

3 Ergebnisse

3.1 Natives, immobilisiertes Kollagen XIV hemmt konzentrationsabhängig die Proliferation von Hautfibroblasten, 3T3, HT1080 und Melanomzellen

Humane Hautfibroblasten, 3T3-Zellen, HT1080 und A375-Zellen zeigten nach Kultivierung auf immobilisiertem nativem Kollagen XIV eine konzentrationsabhängige Reduktion der [³H]-Thymidin-Aufnahme. So führten 3 µg immobilisiertes Kollagen XIV zu einer maximalen Reduktion der Proliferation auf 31 % (HF), 44 % (3T3), 70 % (A375) und 30 % (HT1080) im Vergleich zum Wachstum auf der Kollagen I-Kontrolle (3 µg/Vertiefung einer 96-Loch-Platte). Dabei wurde die halbmaximale Inhibition bei HF und HT1080 bei 0,5 µg Kollagen XIV erreicht, wohingegen 3T3-Zellen hierfür 1 µg Kollagen XIV benötigten und bei A375-Zellen selbst mit 3 µg keine halbmaximale Inhibition der Proliferation erreicht wurde.

Zur Kontrolle war auch der reine Harnstoffpuffer ohne das Kollagen auf die Mikrotiterplatten aufgebracht worden und ebenso behandelt worden wie die Vertiefungen mit einem Kollagen. Zellen auf diesen Kontrollen zeigten keine Unterschiede gegenüber Zellen, die direkt auf Plastik ausgesät worden waren (nicht dargestellt). Durch das dreimalige Waschen mit PBS scheint der zellunverträgliche Harnstoff gut entfernt worden zu sein, so dass dadurch keine Inhibition des Zellwachstums eintritt.

Bei der parallel durchgeführten Zellzahlbestimmung, bei der die Zellen entsprechend dem Proliferationsversuch für eine Dauer von 24 Stunden auf Kollagen XIV inkubiert wurden, blieb die Zellzahl bei den unterschiedlichen Kollagenbeschichtungen annähernd gleich (nicht gezeigt).

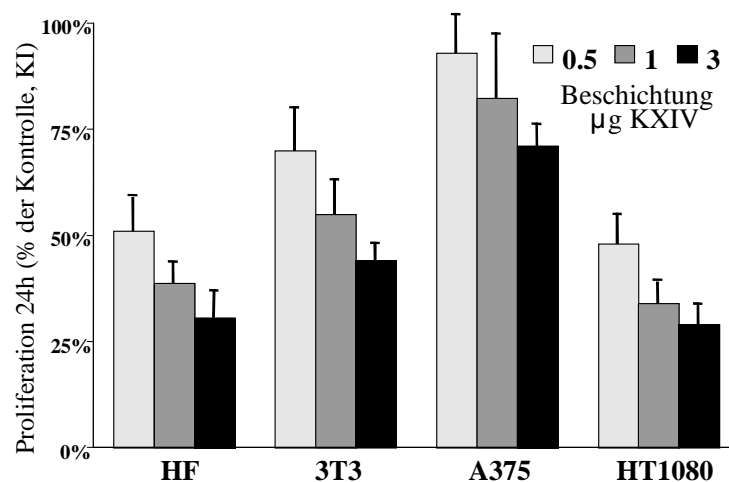


Abb. 8
Einfluss von nativem, immobilisiertem Kollagen XIV auf die Zellproliferation.

Hautfibroblasten (HF), Mausfibroblasten (3T3 Swiss albino), Melanomzellen (A375), Fibrosarkomzellen (HT1080) wurden jeweils in mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kollagen XIV (0,5, 1, 3 µg) vorbeschichteten Vertiefungen einer 96-Loch Platte inkubiert und der $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau gemessen. Die Proliferation der Zellen ist jeweils in Prozent zur Kontrolle auf Kollagen I dargestellt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von 6fach-Werten eines repräsentativen Versuchs von insgesamt 6 Versuchen pro Zelllinie.

3.2 Immobilisierte rekombinante Kollagen XIV-Fragmente zeigen unterschiedliche Effekte auf die $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Aufnahme von HF und 3T3-Zellen

Zur Eingrenzung und Identifizierung der proliferationsinhibierenden Sequenz von Kollagen XIV wurden rekombinante Kollagen XIV-Fragmente immobilisiert und HF sowie 3T3-Zellen ausgesät. Zur Untersuchung der Proliferation wurde wiederum die $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Aufnahme gemessen.

Wie in [Abb. 9](#) gezeigt, konnte die elongierte Fibronectin Typ III Domäne als besonders proliferationshemmend identifiziert werden (nur noch 9% der Proliferation im Vergleich zu Kollagen I bei HF), wohingegen die Fragmente III1s, III3,6, III7,8, vWF und NC4 keine wesentlichen Effekte zeigten. Hingegen lässt sich eine deutliche Stimulation bei beiden Zelllinien durch Hep2 (128% bei HF, 225% bei 3T3) zeigen. Hier muss allerdings auch die Stimulation durch alleiniges GST (Kontrolle) erwähnt werden, die insbesondere bei den 3T3-Zellen stark ausfällt (161%), so dass die inhibitorische Wirkung mancher Peptide unter Umständen abgeschwächt bzw. proliferationsfördernde Peptide in ihrer Wirkung verstärkt werden. GST haftet aus technischen Gründen an allen Fusionspeptiden.

