

Einfluss mechanischer Kräfte auf die Genexpression humaner dermaler Fibroblasten

Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Axel Seher

aus Köln

2004

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dr. Wilhelm Stoffel
Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung:

11.02.2005

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Allgemeiner Aufbau der Haut.....	1
1.1.1 Epidermis.....	1
1.1.2 Dermis.....	1
1.1.3 Subkutis.....	2
1.2 Bindegewebe und extrazelluläre Matrix.....	3
1.3 Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix.....	4
1.3.1 Integrine.....	4
1.3.2 Discoidin-Domain-Rezeptoren.....	5
1.3.3 Proteoglykane und Glykosaminglykane.....	5
1.3.4 Fokalkontakte.....	5
1.4 Auswirkungen von mechanischen Kräften auf die Zelle.....	6
1.5 Mechanotransduktion.....	6
1.5.1 Outside/Inside Signaling.....	6
1.5.1.1 Integrine.....	7
1.5.1.2 SAC.....	7
1.5.1.3 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.....	7
1.5.1.4 ROS.....	7
1.5.2 Intrazelluläre Weiterleitung.....	8
1.5.2.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen.....	8
1.5.2.2 NF-kappaB.....	8
1.5.2.3 Protein Kinase C.....	9
1.5.3 Inside/Outside Signaling.....	9
1.6 Fibroblasten und mechanische Kräfte.....	9
1.6.1 Wundheilung.....	9
1.6.2 Fibrose.....	10
1.7 Modelle zur Erläuterung der Mechanotransduktion.....	10
1.7.1 Fluid Drop Modell.....	10
1.7.2 Tensegrity Modell.....	11
1.8 Zellkultursysteme zur Analyse mechanischer Kräfte.....	11
1.9 Zielsetzung.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Zellkultur.....	15
2.1.3 Verwendete Lösungen.....	15
2.1.4 Molekulargewichtsstandards.....	16
2.1.5 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Zellkultur.....	17
2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur.....	17
2.2.1.2 Mykoplasmentest.....	17
2.2.1.3 Herstellung beschichteter Bakterienchalen für Kollagengele.....	18
2.2.1.4 Herstellung der Kollagengele Free und Bound Lattice.....	18
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.2.1 RNA-Aufreinigung aus Kollagengelen.....	19
2.2.2.2 mRNA-Isolation mit Qiagen RNeasy Oligotex mRNA Kit.....	19
2.2.2.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung im Photometer.....	19
2.2.2.4 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	19
2.2.2.5 PC8-Extraktion.....	20
2.2.2.6 cDNA-Synthese.....	20
2.2.2.7 Auftrennung von RNA und DNA durch Gelelektrophorese.....	20
2.2.2.7.1 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.2.7.2 RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.2.7.3 DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	20
2.2.2.8 Northernblot.....	21

2.2.2.8.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	21
2.2.2.8.2	Hybridisierung des Filters mit radioaktiv markierter Sonde.....	22
2.2.3	Serielle Analyse der Genexpression (SAGE).....	23
2.2.3.1	Vorversuche zur SAGE.....	23
2.2.3.2	mRNA-Präparation.....	23
2.2.3.3	cDNA-Synthese.....	23
2.2.3.4	Restriktion mit dem Anchoring Enzyme (AE).....	24
2.2.3.5	Linker-Ligation an geschnittener cDNA.....	24
2.2.3.6	Restriktion der cDNA mit Tagging Enzyme (TE).....	25
2.2.3.7	Bildung der DiTags.....	25
2.2.3.8	PCR-Amplifikation der DiTags.....	25
2.2.3.9	Isolation der DiTags.....	26
2.2.3.10	Restriktion mit NlaIII.....	26
2.2.3.11	Aufreinigung der verdauten DiTags.....	27
2.2.3.12	Konkatemerisierung.....	27
2.2.3.13	Ligation der Konkatemere in pZero-Vektor und Transformation durch Elektroporation.....	28
2.2.3.14	Amplifikation der Konkatemere durch Colony PCR.....	28
2.2.3.15	Statistische und bioinformatische Analyse.....	29
2.2.4	DNA-Sequenzierung (modifiziert nach Sanger <i>et al.</i> , 1965).....	29
2.2.5	PIQOR™ cDNA-Array.....	30
2.2.5.1	Allgemeines Protokoll des PIQOR™.....	30
2.2.5.2	cDNA-Synthese.....	30
2.2.5.3	mRNA Amplifikation (T7 in vitro Transkription).....	31
2.2.5.4	Markieren der Proben mit Fluoreszenzfarbstoff.....	31
2.2.5.5	Inkubation der Proben in der PIQOR™-HybChamb.....	32
2.2.5.6	Hybridisierung.....	32
2.2.5.7	Waschen der Arrays.....	32
2.2.5.8	Statistische und bioinformatische Auswertung.....	32
2.2.6	Semiquantitative PCR.....	33
2.2.6.1	Allgemeines Protokoll.....	33
2.2.6.2	Auswertung der Messdaten.....	34

3 ERGEBNISSE.....36

3.1	Serielle Analyse der Genexpression (SAGE).....	39
3.1.1	Experimentelle Ergebnisse der SAGE.....	40
3.1.2	Allgemeine statistische Ergebnisse der SAGE.....	41
3.1.3	Expressionsprofil primärer Fibroblasten im Monolayer.....	43
3.1.4	Vergleich der Expressionsprofile der SAGE Free Lattice gegen Bound Lattice.....	45
3.1.5	Bioinformatische Analyse zur Identifikation potentieller Fibroblastenmarker.....	51
3.1.6	Vergleich Primärer Fibroblasten mit transfizierten und Vorhautfibroblasten.....	54
3.1.6.1	Transfizierte Fibroblasten.....	54
3.1.6.2	Vorhautfibroblasten.....	57
3.2	PIQOR™ cDNA-Array Skin 1.0.....	62
3.2.1	Konfiguration des PIQOR™ Skin 1.0.....	63
3.2.2	Allgemeine Statistik des PIQOR™ - detektierbare und differentiell exprimierte Gene.....	63
3.2.3	Differentiell exprimierte Transkripte in den Kollagensystemen BL und FL.....	65
3.2.3.1	Bound Lattice.....	66
3.2.3.1.1	Zu mehreren Zeitpunkten differentiell exprimierte Transkripte in BL.....	66
3.2.3.1.1.1	Ab 1 h differentiell in BL.....	66
3.2.3.1.1.2	Ab 4 h differentiell in BL.....	68
3.2.3.1.2	Zu einem Zeitpunkt differentiell exprimierte Transkripte in BL.....	70
3.2.3.1.2.1	Zu 1 h differentiell in BL.....	70
3.2.3.1.2.2	Zu 2 h differentiell in BL.....	72
3.2.3.1.2.3	Zu 4 h differentiell in BL.....	72
3.2.3.1.2.4	Zu 8 h differentiell in BL.....	74
3.2.3.2	Free Lattice.....	76
3.2.3.2.1	Zu mehreren Zeitpunkten differentiell exprimierte Transkripte in FL.....	76
3.2.3.2.2	Zu einem Zeitpunkt differentiell in FL.....	77
3.2.3.2.2.1	Zu 1 h differentiell in FL.....	77
3.2.3.2.2.2	Zu 4 h differentiell in FL.....	79
3.2.4	Validierung der PIQOR™-Analysen mittels semiquantitativer PCR.....	81

