerte Expression von Kollagen XIV findet sich in fibrosierten Organen (8, 29, 31). Die dabei erhöhte Serumkonzentration von Kollagen XIV wird in diesem Zusammenhang auch als nichtinvasiver Parameter der Verlaufskontrolle einer Fibrose diskutiert (32, 33).

Interessant im Zusammenhang mit der Verteilung von Kollagen XIV im Gewebe ist der Vergleich mit dem strukturell sehr ähnlichen aufgebauten Kollagen XII (ebenfalls ein Kollagen aus der Gruppe der FACITs), welches im Gegensatz zu Kollagen XIV vor allem in undifferenziertem Gewebe exprimiert wird: Während der Embryonalentwicklung ist anfangs Kollagen XII verstärkt nachzuweisen, welches dann im Laufe der Weiterentwicklung und Ausdifferenzierung immer mehr durch Kollagen XIV ersetzt wird (21, 34). Postnatal findet man Kollagen XII z.B.

um Haarfollikel herum, während Kollagen XIV in diesem stark proliferierendem Gewebe auffallend spärlich auftritt (34).

Ähnlich antagonistisch wie das Auftreten von Kollagen XII zu Kollagen XIV zeigt sich die Expression des Glykoproteins Tenascin-C, einem Disulfid-vernetzten Hexamer (Synonym: Hexabrachion) mit einem Molekulargewicht von 1.900 kDa (35). Es wird nahezu selektiv in unmittelbarer Nähe zu schnell proliferierendem Epithel exprimiert, vor allem während der frühen Embryonalphase. Postnatal kann es in geringerem Maße in Darmepithel, im Nierengewebe, während der Wundheilung und in mechanisch stark beanspruchtem Gewebe nachgewiesen werden (36-39). Stark exprimiert wird es dagegen im Kontext mit einigen pathologischen Zuständen, wie beispielsweise während der akuten Phase einer Entzündung (40), bei malignen Tumoren (35, 41, 42), bei der kollagenen Kolitis (43) oder im Rahmen der Fibrogenese der Leber -hier im Gegensatz zu Kollagen XIV nur vorübergehend in den proliferierenden Septen, nicht jedoch in den bereits fibrosierten Arealen (29, 44). In ruhendem oder differenziertem Gewebe kommt Tenascin dagegen kaum vor (11).

Über den Regulationsmechanismus dieser gegenläufigen Expression ist bisher wenig bekannt. Untersuchungen mit dem transformierten Wachstumsfaktor- β (TGF- β), einem Wachstumsfaktor in der Regulation der EZM-Protein-Synthese, zeigten, dass der Gehalt der $\alpha 1$ (XII) mRNA sowie von Tenascin-C durch TGF- β hochreguliert wird, während der von $\alpha 1$ (XIV) auf etwa 30% abgesenkt wurde (45, 46). Außerdem scheint auch die Struktur der EZM selbst an der Regulation der Expression dieser verschiedenen FACIT-Moleküle beteiligt zu sein. Das zeigt sich beispielsweise in Beobachtungen von Zellen hinsichtlich der Produktion von EZM-Molekülen *in vitro*. In Kulturflaschen (zweidimensional) nimmt der Grad der Organisation der Kollagenfibrillen ab und die meisten Zelllinien verlieren ihre Fähigkeit Kollagen XIV zu produzieren. Nur transformierte Zellen können unter diesen Bedingungen weiterhin Kollagen XIV produzieren, wie z.B. Rhabdomyosarkom- und Osteosarkomzellen (30, 47). Während in zweidimensionalen Kulturen die Produktion anderer Kollagene also ansteigt, beginnen Zellen in einer dreidimensionalen Matrix Kollagen XIV zu exprimieren (34). Die unnatürlichen Bedingungen in Kulturflaschen (2D) sind für die Zellen gleichbedeutend mit Stress: Fibroblasten oder hepatische Sternzellen werden beispielsweise aktiviert und die Synthese von Kollagenen (I, III und VI) dadurch stimuliert, während die Zellen in dreidimensionalen Gelen oder Matrigel™ (einem Basalmembran-ähnlichen Substrat) quieszent werden und die Produktion dieser EZM-Komponenten verringern (48, 49).

Zusammenfassend weisen die angeführten Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass Kollagen XIV eine Rolle bei der supramolekularen Organisation des Bindegewebes und der zellulären Differenzierung spielt.

1.4 Zellrezeptoren für die extrazelluläre Matrix

Die Interaktion zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen findet über unterschiedliche Rezeptoren statt. Durch die Adhäsion an Zellrezeptoren können Signaltransduktionsprozesse ausgelöst und beeinflusst werden, die u.a. zu einer Phosphorylierung und Dephosphorylierung intrazellulärer Proteine, vorübergehender Aggregation von Proteinen zu Signaltransduktionskomplexen, zu Änderungen von Ionenströmen oder Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen. Dabei leiten z.B. aktivierte Proteinkinasen durch Phosphorylierung ihrer jeweiligen Substrate an Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Resten die Signaltransduktionkaskaden ein. Als weiteres Beispiel sei der G-Protein vermittelte Signaltransduktionsweg erwähnt, über den z. B. viele Ionenkanäle und Chemokine gesteuert werden.

Auf diesem Weg wirken Moleküle der EZM auf Genexpression, Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration, Apoptose und andere physiologische oder pathologische Prozesse ein (1, 2).