Auf dem proliferationsinhibierenden Fragment von Kollagen XIV, das die N-terminale Fibronectin Typ III Homologie enthält (III,11), ist die Zellbindungsstelle lokalisiert. Wie oben bereits

erwähnt, unterscheidet sich dieses Fusionsprotein durch eine zusätzliche carboxyterminale Sequenz von dem kürzeren Teilstück III,1s. Auf dieser zusätzlichen Sequenz von 39 Aminosäuren liegt zwischen AS 121-128 eine starke Heparinbindungsstelle (EKRKDPKP) (64). Diese Sequenz konnte in Zelladhäsionsstudien gegenüber dem kürzeren Teilstück III,1s die Zellbindung deutlich verstärken (24).

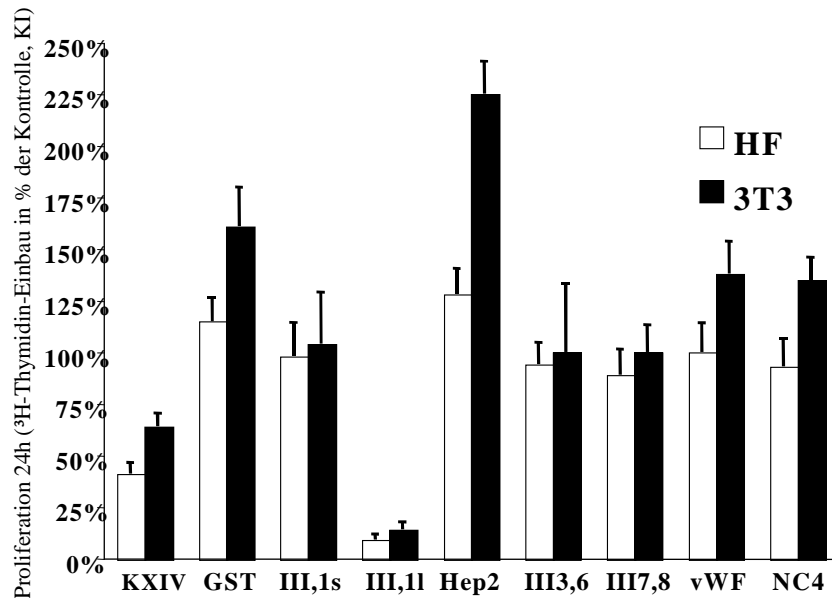


Abb. 9
Einfluss immobilisierter rekombinanter Kollagen XIV-Fragmente auf die Proliferation von HF und 3T3-Zellen.

Rekombinante Kollagen XIV-Fragmente, intaktes Kollagen XIV, KI und GST wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ /Loch immobilisiert, HF (Hautfibroblasten) und 3T3 (Mausembryofibroblasten) ausgesät, 24 Stunden inkubiert und der $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau über die letzten 4 Stunden bemessen. Die Werte sind in Relation zur Kollagen I-Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 6fach-Werten eines repräsentativen Experiments von insgesamt 6 Versuchen.

Zusammengefasst scheinen die teilweise gegenläufigen Wirkungen der verschiedenen Sequenzen sich im intakten Kollagen XIV-Molekül so gegenseitig zu modulieren, dass als Summationseffekt eine Proliferationsinhibition von 59% (HF) bis 36% (3T3) resultiert.

Die folgende Abbildung zeigt die Zellzahlbestimmung mit Sulforhodamin B, die parallel zum $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau durchgeführt wurde. Die Säulen des Diagramms bilden die Zellzahlen von HF und 3T3 auf den verschiedenen Beschichtungen ab. Die Werte sind in Prozent angegeben und beziehen sich auf die Zellzahl bei 1 μg Kollagen I (100%).

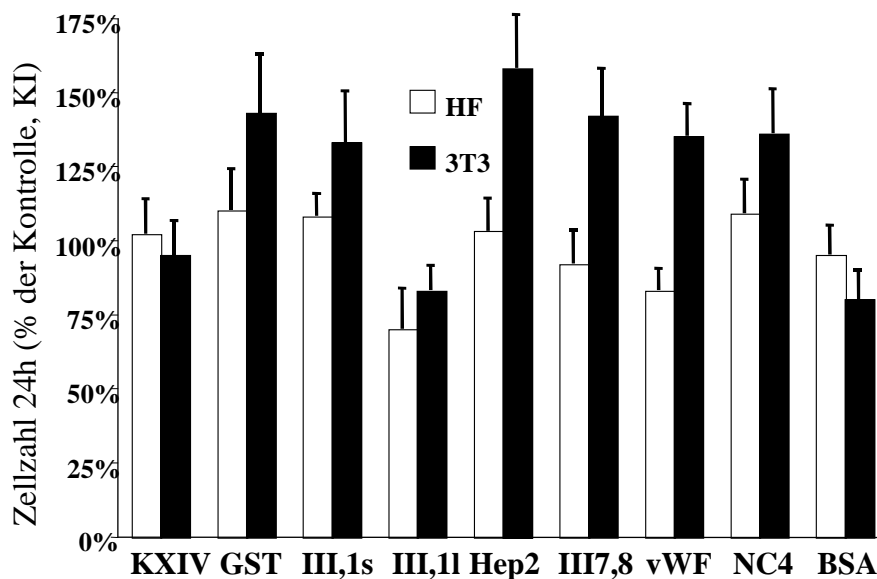


Abb. 10
Zellzahlbestimmung von HF und 3T3-Zellen nach 24h Wachstum auf Kollagen XIV-Fusionspeptiden.