4 DISKUSSION.....	83
4.1 Einfluss mechanischer Kräfte im BL- und im FL-System.....	83
4.1.1 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell.....	83
4.1.1.1 Ab 1 h differentiell.....	83
4.1.1.2 Ab 4 h differentiell.....	84
4.1.2 Zu einem Zeitpunkt differentiell.....	85
4.1.2.1 Zum Zeitpunkt 1 h differentiell.....	85
4.1.2.2 Zum Zeitpunkt 2 h differentiell.....	86
4.1.2.3 Zum Zeitpunkt 4 h differentiell.....	86
4.1.2.4 Zum Zeitpunkt 8 h differentiell.....	87
4.1.3 Funktionsbereiche im BL- und im FL-System.....	89
4.2 Das Drei-Phasen-Modell.....	93
4.3 Vergleich der Ergebnisse SAGE, PIQOR™, Northernblot und Q-PCR.....	99
4.3.1 Ergebnisse der SAGE.....	99
4.3.2 Ergebnisse des PIQOR™ Skin 1.0.....	102
4.3.3 Validierung der Ergebnisse mittels Q-PCR und Northernblot.....	103
4.4 Analyse der Spendervariabilität.....	104
4.5 Expressionsprofile von kultivierten, transfizierten und Vorhautfibroblasten.....	109
4.6 Zusammenfassung der Diskussion.....	110
4.7 Zusammenfassung.....	113
5 REFERENZEN.....	114
6 APPENDIX	126
6.1 Verwendete SAGE-Datenbanken für Fibroblastenmarker-Analyse.....	126
6.1.1 Liste der SAGE-Datenbanken für die „Zelllinienanalyse“ (NCBI).....	126
6.1.2 Liste der SAGE-Datenbanken für „Gesamanalyse“ (NCBI).....	127
6.2 Datenbanken des Vergleichs Vorhaut-, transfizierte und Haurfibroblasten.....	130
6.2.1 SAGE-Datenbank „Vorhautfibroblasten“.....	130
6.2.2 SAGE-Datenbank „transfizierte Fibroblasten“.....	130
6.3 SAGE Expressionsprofil ML Top – 100.....	131
6.4 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0.....	133
6.4.1 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0 – Einzelspenderanalyse 1h.....	133
6.4.2 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0 – Einzelspenderanalyse 2h.....	134

7 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

8 BILDNACHWEIS

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

1 Einleitung

Alle bislang untersuchten Gewebe bzw. Organe und in Kultur gehaltenen Zellen zeigten eine Reaktion auf Gravitation und mechanische Kräfte (Ingber, 1991; Vandenburgh, 1992; Davies, 1995; Ingber, 1997; Chicurel *et al.*, 1998). Mechanosensitive Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten regulieren die Knochenheilung abhängig von der Art der Kompression (Nomura und Takano-Yamamoto, 2000). Glatte Muskeln in Blutgefäßen passen ihre biologische Aktivität an einen erhöhten Blutdruck an (O’Callaghan und Williams, 2000). Endothelzellen exprimieren bei laminarem Bluthochdruck atheroprotektive Genprodukte (Yoshizumi *et al.*, 2003). Auch Zellen des Bindegewebes reagieren auf mechanische Kräfte. So induziert mechanischer Stress in Fibroblasten die Expression extrazellulärer Matrixproteine und inhibiert gleichzeitig die Expression Matrix-abbauender Enzyme (Kessler *et al.*, 2001). Mechanischer Stress induziert weiterhin die Differenzierung eines „aktivierten Fibroblasten-Phänotyps“, der sich durch die Expression funktioneller Gengruppen, der Expression von *alpha smooth muscle actin* und der Ausbildung von Stressfasern äußert sowie phänotypisch Myofibroblasten gleicht (Kessler *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden die Einflüsse mechanischer Kräfte auf Zellen des Bindegewebes an primären Hautfibroblasten in Modellsystemen untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene dreidimensionale Kollagengel-Systeme genutzt, die sich in ihren mechanischen Eigenschaften unterscheiden. Das Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die zu frühen Zeitpunkten in den beiden Systemen differentiell exprimiert werden und an der Differenzierung des „aktivierten Phänotyps“ durch mechanischen Stress beteiligt sind.

1.1 Allgemeiner Aufbau der Haut

Die Haut des Menschen besteht aus drei Schichten, die untereinander in Verbindung stehen, voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen. Sie werden als Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) bezeichnet.

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist die oberste Schicht der Haut und setzt sich aus verschiedenen Schichten und Zelltypen zusammen, die als *Stratum corneum* (Hornschicht), *Stratum granulosum* (Körnerschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Keimschicht) bezeichnet werden. Die Keratinozyten machen den größten Teil der Zellen in der Haut aus. Sie werden in der Keimschicht gebildet und wandern allmählich nach außen. Dort bilden sie mit den abgestorbenen Epidermiszellen die äußere Oberfläche und den Fett- und Säuremantel. Neben den Keratinozyten befinden sich in der Haut noch Melanozyten (Pigmentzellen), Merkelzellen (Mechano-Rezeptoren), T-Lymphozyten und Langerhans-Zellen, die für das Immunsystem verantwortlich sind.

