

Abstract

Epithelial–mesenchymal interactions are important for tissue and organ development during embryogenesis, and also for various physiological and pathological processes, such as wound healing, mammary gland development and tumor progression. Mechanical properties of the extracellular matrix (ECM) have a direct impact on tissue remodeling, and the ECM acts as a mechanical mediator for epithelial-mesenchymal interactions.

GTP-binding proteins of the Rho family (RhoA, Cdc42 and Rac1) regulate the mechanical properties of cells by controlling the organization and turnover of the cytoskeleton and integrin-mediated cell-matrix adhesions. Important functions of integrin-mediated cell-matrix adhesions are to translate “outside-in” and “inside-out” signals to control cell survival, differentiation and expression of specific genes, and to allow the transmission of forces required for cell movement and adhesion to the ECM, as well as for the secretion of ECM proteins and their assembly into biological scaffolds.

To study the role of fibroblast’s Rho GTPases in the initiation of basement membrane assembly at the epithelial-mesenchymal interface, we used simple co-cultures, in which epithelial cells (HaCaT) are co-cultivated with stable cell lines of human fibroblasts (Wi26/SV-40) expressing constitutively active forms of RhoA, Cdc42, Rac1, and with normal human skin fibroblasts (NH3T) with transiently down-regulated Cdc42, RhoA and Rac1 by RNA interference. This model allows us to study the early steps of ECM assembly under conditions recapitulating the interactions between epithelial and mesenchymal cells as it is required in vivo.

We found that in the co-cultures of HaCaT cells and fibroblasts with constitutive expression of active Rho GTPases, expansion of epithelial colonies is slower than in control co-cultures, the smallest expansion being observed in the co-culture of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active RhoA.

Immunofluorescence analysis indicated that reduced colony expansion was associated with altered deposition of fibronectin and laminin 332 at the epithelial/fibroblast borders. In addition, in the co-cultures of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active Cdc42, RhoA and Rac1, more fibronectin was deposited compared to control co-cultures. Modifications in laminin 332 depended on the co-cultures. In co-culture of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active Rac1, the expression of laminin 332 was increased, while it was decreased in co-culture of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active Cdc42. In the co-culture of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active RhoA, the processing of laminin γ 2 chain was decreased.

Finally, each constitutively active Rho GTPase in fibroblasts had a specific impact on the expression of growth factors and cytokines. In particular, TIMP-2 expression was up-

regulated in the co-cultures of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active RhoA, and it was associated with a specific decrease in the activation of MMP-2. This was of particular interest, because TIMP-2 is an inhibitor of MMP, MMP-2 has the property to cleave the laminin γ 2 chain and, indeed, the processing of laminin γ 2 chain was decreased in the co-cultures of HaCaT cells with fibroblasts expressing constitutively active RhoA. Together, these results strongly suggest that, in this type of co-culture, TIMP-2 causes the decreased laminin γ 2 chain processing via inhibiting MMP-2 activity.

In conclusion, our results indicate that mechanical alterations mediated by Rho GTPases play an important role in ECM assembly at the epithelial-mesenchymal interface. Via reorganization of the cytoskeleton and cell surface receptors by Rho GTPases, fibroblasts can apply traction forces to the ECM and hence modulate its mechanical tension. Fibroblasts and epithelial cells, in turn, respond to the alterations in the ECM mechanical tension with changes in morphology, and in the expression of ECM proteins and cytokines. In particular, locking RhoA in a constitutively active conformation in fibroblasts, induces insufficient processing of laminin γ 2 chain, likely via up-regulation of TIMP-2 and inhibition of MMP-2, associated with a reduced expansion of epithelial cell islands.

ZUSAMMENFASSUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Während der Embryonalentwicklung sind epithelial-mesenchymale Interaktionen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der verschiedenen Gewebe und Organe. Außerdem spielen diese Interaktionen eine Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen wie z.B. der Entwicklung der Milchdrüsen, der Wundheilung oder der Tumorentwicklung. Die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix haben einen direkten Einfluß auf die Umgestaltung von Geweben und fungieren als Vermittler für epithelial-mesenchymale Interaktionen.