HF und 3T3 wurden für [Abb. 10](#) parallel zum Proliferationsversuch auf beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Die Beschichtung erfolgte mit je 1 µg des Fusionsproteins von Kollagen XIV, mit dem intakten Kollagen XIV oder GST. Als Kontrolle diente die Zellzahl auf 1 µg Kollagen I. (MW und SA eines repräsentativen Versuchs von insgesamt 6 Versuchen).

Anders als auf immobilisiertem intaktem Kollagen XIV (erste beiden Säulen) variiert die Zellzahl auf den Fusionspeptiden. Auf dem Teilstück III,1l fällt die Zellzahl gegenüber Kollagen I etwas ab: bei 3T3-Zellen auf 83%, bei HF auf 70%. Demgegenüber steigt sie vor allem für 3T3-Zellen auf Hep2 (158%) und GST (143%) an. Diese Schwankungen sind für HF nicht signifikant.

Wie weiter unten gezeigt (

[Abb. 14](#)), ergibt die Zellzahlbestimmung von HF nach 40 h Inkubation keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Peptiden. Dies deutet darauf hin, dass die längeren Inkubationszeiten eine bessere Adhäsion der Zellen ermöglichen und dadurch stabilere Zellzahlen erreicht werden können. Das Fazit ist, dass durch Kollagen XIV und seine Peptide die Zellzahl im Untersuchungsintervall nicht signifikant beeinflusst wird.

3.3 Einfluss von gelösten rekombinanten Kollagen XIV-Fragmenten auf die Proliferation von HF und 3T3-Zellen.

Um Adhäsion als Ursache der antiproliferativen Effekte von Kollagen XIV und seiner Fragmente auszuschließen und um gleichzeitig eine dreidimensionale EZM zu simulieren, wurden gelöste Kollagen XIV-Fragmente alleine bzw. in Kombination mit immobilisiertem Kollagen XIV eingesetzt.

Es wurden zwei rekombinante Kollagen XIV-Fusionsproteine für diesen Versuch ausgewählt, die bei den bisherigen Versuchen (immobilisiert) besonders deutliche Effekte gezeigt hatten: III,11 (als inhibierendes Teilstück) und Hep2 (als stimulierendes Teilstück). Zur Kontrolle wurde außerdem GST eingesetzt.

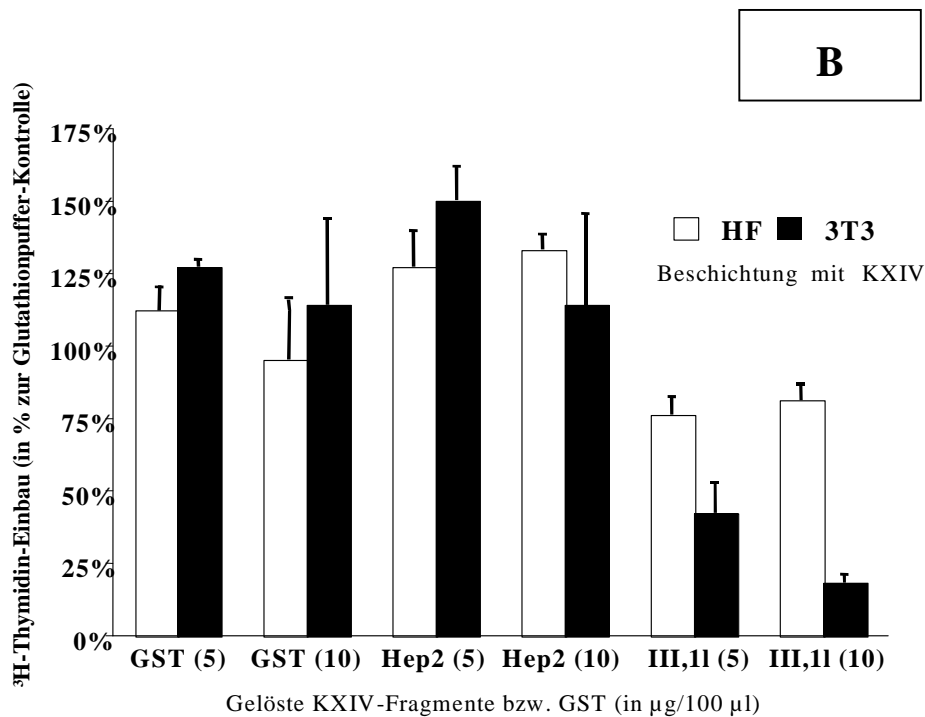
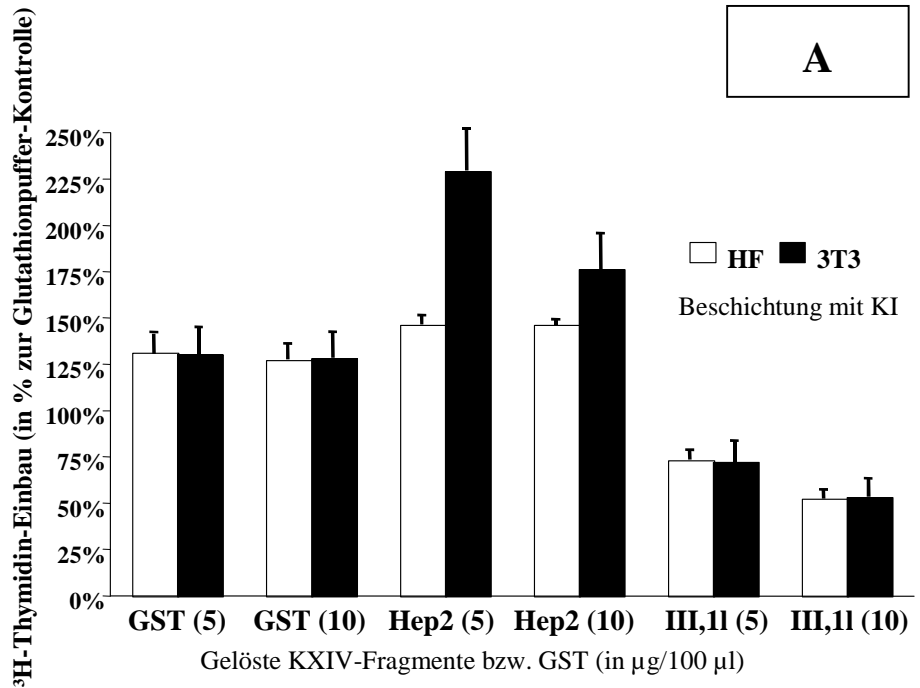