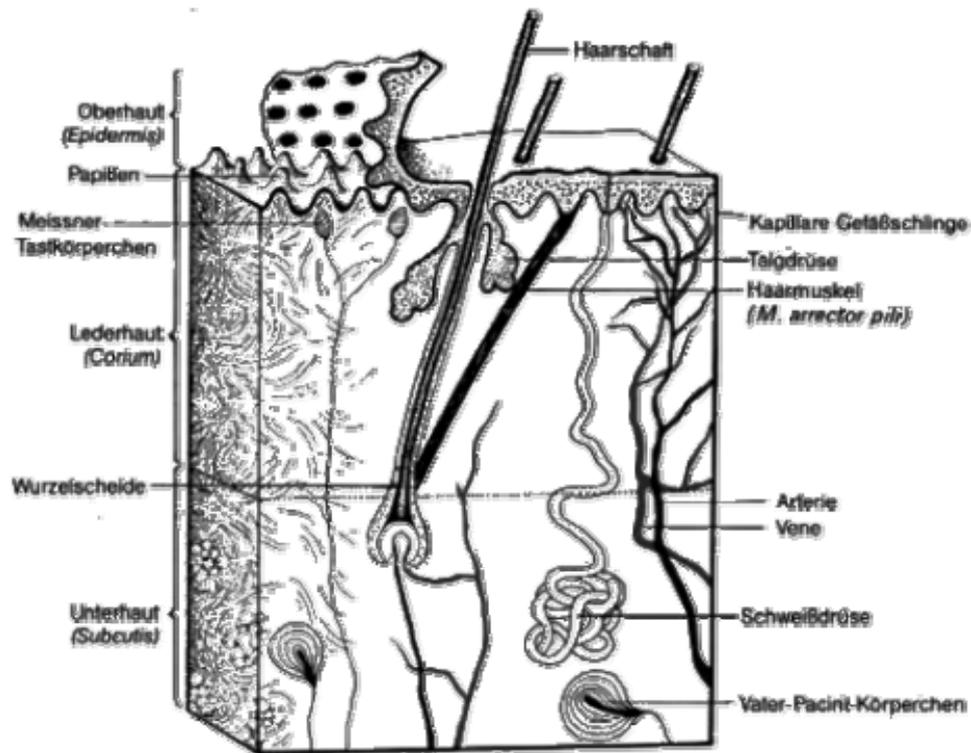


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Haut

1.1.2 Dermis

Die Dermis schließt sich direkt an die Basalmembran der Epidermis an und besteht aus zwei Schichten. Die obere Schicht ist die Papillenschicht (*Stratum papillare*) und besteht aus lockerem Bindegewebe, das sich zapfenartig in die Oberhaut einstülpt. Sie enthält Blutkapillaren und Nervenendorgane (Rezeptoren) sowie Abwehrzellen (Leukozyten, Plasmazellen, Mastzellen). Die untere Schicht ist die Netzsicht (*Stratum reticulare*), die mit festen Bindegewebsfasern durchzogen ist. Letztere bestehen aus Kollagen und Elastin. Zusätzlich befinden sich in der Netzsicht größere Nerven und Blutgefäße, Schweißdrüsen, Haarfollikel und glatte Muskelzellen. Die Dermis enthält auch wichtige Sinnesorgane für Druck-, Tast-, Vibrations-, Temperatur- und Schmerzempfindung.

1.1.3 Subkutis

Die Unterhaut (*Subcutis*) schließt sich direkt an die Netzsicht der Dermis an. In der Unterhaut sind die Haarwurzeln verankert. Außerdem finden sich hier Schweißdrüsen und Talgdrüsen sowie größere Lymph- und Blutgefäße. Durchzogen wird das Bindegewebe von Ausläufern der festen Fasern der Lederhaut. Diese Fasern sind mit den unter der Subkutis liegenden Körperfaszien verbunden. Die Unterhaut besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe.

1.2 Bindegewebe und extrazelluläre Matrix

Das Bindegewebe entwickelt sich aus dem Mesoderm und dient der Umhüllung und Unterteilung der Organe, deren Einbettung in die Umgebung sowie der Zuleitung von Nerven und Gefäßen. Die Bindegewebszellen sind in die extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet, die aus einer Reihe von Polysacchariden und Proteinen besteht. Diese Makromoleküle werden hauptsächlich von den in sie eingebetteten Zellen gebildet und abgebaut. In den meisten Bindegeweben übernehmen diese Funktion die Fibroblasten, im Knorpel sind es die Chondroblasten und im Knochen die Osteoblasten.

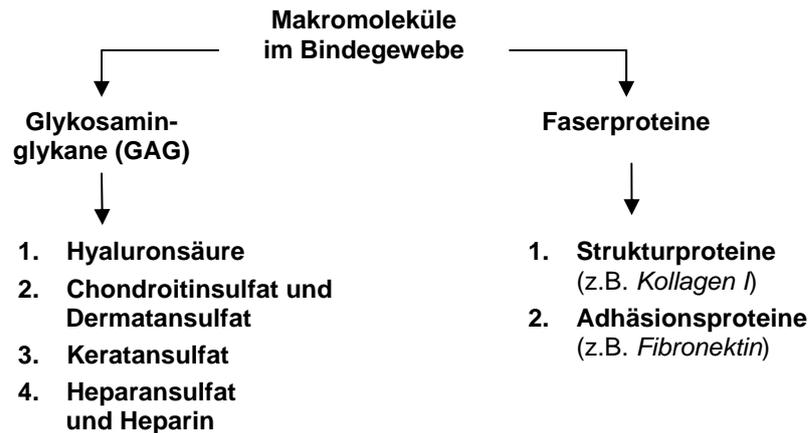


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Makromoleküle im Bindegewebe.

In Bindegeweben werden zwei Klassen von Makromolekülen unterschieden: Die Glykosaminglykane (GAG) und Faserproteine. Die GAG sind unverzweigte Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaut sind. Dabei ist einer der beiden Zuckerreste stets ein Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin). Insgesamt werden die GAG in vier Hauptgruppen aufgeteilt: (I.) Hyaluronsäure, (II.) Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat, (III.) Keratansulfat sowie (IV.) Heparansulfat und Heparin. Auf Grund der Struktur, ihrer geringen Flexibilität und der starken Hydrophilie, bedingt durch die hohe Dichte der negativen Ladungen der Sulfatgruppen, nehmen GAG eine lang gestreckte Form an, während osmotisch aktive Kationen große Mengen an Wassermolekülen anziehen. Deshalb bilden GAG selbst in geringen Konzentrationen Gele, die einen Quelldruck (Turgor) erzeugen und somit eine wesentliche Eigenschaft von Bindegeweben erzeugen – die Druckfestigkeit.

Bei den Faserproteinen, die in Struktur- und Adhäsionsproteine unterteilt werden, sind die *Kollagene* als Strukturproteine die herausragende Gruppe. Sie sind Hauptbestandteil von Haut und Knochen. Der allgemeine Aufbau eines Kollagens besteht aus einer linksgängigen Polypeptidkette (α -Helix), die aus sich wiederholenden Tripeptiden mit dem Sequenzmotiv Gly-X-Y besteht, wobei X in der Regel Prolin und Y häufig Hydroxyprolin ist. Jeweils drei dieser Helices lagern sich zu einer für Kollagene typischen Tripelhelix zusammen. Es gibt mindestens 32 verschiedene α -Helices, davon allein 17 in der Haut, die sich zu insgesamt 19 Kollagen-Typen zusammenlagern (Haralson und Hassell, 1995).

Kollagene werden nach ihrer Struktur in fibrilläre, fibrillenassoziierte und netzbildende Kollagene unterteilt. *Kollagen I* ist Hauptbestandteil von Haut und Knochen. Es bildet fibrilläre Strukturen, die in den extrazellulären Raum sezerniert werden und dort die größeren Fibrillen bilden. Aus diesen Fibrillen organisieren sich dann Bündel, die als Kollagenfasern bezeichnet werden (Aumailley und Krieg, 1994). Wechselwirkungen zwischen den Kollagenen untereinander und zu anderen Makromolekülen werden von den „*FACIT*“-Kollagenen („Fibril-associated collagens with interrupted triple helices“) vermittelt (Lethias *et al.*, 1994). Netzbildende Kollagene wie *Kollagen IV* lagern sich zu einem maschenförmigen Netzwerk zusammen, wie in der Basalmembran der Haut (Sundaramoorthy *et al.*, 2002). Eine wichtige Funktion der Kollagene ist es, die Zugfestigkeit des Bindegewebes zu gewährleisten.

Dehnbare Fasern verleihen dem Bindegewebe die Fähigkeit der Elastizität. *Elastin* ist Hauptbestandteil der elastischen Fasern, die einen großen Anteil an Prolin und Glycin sowie hydrophoben Bereichen besitzen. Die α -helikalen Bereiche des Proteins können im extrazellulären Raum zwischen Lysin-Resten quervernetzt werden. Das Kernprotein ist in eine Hülle aus Mikrofibrillen eingebettet, die z. B. aus dem Glykoprotein *Fibrillin* bestehen (Kielty *et al.*, 2002).