Die GTP bindenden Proteine der Rho-Familie (RhoA, Cdc42, Rac1) regulieren die mechanischen Eigenschaften der Zellen durch Kontrolle der Organisation und des Umsatzes der Integrin- und Zytoskelett-vermittelten Zell-Matrix Adhäsion. Eine wichtige Funktion der durch Integrine vermittelten Zell-Matrix Adhäsion ist die Übertragung von "outside-in"- und "inside-out"- Signalen zur Kontrolle des Überlebens der Zelle und ihrer Differenzierung, der Expression spezifischer Gene sowie der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen und deren Assemblierung in biologische Netzwerke. Außerdem übermitteln sie die Kräfte, welche für die Zellbewegung und die Adhäsion an der extrazellulären Matrix benötigt werden.

Um die Funktion der Rho-GTPasen in Fibroblasten für die Bildung der Basalmembran an der epithelial-mesenchymalen Kontaktfläche zu untersuchen, wurden Co-Kulturen verwendet. Epitheliale Zellen (HaCaT) wurden sowohl mit stabilen Zelllinien menschlicher Fibroblasten (Wi26/SV-40), die konstitutiv aktive Formen von RhoA, Cdc42 und Rac1 exprimieren, als auch mit normalen menschlichen dermalen Fibroblasten, bei denen Cdc42, RhoA und Rac1 transient durch RNAi herunter reguliert wurde, co-kultiviert. Dieser Aufbau ermöglicht die Untersuchung der frühen Ereignisse in der Entwicklung der extrazellulären Matrix unter solchen Bedingungen, die für eine in vivo Analyse der Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen benötigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Co-Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktive Rho GTPasen exprimieren, die Expansion der epithelialen Zellkolonien im Vergleich zu Kontrollkulturen verlangsamt war. Die

geringste Expansion wurde dabei in Co-Kulturen beobachtet, in denen die Fibroblasten konstitutiv aktives RhoA exprimierten.

Aus der Untersuchung dieser Co-Kulturen mittels Immunofluoreszenz ging hervor, dass die reduzierte Expansion mit einer veränderten Ablagerung von Fibronectin und Laminin 332 an den Kontaktfläche zwischen epithelialen Zellen und Fibroblasten verbunden ist. Ausserdem zeigte sich in Co-Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktives Cdc42, RhoA und Rac1 exprimieren, auch eine verstärkte Ablagerung von Fibronectin im Vergleich zu Kontrollkulturen. Veränderungen der Expression von Laminin 332 zeigten sich in Abhängigkeit von den jeweiligen Co-Kulturen. So war in Co-Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktives Rac1 exprimieren, die Expression von Laminin 332 erhöht, während diese in Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktives Cdc42 exprimieren, verringert war. In den Co-Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktives RhoA exprimieren, konnte eine reduzierte Prozessierung der Laminin γ 2-Kette festgestellt werden.

Jede der in Fibroblasten exprimierten, konstitutiv aktiven Rho GTPasen hatte einen spezifischen Effekt auf die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. In Co-Kulturen von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die konstitutiv aktives RhoA exprimieren, war die TIMP-2 Expression erhöht und die Aktivität von MMP-2 verringert. Dies ist von Bedeutung, da TIMP-2 als Inhibitor von MMPs fungiert und MMP-2 für die Prozessierung der Laminin γ 2-Kette benötigt wird. In den Co-Kulturen, in denen konstitutiv aktives RhoA exprimiert wurde, war die Prozessierung der Laminin γ 2-Kette tatsächlich verringert. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass in diesen Co-Kulturen TIMP-2 durch die Inhibition von MMP-2 eine verringerte Prozessierung der Laminin γ 2-Kette verursacht.

Unsere Resultate zeigen, dass die Regulierung der mechanischen Eigenschaften durch Rho GTPasen eine wichtige Rolle für die Bildung der extrazellulären Matrix an der epithelial-mesenchymalen Kontaktfläche spielt. Die Reorganisation des Zytoskeletts und der Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Rho GTPasen führt zu einer Übertragung von Spannungs Kräften von den Fibroblasten auf die extrazelluläre Matrix und somit zu einer Modulierung der mechanischen Spannung in der extrazellulären Matrix. Ebenso reagieren Fibroblasten und epitheliale Zellen auf Veränderungen der mechanischen Spannung der extrazellulären Matrix durch morphologische Veränderungen und die Expression von extrazellulären

Matrixproteinen und Zytokinen. Besonders die konstitutive Aktivierung von RhoA in Fibroblasten führt zu einer reduzierten Prozessierung der Laminin γ 2-Kette, vermutlich durch Hochregulation von TIMP-2 und Inhibition von MMP-2, in Verbindung mit einer verringerten Expansion epithelialer Zellkolonien.