Abb. 11
[³H]-Thymidin-Einbau in HF und 3T3-Zellen nach Zugabe von gelösten Kollagen XIV-Fragmenten.

HF und 3T3-Zellen wurden auf immobilisiertem Kollagen I (A) und Kollagen XIV (B) (1 µg/100 µl/Loch) ausgesät und mit den angegebenen gelösten Fusionspeptiden von Kollagen XIV (5 oder 10 µg) insgesamt 24 Stunden inkubiert, über die letzten 4 Stunden zusammen mit [³H]-Thymidin und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Die Werte sind in Relation zur Glutathionpuffer-Kontrolle (enthält kein Fusionsprotein) dargestellt. MW und SA von 6-fach Werten eines von drei repräsentativen Experimenten.

Wie in Abb. 11 dargestellt, konnte das differenzierte Muster der Inhibition und zum Teil Stimulation auch durch gelöste rekombinante Kollagen XIV-Fragmente induziert werden. Dabei zeigte Hep2 erneut eine Stimulation und das rekombinante Fusionsprotein III,1 abhängig von der zugegebenen Menge, einen inhibitorischen Einfluss. 3T3-Zellen: Bei einer Konzentration von 5 µg Hemmung auf 72%, bei 10 µg auf 53%. Bei den Hautfibroblasten sind diese Effekte teilweise nicht ganz so deutlich ausgeprägt wie bei den 3T3-Zellen. Aber auch hier ist der inhibitorische Effekt konzentrationsabhängig zu beobachten. (HF: bei einer Konzentration von 5 µg auf 73%, bei 10 µg auf 64%).

Tendenziell führten die Fusionspeptide bei der Beschichtung mit Kollagen XIV zu einem ähnlichen Effekt wie bei der Beschichtung mit Kollagen I. Auch hier war bei den getesteten Zelllinien durch Hep2 eine Stimulation zu sehen (bis zu 150% bei 3T3). III,1 lang dagegen inhibierte wieder die DNS-Synthese der Zellen, bei 3T3-Zellen stärker (42% und 18%) als bei HF (75% und 81%).

Die parallel gemessene Zellzahl zeigte nur sehr geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungen (nicht dargestellt).

3.4 Adhäsion

Um Adhäsionsphänomene als Ursache der beobachteten inhibitorischen Effekte von Kollagen XIV und seinen rekombinanten Fragmenten auszuschließen, wurden Zelladhäsionsversuche mit Hautfibroblasten und 3T3-Zellen in Anlehnung an frühere Studien durchgeführt (20).

Im folgenden Diagramm ist die initiale Adhäsion in Prozent bezogen auf die Adhäsion auf Fibronectin (FN) aufgeführt.

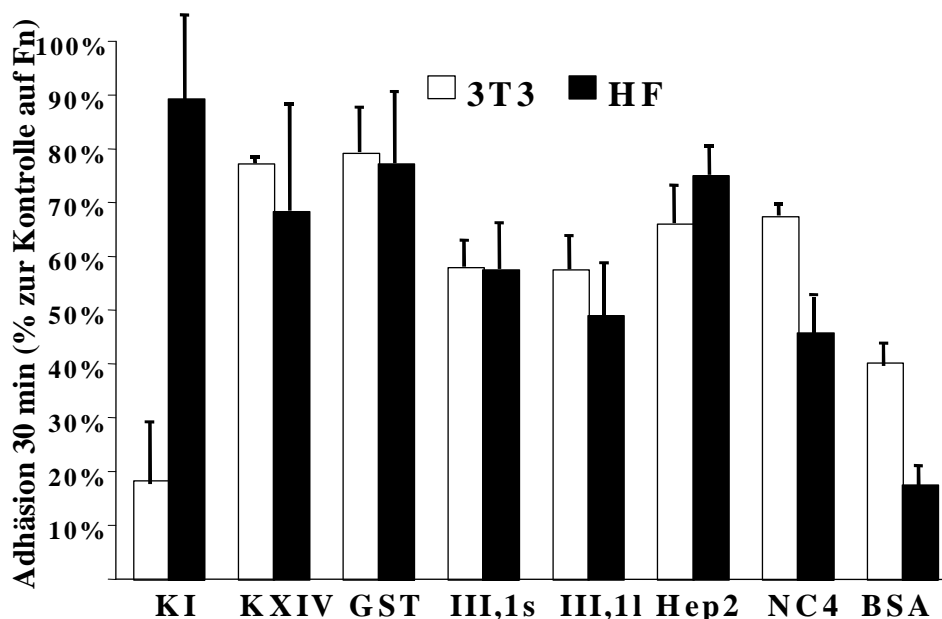


Abb. 12

Adhäsion von HF und 3T3-Zellen auf Kollagen I, XIV und rekombinanten Kollagen XIV-Fragmenten im Vergleich zu Fibronectin.