Fibronectin zählt zu den Faserproteinen mit adhäsiven Eigenschaften. Es ist als Dimer aus zwei Untereinheiten aufgebaut. Kleinere Bereiche der Proteindomänen vermitteln Bindungen an Kollagene, Proteoglykane, Heparin und an verschiedene Zelltypen (Yamada, 1981). Die Bindung an Zellen wird durch das Sequenzmotiv Arg-Gly-Asp (RGD-Motiv) vermittelt, das von spezifischen Integrinen erkannt werden kann (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987).

1.3 Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix

Die Verbindung zwischen EZM und der Zelle gelingt hauptsächlich über Integrine und einige weitere Rezeptoren wie Discoidin-Domain-Rezeptoren (Shrivastava *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997), Proteoglykanen (Woods und Couchman, 1994; Woods und Couchman 1998; Zimmermann und David, 1999; Woods *et al.*, 2000) und Glykosaminglykanen (Borowsky und Hynes, 1998; Bono *et al.*, 2001).

1.3.1 Integrine

Integrine sind in Metazoen die grundlegenden Rezeptoren für die Verbindung der Zelle zur EZM und in Vertebraten zusätzlich für einige Zell-Zell-Adhäsionen zuständig. Sie sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, die sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzen. Dabei besitzen Integrine eine ausgedehnte extrazelluläre und eine wesentlich kürzere intrazelluläre Domäne. Bis heute sind acht β - und 18 α -Ketten bekannt, die kombiniert 24 unterschiedliche Integrine ergeben. Sie werden nach ihrer Ligandenspezifität und Zelltyp-spezifischen Expression in vier Gruppen eingeteilt: Kollagen-, Laminin-, RGD- und Leukozyten-spezifische Rezeptoren (Hynes, 2002).

Integrine dienen als transmembranes mechanisches Bindeglied zwischen extrazellulären und intrazellulären Bestandteilen der Zelle in Form des Zytoskeletts. Alle Integrine, ausgenommen $\alpha6\beta4$, gehen eine Verbindung zu dem aus Aktin aufgebauten Mikrofilamentsystem ein. Über diverse Proteine, die an die

intrazelluläre Domäne der Integrine binden, können eine große Anzahl an Signaltransduktionen moduliert werden. Die Aktivierung der Integrine ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Ligandenbindung, Kationen, Konformationsänderung und Proteine, die an den intrazellulären Bereich binden, beeinflussen die Aktivierung bzw. Deaktivierung (Hynes, 2002).

1.3.2 Discoidin-Domain-Rezeptoren

Die beiden Discoidin-Domain-Rezeptoren, *DDR1* und *DDR2*, sind als Kollagen-bindende Tyrosinkinase-Rezeptoren beschrieben worden. Kollagen, das in der nativen tripel-helikalen Konformation vorliegt, kann von den beiden Rezeptoren gebunden werden und eine im Vergleich zu anderen Tyrosinkinasen sehr langsame Autophosphorylierung auslösen. Die Bindung von *DDR2* an Kollagen stimuliert z. B. die Synthese der *Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1)* (Shrivastava *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997).

1.3.3 Proteoglykane und Glykosaminglykane

Ein Beispiel für ein an die EZM bindendes Proteoglykan ist das *Syndecan-4*. *Syndecan-4-Heparan-Sulfat* ist eine Transmembrankomponente, die zusammen mit Integrinen in Fokalkontakten auftritt. Es kann an *Fibronectin* binden und die Bildung der Fokalkontakte beschleunigen (Woods und Couchman, 1994; Woods und Couchman, 1998; Zimmermann und David, 1999; Woods *et al.*, 2000).

Auch Glykosaminglykane können an Komponenten der EZM binden. *Layilin* ist ein integraler Membranbestandteil, der die Fähigkeit besitzt, an *Hyaluronsäure* zu binden und als Rezeptor zu fungieren (Borowsky und Hynes, 1998; Bono *et al.*, 2001).

1.3.4 Fokalkontakte

Die Verbindung zwischen den EZM-Rezeptoren (Integrinen, DDRs, Proteoglykanen und Glykosaminglykanen) und der Zelle bilden die Fokalkontakte. Die Zahl der an der Bildung der Fokalkontakte beteiligten Proteine ist groß, und bis heute sind nicht alle beteiligten Proteine und supramolekularen Strukturen aufgeklärt. Werden die Proteine nach ihrer Funktion geordnet, gibt es die Proteine des Zytoskeletts (z.B. *Tensin*, *Vinculin*, *Paxillin*, α -*Aktinin*, *Parvin/Actopaxin* und *Talin*), die Tyrosin-Kinasen (*Src*, *FAK*, *PYK2*, *Csk* und *Abl*), die Serin/Threonin-Kinasen (*ILK*, *PKC* und *PAK*), die Modulatoren der small GTPasen (*ASAP1*, *Graf* und *PSGAP*), die Thyrosin-Phosphatasen (*SHP-2* und *LAR PTP*) und weitere Enzyme (z.B. *PI3-Kinase* und *Calpain II*). Einige der Proteine binden an den zytoplasmatischen Teil der Integrine (*Talin*, *Tensin*, *FAK* und *ILK*), während die anderen an *Aktin* binden (*Vinculin*, *Tensin*, α -*Aktinin* und *VASP*). Somit wird durch die Bildung supramolekularer Proteinkomplexe die EZM über Integrine mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden (Zamir und Geiger, 2001). Eine weitere Form der Integrin-assoziierten Matrixadhäsion sind die Fokalkomplexe, die in Lamellipodien auftreten (Nobes und Hall, 1995; Clark *et al.*, 1998; Rottner *et al.*, 1999). Sie zeichnen sich durch ein erhöhtes Vorkommen an $\alpha\beta 3$ -Integrinen aus. Fokalkomplexe reifen in der Regel zu Fokalkontakten (Clark *et al.*, 1998).

1.4 Auswirkungen von mechanischen Kräften auf die Zelle

Zellen reagieren auf mechanische Stimuli wie Gravitation, gerichtete physikalische Kräfte und mechanischen Stress mit hoher Empfindlichkeit. Mechanische Kräfte spielen außerdem bei vielen biologischen Prozessen eine Rolle. Adhäsion, Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Apoptose, Zellteilung sowie die Veränderung der Zellform sind biologische Aktivitäten, die allesamt von mechanischen Kräften entscheidend beeinflusst werden (Übersicht in Ingber, 1999). Auch in wesentlich komplexeren Prozessen wie der Knochen- und Wundheilung sind mechanische Kräfte von Bedeutung (Eckes *et al.*, 2000; Nomura und Takano-Yamamoto, 2000). Bei der Bildung von Fibrosen (Eckes *et al.*, 1999; Eckes *et al.*, 2000), Narben und hypertrophen Narben (Costa, *et al.*, 1999) sowie Arteriosklerose (Jiang *et al.*, 2000; Wernig und Xu, 2002) spielen mechanische Kräfte in der Pathologie eine wesentliche Rolle.