Ein großer Teil der Zell-Matrix-Interaktionen findet über Rezeptoren statt, die zur Familie der Integrine gehören. Integrine sind transmembranäre nicht-kovalent gebundene heterodimere Glykoproteine, die sich jeweils aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit zusammensetzen. Sie bestehen aus einem großen extrazellulären, einem transmembranären und einem meist kleinen intrazellulären Anteil. Von den Untereinheiten sind mehrere Varianten bekannt, die durch verschiedene Kombinationen zu unterschiedlichen Bindungsspezifitäten führen. Der N-terminale extrazelluläre Teil bildet eine Nische für die Bindung mit seinem Liganden, z.B. den Kollagenen und der spezifischen Peptidsequenz Arg-Gly-Asp (50, 51).

Weitere Moleküle, die als Zellrezeptoren für die EZM dienen, sind Syndecane (52) und andere transmembranäre Proteoglykane, wie z.B. NG2 und CD44 sowie die discoidin-domain Rezeptoren (DDR) (53).

1.5 Der CD44-Rezeptor

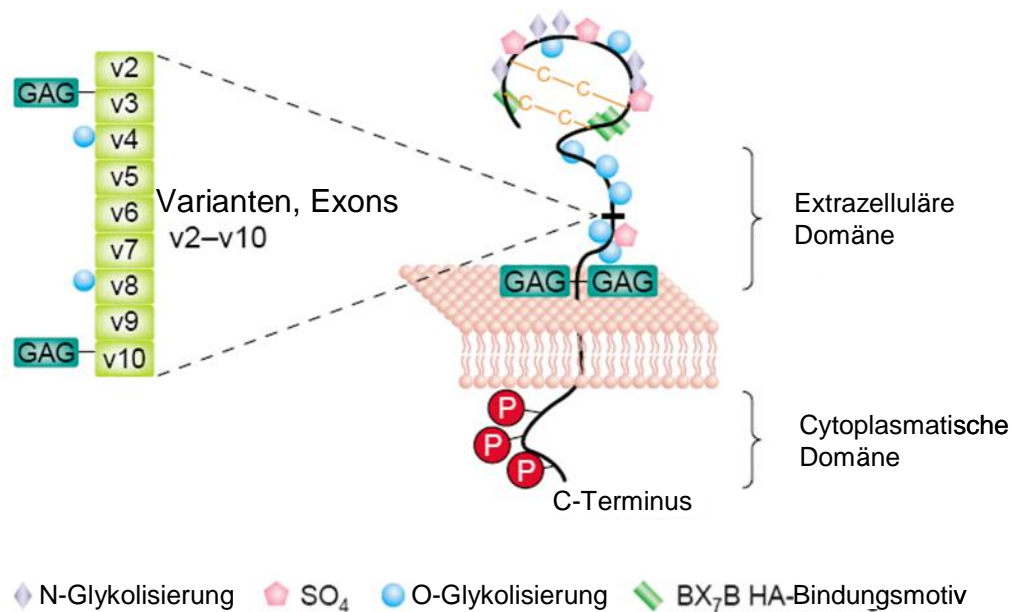


Abb. 5
Schematische Darstellung des CD44-Rezeptors. Modifiziert nach (54).

Als bisher einziger Rezeptor für Kollagen XIV wurde ein transmembranäres Proteoglykan, der CD44-Rezeptor beschrieben (55). Die für andere Kollagene so typischen Integrine scheinen für die Zelladhäsion an Kollagen XIV offenbar keine Rolle zu spielen (56). Der CD44-Rezeptor ist ein ubiquitär vorkommendes Adhäsionsmolekül auf Zelloberflächen, das aus einem aminoterminalen extrazellulären Anteil besteht, der die Ligandenbindungsstelle enthält, einem transmembranären und einem carboxyterminalen zytoplasmatischen Anteil.

Einer der wichtigsten Bindungspartner für CD44 ist Hyaluronsäure. Außerdem gehören zu den vielen weiteren Liganden von CD44 Kollagen I, VI (1), XIV (55), Fibronectin, Laminin und Osteopontin (54).

Die CD44-Variante, die für die Bindung an Kollagen XIV verantwortlich ist, (CD44-CS; CS = Chondroitin-Sulfat) weist eine für die Interaktion wahrscheinlich maßgebliche Chondroitin/Dermatan-Sulfat-Seitenkette auf (55). Die Bindungsregion auf Kollagen XIV befindet sich an der N-terminalen Fibronectin-Typ-III-Wiederholung der nicht-kollagenen Domäne NC3. Diese Bindung wird deutlich durch den C-terminal unmittelbar folgenden Teil verstärkt. Hier liegt auch eine Bindungsstelle für Heparin (EK RKDPKP) (20).

1.6 Fragestellung

Vor dem Hintergrund, dass Kollagen XIV vor allem in differenziertem Gewebe exprimiert wird und es bisher nur wenige funktionelle Daten zu Kollagen XIV gibt, sollte in der vorliegenden Arbeit

1. der Einfluss von Kollagen XIV auf die Proliferation, die Quieszenz und die Differenzierung auf zellulärer Ebene untersucht werden und
2. sollte versucht werden, die Sequenz auf dem Kollagen XIV-Molekül, das diese Effekte moduliert, durch den Einsatz rekombinanter Fragmente von Kollagen XIV einzugrenzen bzw. zu identifizieren.