96-Loch-Platten wurden jeweils mit 1 µg/100 µl/Loch der dargestellten Proteine inkubiert, vorsichtig gewaschen und die verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen mit BSA blockiert. 10⁴ Zellen/Loch wurden ausgesät, nach 30 Minuten fixiert und die Zellzahl der adhärenierten Zellen mit SRB bestimmt. Als Referenzwert wurde Fibronectin (= 100 %) benutzt.

Es wird deutlich, dass die Zellen auch schon nach der kurzen Zeit gut auf dem kompletten Kollagen XIV-Molekül adhärenieren (68% bis 77% je nach Zelllinie). Etwas schlechter ist dagegen die Adhäsion auf den kleinen Fusionsproteinen III,1 lang und III,1kurz. In den Vertiefungen der Zellkulturplatte, die nur mit BSA beschichtet waren, konnten die Zellen (HF) erwartungsgemäß schlecht adhärenieren.

3.5 Reaktivierungsversuch mit Hautfibroblasten

Zur Klärung der Frage, ob die Wachstumsinhibition durch Kollagen XIV darauf beruht, dass die Zellen quieszent werden oder ob Kollagen XIV toxisch wirkt und Apoptose auslöst, wurden „Reaktivierungsversuche“ durchgeführt.

Es wurde getestet, ob die Zellen, nachdem sie dem Einfluss von Kollagen XIV ausgesetzt worden waren, wieder zur Teilung angeregt werden können.

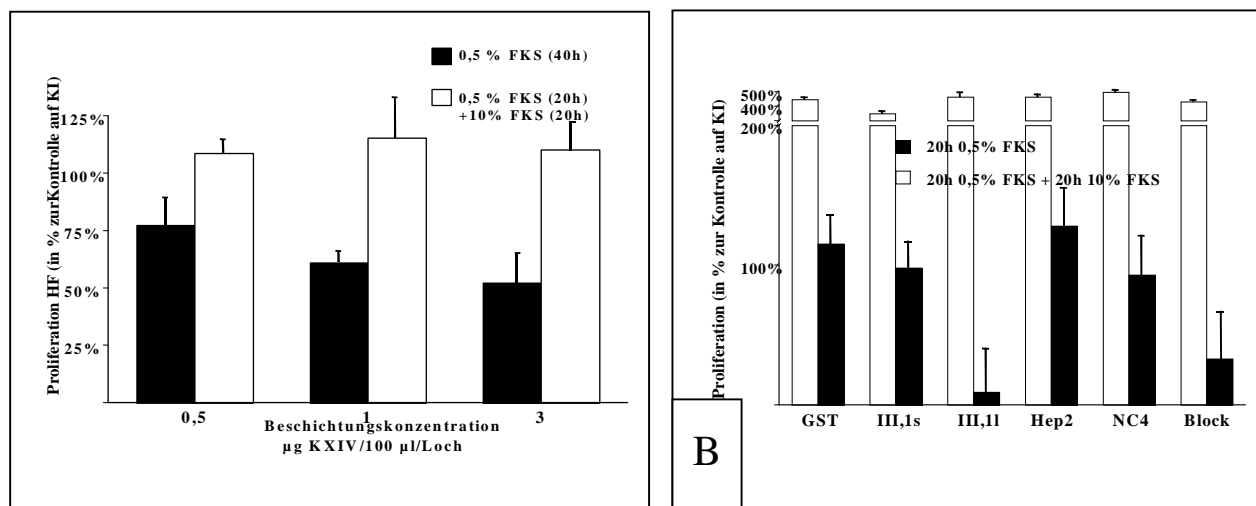


Abb. 13
Reaktivierungsversuch der Zellen auf Kollagen XIV und rekombinanten Kollagen XIV-Fragmenten.

96-Loch-Platten wurden A) mit 0,5, 1 und 3 µg Kollagen XIV bzw. Kollagen I/100 µl/Vertiefung oder B) mit 1 µg rekombinante Kollagen XIV-Fragmente und GST/100 µl/Vertiefung beschichtet. Es folgte die Aussaat von 10^4 HF/Vertiefung. Die HF wurden für 20 h in 0,5 % FKS inkubiert, dann entweder über weitere 20 h mit 0,5 % FKS (dunkle Balken) oder mit 10 % FKS (helle Balken) inkubiert. Die letzten 8 Stunden erfolgte ein $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau in beiden Gruppen. Die Werte sind relativ zur Proliferation auf Kollagen I dargestellt. MW und SA von 6fach-Werten eines repräsentativen Versuchs von insgesamt 6 Versuchen.

Wie in

Abb. 13A zu sehen ist, konnte durch die Nähstoffzugabe der zuvor quieszenten Zellen eine erneute Proliferation erreicht werden. Bei allen drei Konzentrationen wurden ähnliche Werte erreicht, die leichten Schwankungen waren nie signifikant. Die Kontrollgruppe mit reduzierter FKS-Konzentration zeigte dagegen die schon oben gezeigte, konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition auf Kollagen XIV.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kollagen XIV keinen toxischen sondern einen Quieszenz-induzierenden Effekt auf Zellen hat und dieser durch zusätzliches FKS wieder partiell aufhebbar ist.