1.5 Mechanotransduktion

1.5.1 Outside/Inside Signaling

So groß die Zahl der beeinflussten biologischen Prozesse ist, so vielfältig ist auch die Anzahl der durch mechanischen Stress induzierten Signaltransduktionswege. Die mechanischen Stimuli überwinden dabei zuerst die Barriere der Zellmembran. Insgesamt vier große Transmembran-gebundene Komplexe ermöglichen dies:

1. Integrine
2. SAC (stretch activated channels)
3. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
4. ROS-produzierende Enzyme

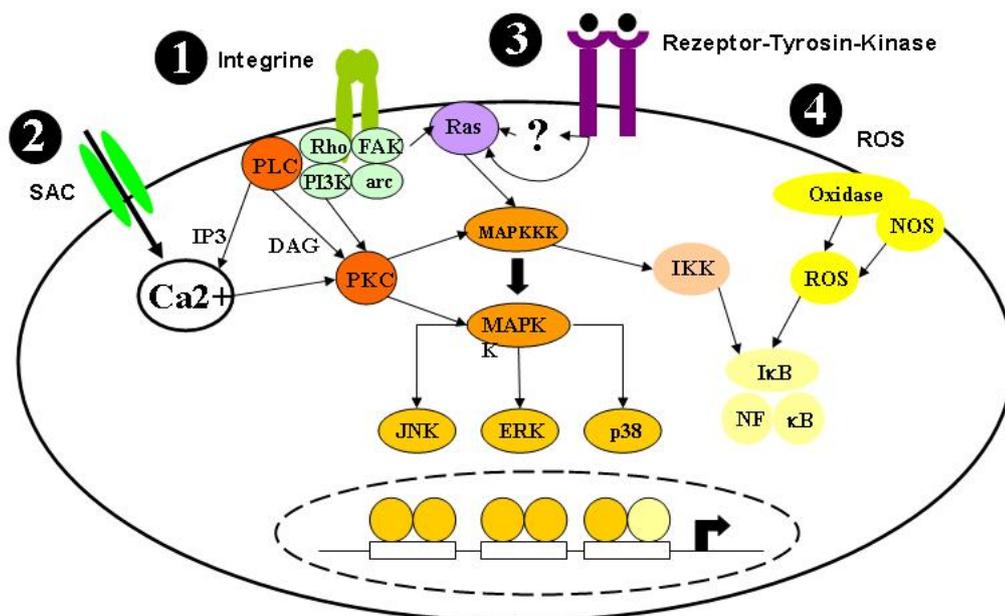


Abb. 1-3 Signaltransduktion durch mechanische Kräfte. Die Abbildung fasst die häufigsten angesprochenen Signaltransduktionswege bei mechanischem Stress zusammen (nach Ruwhof und Laarse, 2000).

1.5.1.1 Integrine

Die Integrin-vermittelte Übertragung mechanischer Stimuli geschieht über die Fokalkontakte. Sie haben die Möglichkeit, mechanische Kräfte direkt in ein intrazelluläres Signal zu übertragen (Ishida *et al.*, 1997; Sadoshima und Izumo, 1997; Galbraith und Sheetz, 1998). Signalmoleküle, wie z. B. die Tyrosinkinase *c-src* und die *focal adhesion kinase (FAK)*, die small GTPasen (aus der Ras-, Rho- und Rac-Familie), *phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)* und die *Phospholipase C (PLC)*, sind mit den Integrinen innerhalb der Fokalkontakte verbunden und können in Minuten nach dem Einsetzen mechanischer Kräfte aktiviert werden (Miyamoto *et al.*, 1995; Sadoshima und Izumo, 1997).

1.5.1.2 SAC

Die *stretch activated ion channels (SAC)* stellen spezifische Ionenkanäle (z. B. bei Neuronen) innerhalb der Zellmembran dar, die auf mechanische Stimuli reagieren (Sachs, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass SAC unter anderem mit Strukturen der EZM oder des Zytoskeletts verbunden sind. *Unc-105*, ein Kationenkanal der Degenerin-Familie, ist in die zuginduzierte Muskelkontraktion involviert. Dieses Protein ist über eine extrazelluläre Domäne an *Kollagen IV* der Basalmembran gekoppelt (Liu *et al.*, 1996). In Endothel- und anderen Zellen verursachen zyklische Kräfte innerhalb weniger Sekunden eine kurzzeitige Erhöhung des Kalziumspiegels (Rosales *et al.*, 1997). Die Erhöhung wiederum kann enzymatische Aktivitäten (*PKC*, *Phospholipase A2*, *NO-Synthase*), die Sekretion diverser Faktoren sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Santella und Carafoli, 1997).

1.5.1.3 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen regulieren z. B. heterotrimere G-Proteine. In Endothelzellen induziert Stress auf diesem Weg den MAPK-Pathway [*JNK (c-Jun NH(2)-terminal kinase)* und *ERK (extracellular signal regulated kinase)*] (Jo *et al.*, 1997; Malek *et al.*, 1999).

1.5.1.4 ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (wie O_2^- , H_2O_2 und NO) beeinflussen die kovalente Modifikation von Sulfhydryl-Resten der Proteine, ein wichtiger Parameter, der Einfluss auf Zellwachstum und die Genexpression nehmen kann. Intrazelluläre ROS können Phosphatasen und die Ubiquitin-Aktivität beeinflussen (Finkel, 1998). Die zelluläre Produktion reaktiver Radikale wird über Liganden, Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelt (Finkel, 1998; Finkel, 2001).

NO wird von einer Kalzium-induzierbaren und konstitutiv aktiven Form der *nitric oxide synthase (NOS)* produziert. Die enzymatische Quelle der Sauerstoff-abgeleiteten freien Radikale O_2^- und H_2O_2 ist nicht eindeutig geklärt, aber eine membrangebundene NADH/NADPH-abhängige Oxidase, die über small GTPasen kontrolliert wird, scheint beteiligt zu sein (Yeh *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen zeigen eine bedeutende Rolle von ROS an stressvermittelten Reaktionen von Endothelzellen. Der ROS-Spiegel und die Oxidation einiger Proteine sind schon Minuten nach der Einwirkung mechanischer Kräfte erhöht (DeKeulenaer *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1999). Die Dehnung von Osteoblasten führt zu einer raschen NO-Synthese (Pitsillides *et al.*, 1995). Die Behandlung von Endothelzellen mit Antioxidantien

inhibiert die Induktion ansonsten durch mechanischen Stress induzierbarer Gene (DeKeulenaer *et al.*, 1998; Wung *et al.*, 1999).

1.5.2 Intrazelluläre Weiterleitung

Die Weiterleitung des biochemischen Signals erfolgt über zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden. Verschiedene Untersuchungen weisen auf drei Hauptwege hin:

1. die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK)
2. den NF-kappaB-Signaltransduktionweg
3. Protein Kinase C-Aktivierung

1.5.2.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen

Die Mitglieder der MAPK-Familie, *ERK* (*extracellular signal regulated kinase*), *JNK* (*Jun N-terminal kinase*), *SAPK* (*stress activated protein kinase*) und *p38* spielen eine Hauptrolle in der Induktion der Transkription der *immediate early genes* (*IE*) (Karin und Hunter, 1995). Über drei unterschiedliche Kaskaden von vorgeschalteten MAPK-Kinasen werden die Mitglieder der MAPKs phosphoryliert und damit ihre Serin/Threonin-Phosphotransferase-Aktivität initiiert. Die aktivierten MAPKs gelangen in den Zellkern und regulieren durch Phosphorylierung die Aktivität nuklearer Faktoren wie z. B. *Elk-1* und *c-jun*. Außerdem wird die Expression von *c-fos* und *egr-1* initiiert (Karin und Hunter, 1995; Wung *et al.*, 1999).

Physikalische Kräfte beeinflussen die Aktivitäten von *JNK*, *ERK* und *p38* innerhalb von Minuten. Statischer und zyklischer Stress in kardialen Myozyten sowie durch Flüssigkeit erzeugter Druck in Endothelzellen aktivieren die Mitglieder der *ERK*- und *JNK*-Signalkaskade (Sadoshima und Izumo, 1997; Shyy und Chien, 1997). *p38* wird zeitabhängig durch zyklischen Stress in Rattenmonozyten aktiviert (Liang und Gardner, 1999). In glatten Muskelzellen von Gefäßen führte die Aktivierung des MAPK-Pathways zu einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors *AP-1* (Hu *et al.*, 1998).

1.5.2.2 NF-kappa B

Die Transkriptionsfaktoren der NF-kappaB-Familie bilden das distale Element einer Signalkaskade, die durch verschiedene Stressformen, wie z. B. UV-Licht, osmotischen Schock, ROS oder verschiedene Zytokine, aktiviert wird. NF-kappaB-Proteine binden dann als Homo- oder Heterodimere an Promotersequenzen von Stress-induzierbaren Genen (Mercurio, 1999).

Zyklischer Stress induziert die Transkription des *platelet-activating factor receptor* (*PAF-R*), die von der Aktivierung des *NF-kappaB* begleitet wird (Chaquor, 1999). Die Aktivierung von *NF-kappaB* konnte in gedehnten arteriellen glatten Muskelzellen durch Antioxidantien verhindert werden (Hishikawa *et al.*, 1997). Im Promoterbereich verschiedener Gene scheint *NF-kappaB* mit dem *distinct shear-stress responsive element* (SSRE) zu interagieren und die Genexpression zu beeinflussen (Khachigian *et al.*, 1995).

1.5.2.3 Protein Kinase C

Enzyme der Protein Kinase C (PKC)-Familie gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen. Die konventionellen PKC-Isoformen (α , β und γ) sind hauptsächlich an der Organisation des Zytoskeletts und der Fokalkontakte beteiligt. Verschiedene PKC-Enzyme sind für die mechanisch induzierte Gentranskription von Bedeutung. Die Akkumulation von *c-fos*-mRNA in gedehnten kardialen Rattenmyozyten wurde signifikant durch die Inhibition der PKC unterdrückt (Yazaki *et al.*, 1993). Ebenso konnte die induzierte Expression des *PAF-R* durch einstündigen zyklischen Stress von arteriellen glatten Muskelzellen durch PKC-Inhibitoren supprimiert werden. (Chaquor *et al.*, 1999). Zusätzlich lassen Ergebnisse eine Beteiligung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs vermuten (Pan *et al.*, 1999).

1.5.3 Inside/Outside Signaling

Die genannten Beispiele zeigen deutlich, dass Zellen sehr sensitiv auf mechanische Kräfte reagieren und diese durch Outside/Inside-Signaling in ein intrazelluläres biochemisches Signal umwandeln können. Ebenso reagieren Zellen in angemessener Art auf die biologische Situation in Form eines Inside/Outside-Signaling, in dem sie den mechanischen Kräften entgegenwirken und somit den biologischen Informationsfluss in Form eines Kreislaufs schließen.

Als Beispiel sei hier *Tenascin-C* angeführt. *Tenascin-C* ist eine strukturelle EZM-Komponente, die sowohl *in vivo* (Flück *et al.*, 2000) als auch *in vitro* (Trächslin *et al.*, 1999) innerhalb von Minuten auf mRNA-Ebene durch mechanischen Stress induziert wird. Auf Grund seiner dreidimensionalen Struktur wird vermutet, dass *Tenascin-C* die Adhäsion von Zellen unterbindet und somit das gestresste Gewebe entlastet (Chiquet *et al.*, 2003).

1.6 Fibroblasten und mechanische Kräfte

Zusammenhang und Bedeutung von Fibroblasten und mechanischen Kräften zeigen sich in komplexeren biologischen Situationen. Grundlegend ist es die Aufgabe der Fibroblasten, in einem Gewebe die Homöostase, das Kräftegleichgewicht, durch Auf- und Abbau der EZM aufrecht zu erhalten. Fibroblasten reagieren auf eine Verschiebung der Kräfte sehr sensitiv, indem z. B. Kollagene oder Matrix-Metalloproteinasen (MMP) entsprechend produziert und sezerniert werden (Dethlefsen, 1998; Kessler *et al.*, 2001).

1.6.1 Wundheilung

Nach einer Verletzung kommt es zur Schließung der Wunde und zur Neubildung des zerstörten Gewebes. Fibroblasten und mechanische Kräfte spielen bei der Bildung des Granulationsgewebes und der Wundkontraktion, die drei bis vier Tage nach der Verwundung mit der Proliferation von Fibroblasten beginnt, eine tragende Rolle. Dabei ist der Einfluss von Wachstumsfaktoren wesentlich, die von Keratinozyten, Makrophagen, Thrombozyten und den Fibroblasten selbst produziert werden (Bennett und Schultz, 1993). Nach der Einwanderung der Fibroblasten in das Fibrinkoagulum beginnt die Synthese einer kollagenreichen Matrix, bestehend aus *Fibronektin*, *Vitronektin* und den *Kollagenen III, IV, V* und *VI*

(Clark, 1996). Parallel dazu kommt es zu einer veränderten Expression der Oberflächenmoleküle. Um an der provisorischen Matrix migrieren zu können, die im wesentlichen aus *Fibrin*, *Fibronektin* und *Vitronektin* besteht, muss die unter anderem aus $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -*Integrinen* bestehende Zelloberfläche zu Gunsten von $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -*Integrinen* verschoben werden (Xu und Clark, 1996). Die Migration erfolgt aktiv an *Fibronektin* (Sottile und Hocking, 2002). Während der Wundkontraktion differenzieren die Fibroblasten zu Myofibroblasten. *TGF β* (*Transforming Growth Factor β*) und mechanische Faktoren induzieren diesen Prozess (Gailit und Clark, 1994). Myofibroblasten sind durch die erhöhte Expression von α -*smooth-muscle-actin* (α -*sma*) und der Bildung von Aktin-Stressfasern gekennzeichnet (Anderson *et al.*, 2004). Sie bilden sich in Situationen, wie z. B. der Wundheilung, bei hypertrophen Narben oder fibrotischen Geweben (Eckes *et al.*, 1999; Eckes *et al.*, 2000; Schelling *et al.*, 2002; Thannickal *et al.*, 2003).

1.6.2 Fibrose

Die Fibrose stellt einen sehr komplexen pathologischen Prozess dar, der durch eine Aktivierung von Fibroblasten und die Initiation verschiedener Kaskaden gekennzeichnet ist. Der Phänotyp äußert sich durch eine verstärkte und kontinuierliche Ablagerung von Molekülen der EZM. Dabei spielen Interaktionen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Oberflächenrezeptoren (Integrinen und DDRs), Komponenten der extrazellulären Matrix und mechanische Kräfte eine wichtige Rolle (Eckes *et al.*, 1999; Eckes *et al.*, 2000). Signifikant für Fibrosen ist die enorme Überproduktion an Kollagenen, wie z. B. *Kollagen III* und *Kollagen I*. Bei der Sklerodermie sind zusätzlich die *Kollagene V*, *VI*, *VII* und *XVI* überexprimiert. Einhergehend mit diesem Phänotyp zeigt sich zusätzlich häufig eine Reduktion der Expression und Aktivität von MMPs, wie z. B. der *MMP-1* (Eckes *et al.*, 1999). Es ist offensichtlich, dass Fibroblasten in einer so dicht gepackten Matrix anderen mechanischen Kräften ausgesetzt sind.

1.7 Modelle zur Erläuterung der Mechanotransduktion

Wie mechanische Signale in Zellen übermittelt werden bzw. welche mechanischen Eigenschaften die Zelle selbst zeigt, ist noch ungeklärt und sorgt für kontroverse Diskussionen, denen zwei Theorien zugrunde liegen. Sie werden als *Fluid Drop* und *Tensegrity Modell* bezeichnet werden.

1.7.1 Fluid Drop Modell

Das Fluid Drop Modell geht davon aus, dass die Zelle aus einem Sol-artigen Plasma besteht, dass von einer doppelten Lipidschicht ummantelt ist und im Wesentlichen den physikalischen Gesetzen eines liquiden Tropfens folgt. Die Form und Mobilität der Zelle wird aktiv durch die Ausbildung interner mechanischer Strukturen (z. B. Zytoskelett) bestimmt. Externe mechanische Kräfte gelangen durch die Umwandlung in biochemische Signale über Membranrezeptoren und Membrankanäle ins Innere der Zelle (Thoumine *et al.*, 1999).

1.7.2 Tensegrity Modell

Das Tensegrity Modell geht hingegen davon aus, dass die drei mechanischen Gerüste der Zelle (Aktinfilamentsystem, Mikrotubuli und Mikrofilamente) miteinander verbunden sind und eine Spannung innerhalb der Zelle aufbauen. Diese Kraft sorgt dafür, dass die Zelle eine Kugelform annimmt und die gespannte Zellmembran das strukturelle Gerüst der Zelle ummantelt. Wesentlich an diesem Modell ist, dass die mechanische Verknüpfung der Zellstrukturen über die einzelnen Systeme mit dem Zellkern und einzelnen Membranrezeptoren verbunden sind und eine kontinuierliche mechanische Kraftübertragung erlauben. Neben der Übertragung mechanischer Signale durch die Umwandlung in ein biochemisches Signal an der Zellmembran können die Kräfte direkt als physikalisches Signal in die Zelle gelangen und dort weiterverarbeitet werden (Ingber, D. E., 1997; Ingber D. E., 2003 A und B).

Keines der beiden Modelle hat sich in den letzten Jahren durchgesetzt. Allerdings bietet das Tensegrity Modell wesentlich mehr Erklärungsansätze, da es die formulierte Signaltransduktionen des Fluid Drop Modell nicht ausschließt und das Spektrum der potentiellen Signaltransduktionen wesentlich erweitert.

1.8 Zellkultursysteme zur Analyse mechanischer Kräfte

Zellen können isoliert oder als Gewebe bzw. als Organ kultiviert werden (Übersicht in Freshney, 1992). Während die Kultivierung von Geweben und Organen die Möglichkeit bietet, biologische Prozesse unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen zu untersuchen, hat die Zellkultur den Vorteil, den Fokus der Analyse auf einzelne reduzierte Fragestellungen und Aspekte zu lenken und grundlegende Mechanismen zu analysieren.

Für gewöhnlich werden zur Analyse von Zellen unter dem Einfluss mechanischer Kräfte zwei verschiedene Modellsysteme genutzt. In dem einen Fall werden Zellen auf flexiblem Substrat (z. B. einer elastischen Membran) ausgesät und definierten permanenten oder zyklischen Kräften ausgesetzt, die über das flexible Substrat übertragen werden (Leung *et al.*, 1976; Sadoshima und Izumo, 1997; MacKenna *et al.*, 1998).

Die zweite Möglichkeit ist, die Zellen in eine dreidimensionale Matrix einzubetten (z. B. Kollagen). Die Zellen adhären an Kollagenfibrillen und beginnen, das sich formierende Matrixnetzwerk zu kontrahieren (Bell *et al.*, 1979; Stopak und Harris, 1982; Lambert *et al.*, 1992; Grinnell, 1994). Die Fixierung des Kollagengels durch Adhäsion an einen festen Untergrund (z. B. Zellkulturschale) verhindert die Kontraktion des Gels und baut somit eine Zugkraft auf, die auf die Zellen rückwirkt (isometrische Kondition). Wird das Kollagengel nicht fixiert, können die Zellen das Gel unter isotonischen relaxierten Bedingungen kontrahieren. Der Vorteil dieser Methode liegt in der wesentlich besseren Simulation der *in vivo* Situation, da die Zellen in einer dreidimensionalen Matrix eingebettet sind.

In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes System der dreidimensionalen Kollagengele angewendet, das aus zwei verschiedenen Geltypen besteht (Lambert *et al.*, 1992). Während in den *freely (floating) lattices* (FL) die Gele ungehindert kontrahieren, wird in den *bound lattices* (BL) die Kontraktion durch einen peripheren Nylonring, an dem die Kollagenmatrix anhaftet, inhibiert und somit ein mechanischer Stress induziert.

In den gestressten Gelen kommt es zur Ausbildung der aktivierten Fibroblasten. Zudem werden verschiedene *Kollagene (I, III, VI und XII)*, *Tenascin-C*, *BMP-1*, *TGF- β* und *CTGF* stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Synthese von *$\alpha 2$ -Integrin* und *MMP-1* reprimiert (Lambert *et al.*, 1992; Kessler *et al.*, 2001; Kessler, 2002). Das Modellsystem reflektiert eine Vielzahl von grundlegenden *in vivo*-Reaktionen der Fibroblasten auf mechanischen Stress.

Um den Einfluss mechanischer Kräfte auf die Genexpression primärer Hautfibroblasten zu untersuchen, wurden die Zellen *in vitro* in dreidimensionalen Kollagengelen unter isotonischen oder isometrischen Bedingungen kultiviert und nach 20 h analysiert (Kessler *et al.*, 2001; Kessler, 2002). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Fibroblasten in einem dynamischen Gleichgewichtszustand. Mit Hilfe eines cDNA-Mikrochip-Arrays, ergänzt durch detaillierte Northernblot-Analysen, wurde eine Vielzahl differentiell regulierter Gene mit bekannter und unbekannter Funktion identifiziert. Die mechanische Stimulation von Fibroblasten führte auf der RNA-Ebene zur Induktion von extrazellulären Matrixmolekülen, Wachstumsfaktoren, Protease-Inhibitoren und Komponenten der Fokalkontakte und des Zytoskeletts (Kessler *et al.*, 2001; Kessler, 2002).

Im Gegensatz dazu wurden eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren, Matrix-degradierenden Enzymen und Apoptose-assoziierten Molekülen reprimiert. Dies ging mit deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie einher. Das Transkriptionsprofil mechanisch belasteter Fibroblasten in Kollagengelen deutet auf die Bildung eines „aktivierten“ Fibroblasten-Phänotyps hin, der eine gesteigerte Matrixsynthese und Hemmung des Matrixabbaus aufzeigte und Parallelen zu Myofibroblasten besitzt (Kessler, 2002).

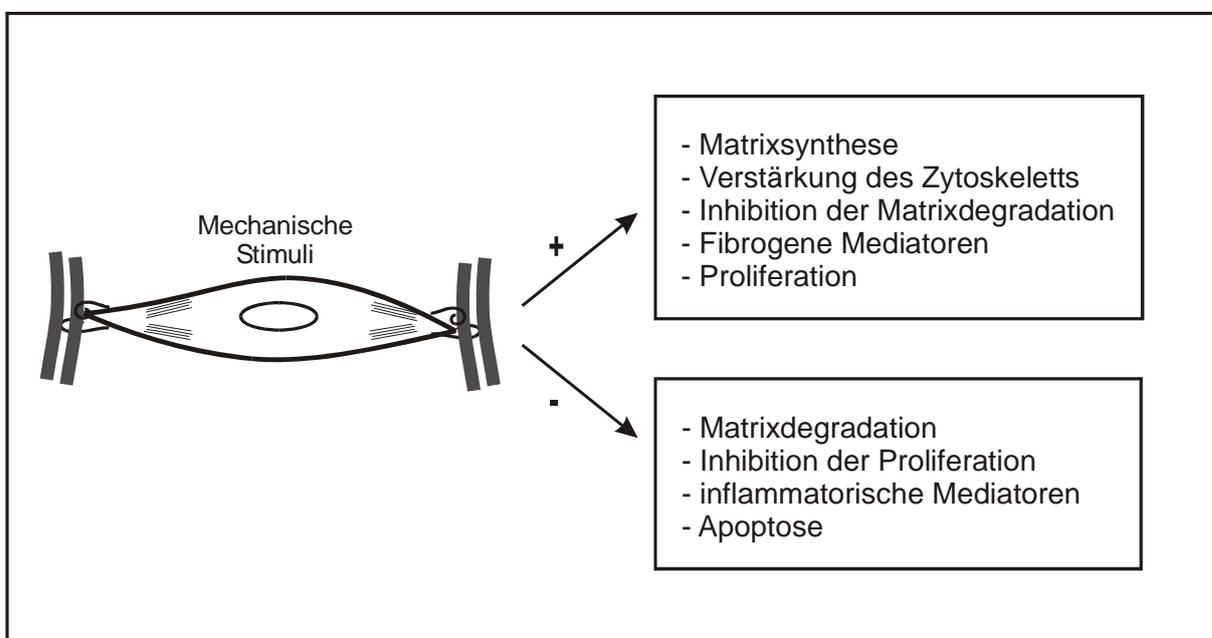


Abb. 1-4 Mechanisch belastete Fibroblasten zeigen nach 20 h eine koordinierte Expression verschiedener funktioneller Gengruppen. Die mechanisch belasteten Fibroblasten zeigen eine erhöhte (+) bzw. verringerte (-) Expression verschiedener funktioneller Gengruppen (entnommen aus Kessler, 2002).

1.9 Zielsetzung

Die Charakterisierung primärer Hautfibroblasten in dreidimensionalen Kollagengelen ergab nach 20 h zum Zeitpunkt des mechanischen Gleichgewichts unter isotonischen und isometrischen Bedingungen eine koordinierte Expression verschiedener Gengruppen und Initiation des „aktivierten Phänotyps“ (s. 1.8). Zielsetzung dieser Arbeit ist die Analyse und Charakterisierung der Genexpressionsprofile von primären humanen Hautfibroblasten in den dreidimensionalen Kollagengelen FL und BL zu frühen Zeitpunkten. Innerhalb des Zeitraumes von 1 bis 8 h sollen Gene identifiziert werden, die die zelluläre Antwort auf mechanischen Stress initiieren und für den „aktivierten Phänotyp“ der gestressten Fibroblasten entscheidend sind. Zur Analyse der Genexpressionsprofile werden die Serielle Analyse der Genexpression (SAGE) und PIQOR™-cDNA-Microarrays verwendet. Durch alternative Methoden wie Q-PCR und Northernblot werden anschließend ausgesuchte Gene validiert. Zusätzlich sollen durch die bioinformatischen Analysen der in den beiden Kollagengel-Systemen differentiell exprimierten Gene zeitabhängige und funktionelle Zusammenhänge aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

37 °C-Inkubator:	Certomat BS-1, Braun Biotech, Melsungen
Bakterienschüttler:	Certomat R, Braun Biotech, Melsungen
Brutschrank:	B6030, Heraeus Instruments, Hanau
Densitometer:	Personal Densitometer, Molecular Dynamics, Krefeld
DNA-Sequencer:	ABI Prism 377, Perkin Elmer, Boston, USA
<i>E. coli</i> -Pulser:	Bio Rad, München
Elektrophoresekammern:	Stratagene, La Jolla, USA
Filmentwicklermaschine:	Curix 60, AGFA, Leverkusen
Imager:	FluorS Multiimager, Bio Rad, München Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, USA
Kühlbad:	Thermo Star, Lauda
Laborschüttler:	VF2 und KS 250 Basic, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskope:	Nikon Eclipse E800, Nikon, Düsseldorf
PAGE-Gel Laufkammern:	Bio Rad, München
Phosphoimager Filme:	Storage Screen, Packard, Meriden, CT, USA
Phosphoimager:	Cyclone Storage Phosphorsystem, Packard, Meriden, CT, USA
Photometer:	Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg Helios alpha, Unicam, Cambridge, England
Power Supply:	GPS 200/400, Pharmacia Biotech, Freiburg Power Pac 300, Bio Rad, München
Sterilbank:	Lamin Air HB2448, Heraeus, Hanau
Thermoblock:	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg HAT 1301, Bio Rad, München
Thermocycler:	GeneAmp PCR Detection System 5600 und GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer, Boston, USA PTC-225, Biozym, Oldendorf
UV-Cross-Linker:	Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad:	SW-20-C und E-19, Julabo, Seelbach
Zentrifugen:	Sorvall RC5B, Sorvall RC26 Plus und Sorvall Super T21, Sorvall, Dupont, Boston, USA Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau 5417 C, Eppendorf, Hamburg Rotoren GSA, SS34, HB4 5417C, Eppendorf, Hamburg Rotoren GS-3, SA-300, SLA-1500, Sorvall, Dupont, Boston, USA

2.1.2 Zellkultur

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies, Eggenstein) mit 4500 mg/l Glucose und Zusatz von 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FCS (v/v)
- 10 × DMEM zur Herstellung von Kollagengelen, Biochrom, Berlin
- Fötale Kälberserum (FCS), PAA Laboratories, Linz, Österreich.
- Zellkulturmaterialien: Greiner, Solingen und TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Schweiz
- Penicillin, Streptomycin und Glutamin (Biochrom, Berlin)
- *Kollagen I* aus Kalbshaut (IFBF, Leipzig), säurelöslich, 3 mg/ml (w/v) in 0,1 % Essigsäure (v/v)
- DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.3 Verwendete Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

<u>10 × MOPS</u>	0,4 M 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 0,1 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0
<u>6 x DNA-Probenpuffer</u>	0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol FF (w/v), 30 % Glycerin/H ₂ O (v/v)
<u>PBS</u>	137 mM NaCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, pH 7,2
<u>RNA-Denaturierungspuffer</u>	50 % Formamid (v/v), 1 × MOPS, 6,5 % