

Abstract

The extracellular matrix (ECM) not only provides a scaffold for cells of multicellular organisms, but also participates in mechanical and biochemical signaling events. This enables cells to sense and respond to changes in their environment by remodeling of the ECM, hence allowing the maintenance and reestablishment of tissue homeostasis upon challenge. Abnormal macromolecular arrangement of the ECM can cause changes in tissue stiffness, ranging in skin from hyperflexibility to fibrosis and can induce severe functional impairment.

This study concentrated on the biological significance of collagen XII in modulating ECM structure and influence on cells. Collagen XII is a fibril associated collagen with interrupted triple helices (FACIT) that associates with large collagen I/III/V fibrils in the skin and also with several other ECM components. Thereby, collagen XII contributes to collagen fibril network arrangement. Deficiency of collagen XII in patients induces an Ehlers-Danlos syndrome like hyperflexible skin, while its overabundance is seen in stiffened fibrotic lesions. This study addressed the question, how collagen XII is mechanistically involved in these outcomes. Using mice either genetically deficient in collagen XII or with a fibroblast-restricted overexpression of collagen XII, it was specifically investigated *i)* if collagen XII regulates the ultrastructure and mechanical properties, such as flexibility or stiffness of ECM in skin; *ii)* if its presence in the ECM network influences growth factor availability, using TGF β as example; and *iii)* which receptors mediate cell-collagen XII contacts.

Results showed that collagen XII modulates the ultrastructure of the collagen network in the dermis with only mild effects on mechanical properties of the skin. Overexpression did not induce spontaneous skin fibrosis, nor did deficiency attenuate the fibrotic response upon bleomycin administration. By contrast, collagen XII levels significantly impacted the transient fibrogenic response in the formation of granulation tissue upon skin wounding. Both, lack as well as overexpression of collagen XII, resulted in a delayed healing process, but the underlying mechanism differed completely: Wounds without collagen XII contracted at reduced rates despite increased myofibroblast counts and TGF β signaling, attributed to abnormal overall ECM structure. On the other hand, wounds with abnormally high collagen XII deposition healed at delayed rates because they were stalled in an early inflammatory stage characterized by the prolonged presence of high numbers of early M1-like macrophages. This was due to preferential binding of this subpopulation to collagen XII, possibly engaging α 4 β 1 integrins. Collagen-binding integrins did not crucially contribute to cell-collagen XII interaction.

Together, collagen XII is a versatile component of the ECM that participates in maintenance and reestablishment of skin homeostasis by modulation of tissue structure and cellularity.

Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (EZM) stellt nicht nur ein stabilisierendes Gerüst dar, in das Zellen mehrzelliger Organismen eingebettet sind, sondern reguliert auch die Übertragung mechanischer und biochemischer Signale. Dies ermöglicht es Zellen ihre Umgebung wahrzunehmen und auf Änderungen dynamisch zu reagieren. Die EZM kann umgebaut und insbesondere strukturell verändert werden, um die Gewebshomöostase zu erhalten. Fehler in der Zusammensetzung und der makromolekularen Anordnung der EZM können zu funktionellen Einschränkungen führen, in der Haut z. B. zu pathologischer Dehnbarkeit oder zu fibrotischen Reaktionen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Bedeutung von Kollagen XII für die supramolekulare Anordnung der EZM der Haut und den Einfluss auf zelluläre Funktionen herauszuarbeiten. Kollagen XII ist ein Fibrillen-assoziiertes Kollagen mit unterbrochener Tripelhelix, das sowohl mit großen Kollagenfibrillen des Typs I, III und V als auch mit anderen EZM-Komponenten in der Haut interagiert. Hierdurch trägt Kollagen XII zur Strukturierung des Kollagenfibrillennetzwerks bei. Im Menschen führt das Fehlen von Kollagen XII zu Ehlers-Danlos ähnlichen Symptomen wie Hyperflexibilität der Haut, während eine erhöhte Ablagerung von Kollagen XII in fibrotischen Läsionen beschrieben wurde. Hierdurch stellte sich die Frage, durch welche Mechanismen Kollagen XII funktionell zu diesen Prozessen beiträgt. Zur Beantwortung dieser Frage standen Mausmodelle zur Verfügung, in denen entweder kein Kollagen XII gebildet oder Kollagen XII spezifisch in Fibroblasten überexprimiert wurde. Spezifische Fragen waren, *i)* ob Kollagen XII die Ultrastruktur der Haut und damit ihre mechanischen Eigenschaften wie Festigkeit oder Hyperflexibilität beeinflusst, *ii)* ob die Anwesenheit von Kollagen XII im extrazellulären Raum die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, hier exemplarisch TGF β , verändert und *iii)* welche Rezeptoren die Wechselwirkung von Zellen mit Kollagen XII vermitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen XII die makromolekulare Organisation der Kollagene in der Haut reguliert. Überraschenderweise jedoch führte weder das Fehlen noch die Überexpression von Kollagen XII zu wesentlichen Änderungen der mechanischen Eigenschaften. Die Überexpression von Kollagen XII verursachte keine spontane, fibrotische Reaktion, und das Fehlen von Kollagen XII verhinderte in einem experimentellen Modell nicht die Bildung fibrotischer Läsionen. Allerdings beeinflussten veränderte Mengen an Kollagen XII die Fibrogenese bei der Ausbildung des Granulationsgewebes nach mechanischer Verwundung. Sowohl das Fehlen als auch ein Überangebot an Kollagen XII führten zu einer verzögerten Wundheilung. Hierfür waren allerdings unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. Wunden

ohne Kollagen XII kontrahierten schlechter als Kontrollwunden, obwohl signifikant mehr Myofibroblasten gebildet und erhöhte TGF β Signale detektiert wurden. Wahrscheinlich ist dieses durch strukturelle Veränderungen der EZM bedingt. Im Gegensatz dazu führte ein Überangebot an Kollagen XII zum Verharren der Wunden in einem frühen Entzündungsstadium und somit zu einer verzögerten Heilung. Verantwortlich ist hierfür eine signifikant erhöhte Anzahl an frühen, M1-artigen Makrophagen, die wesentlich länger im Wundgewebe verbleiben, weil sie, im Gegensatz zu den späteren, M2-ähnlichen Makrophagen, an Kollagen XII zu binden vermögen. Diese Untersuchungen konnten auch zeigen, dass kollagenbindende Integrine keine Rolle spielen. Wahrscheinlich wird die Bindung durch Integrin $\alpha 4\beta 1$ vermittelt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Kollagen XII eine wichtige Komponente der EZM ist, die maßgeblich die Ultrastruktur der EZM der Haut sowie die zelluläre Zusammensetzung reguliert und somit direkt und indirekt die Erhaltung und Wiederherstellung der Homöostase der Haut beeinflusst.