In gleicher Weise wurde auch eine Reaktivierung der Zellen auf den Kollagen XIV-Fragmenten untersucht (Abb. 13B). Die Kontrolle war auch hier das Zellwachstum auf Kollagen I.

Dieser Versuch bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse für das Gesamtkollagen XIV. Auch hier stieg die Zellproliferation nach FKS-Gabe auf allen Beschichtungen an.

Analog zum Versuch Abb. 10 wurde die Zellzahl nach Reaktivierung mit 10% FKS bestimmt.

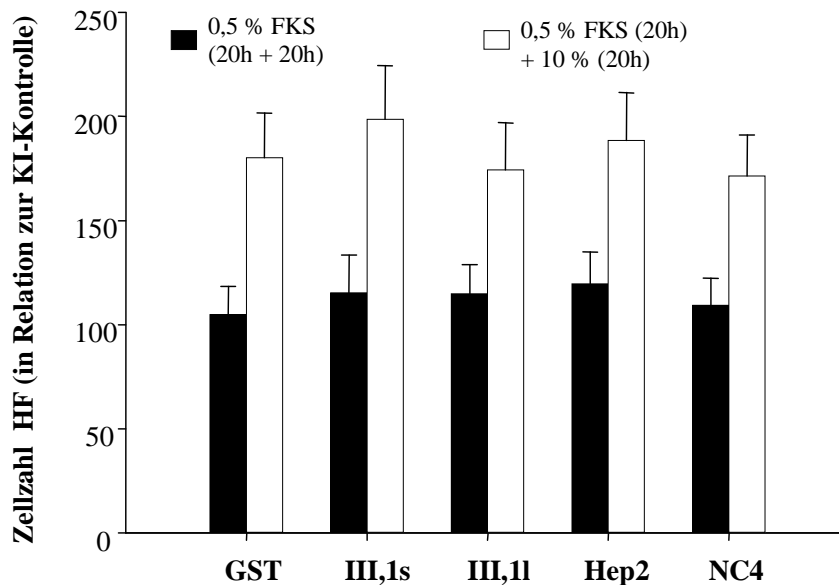


Abb. 14

Bestimmung der Zellzahl nach Kollagen XIV-Fragmenten induzierter Quieszenz und Reaktivierung mit FKS.

Nach Inkubation mit 0,5 % FKS für 20 Stunden wurde entweder weitere 20 h mit 0,5 % FKS (schwarzen Balken) oder mit 10 % FKS (weißen Balken) inkubiert. 10^4 HF/Vertiefung wurden auf mit Kollagen XIV-Fragmenten und GST (1 μ g/100 μ l/Vertiefung) beschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Analog zur Proliferationsbestimmung mit [3 H]-Thymidin erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Sulforhodamin B.

Die Zellzahl mit reduzierter FKS-Konzentration variierte gering um die 100%, während die Zellzahl durch die FKS-Zugabe deutlich anstieg: Sie erreichte Werte zwischen 174% auf dem Peptid III1l und 188% auf Hep2 bzw. 198% auf III1s. Allerdings sind die Unterschiede, wie auch in den oben gezeigten Zellzahlbestimmungen, nicht signifikant.

Die hier gezeigten Versuche sprechen dafür, dass Kollagen XIV die Zellen in einen ruhenden Zustand versetzt, aus dem sie sich reaktivieren lassen.

Um den Einfluss von Kollagen XIV auf die Apoptose zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (siehe 2.2.8).

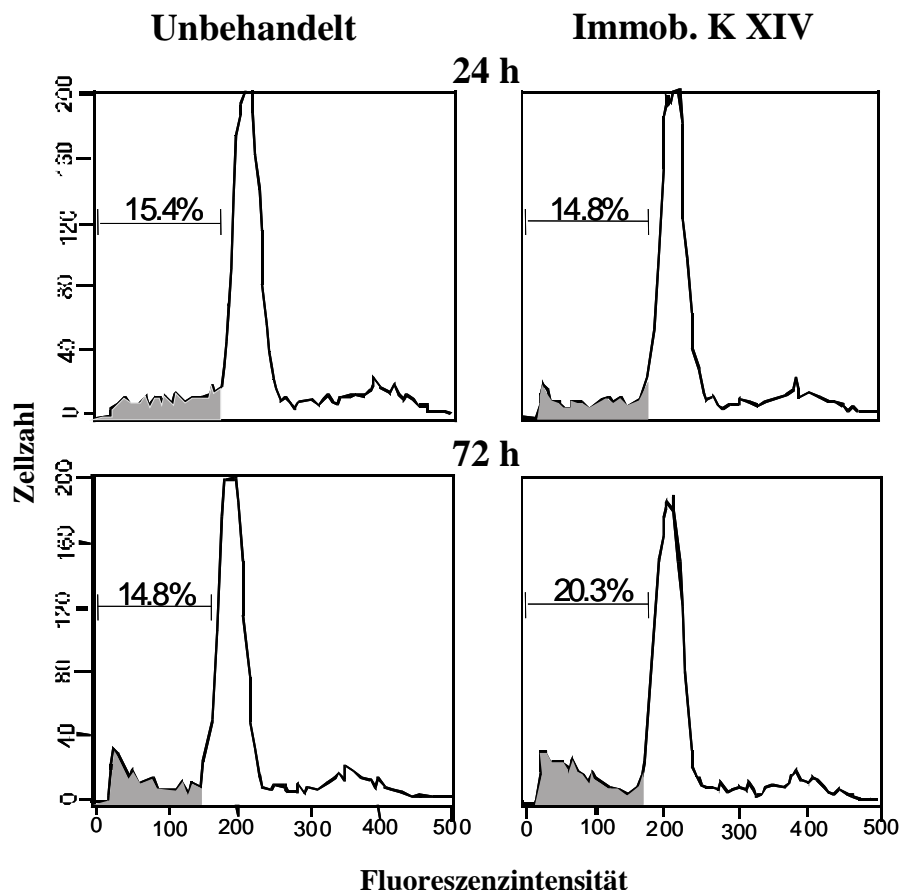


Abb. 15

Bestimmung der Apoptoserate von 3T3-Zellen mit/ohne KXIV mittels FACS-Analyse.

Die Abbildungen zeigen die Fluoreszenzmuster, die sich bei der FACS-Analyse der 3T3-Zellen ergeben. Der Vergleich zwischen den unbehandelten und den auf Kollagen XIV-wachsenden Zellen lässt keinen signifikanten Unterschied in der Menge der apoptotischen Zellen erkennen. Lediglich die längere Wachstumsdauer bei 0,5 % FKS führte zu einer etwas höheren Anzahl apoptotischer Zellen unabhängig von der Kollagenbeschichtung.

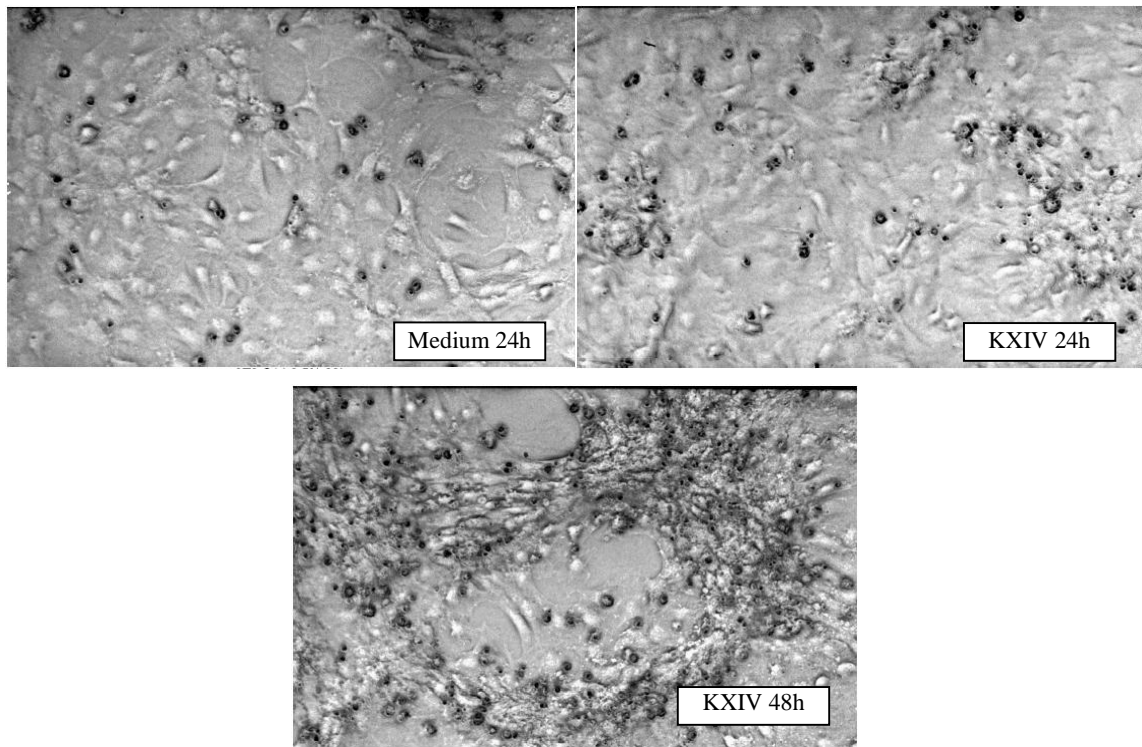
3.6 Kollagen XIV verändert das Wachstumsmuster von 3T3-Zellen

Wie unter 2.2.5 beschrieben, waren 3T3-Zellen auf Mikrotiterplatten, die mit verschiedenen Proteinen beschichtet waren, ausgesät und nach 24 bzw. 48 Stunden mit Sulforhodamin B angefärbt und fotodokumentiert worden (siehe 2.2.9).

Die Auswertung des Zellwachstums zeigte Unterschiede zwischen Zellen, die auf Kollagen XIV und solchen, die auf Kollagen I, Kollagen VI oder auf BSA gewachsen waren.

Während sich nach 24 stündigem Wachstum auf Kollagen XIV nur geringfügige Unterschiede im Wachstumsmuster zur Kontrolle auf Plastik fanden, traten nach zwei Tagen deutliche Veränderungen ein, die nur bei Wachstum auf Kollagen XIV nachweisbar waren (Abb. 16A). Die Zellen lagerten sich vermehrt zu Verbänden zusammen, bildeten Stränge und Rindstrukturen, die als morphologisches Korrelat der durch Kollagen XIV-induzierten Differenzierung angesehen werden könnten (65). Diese Veränderung im Wachstumsmuster waren auf Kollagen I oder Kollagen VI nicht nachweisbar (Abb. 16B).

A



B

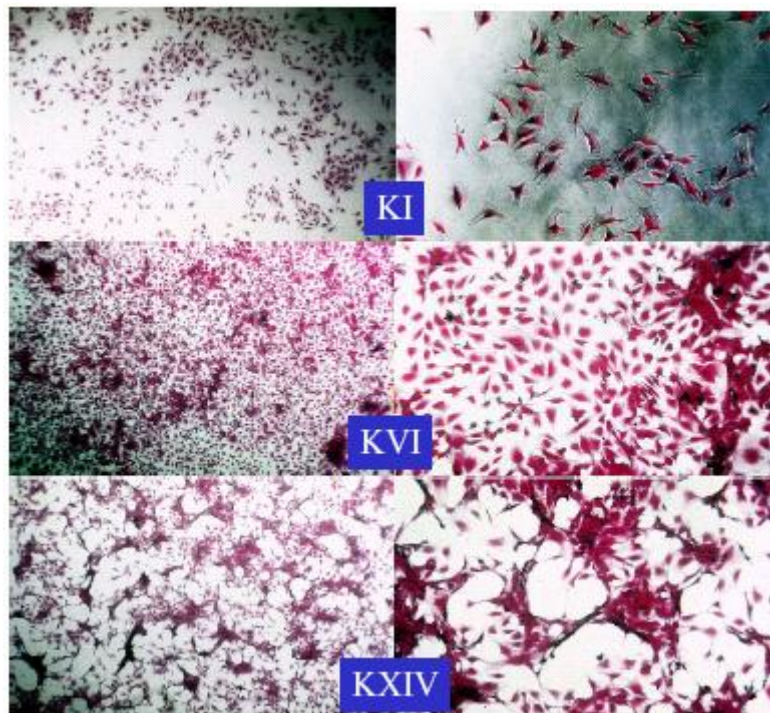


Abb. 16

Einfluss von Kollagen XIV auf das Wachstumsmuster von 3T3-Zellen.

A: Auf der Beschichtung mit Kollagen XIV wiesen die 3T3-Zellen eine stark veränderte Morphologie auf. Schon nach 24 Stunden zeigte sich hier eine Zellaggregatbildung. Die zusammengelagerten Zellen formten im Verband Ringstrukturen. (Phasenkontrastmikroskopie) B: Auf Kollagen I stellten sich die 3T3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation vereinzelt und in ihrer typischen Form mit kleinen Zellausläufern dar. Nach 24-stündiger Inkubation auf Kollagen VI, einem Kollagen mit mitogenen und fibrogenen Eigenschaften (1), hatten sich die Zellen erwartungs-

gemäß stärker vermehrt (66) und lagern sich dadurch dichter beieinander. Die Morphologie schien sich sichtbar nicht verändert zu haben. (40fache Vergrößerung).

3.7 Transformation von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten durch eine Exposition mit Kollagen XIV

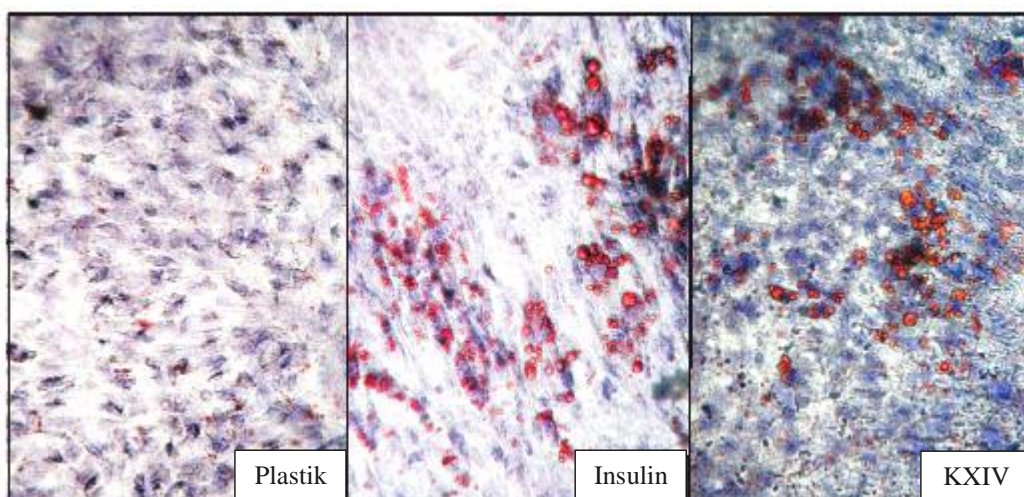


Abb. 17
Transformation von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten durch eine Exposition mit Kollagen XIV.

Die Fotos zeigen 3T3-L1-Zellen, die durch 9-tägiges Wachstum auf Kollagen XIV Fetttropfchen ausgebildet hatten. Diese Veränderung gleicht der Positivkontrolle, bei der die Zellen mit einem Hormoncocktail aus Insulin, Dexamethason und Methylxanthin behandelt wurden, um eine Transformation in Adipozyten zu induzieren (62, 63). Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Zusatz auf Plastik. Alle Zellen wurden nach 9 Tagen fixiert und die Fetttropfchen mit ‚Oil Red O‘ gefärbt (2.2.10).

Die Fotos zeigen die Transformation der 3T3-L1 Zellen in Adipozyten sowohl in der Positivkontrolle als auch durch alleinige Behandlung mit KXIV. Obwohl eine Quantifizierung schwierig ist, scheint Kollagen XIV eine ähnlich starke Differenzierungsinduktion auszulösen wie der Hormoncocktail.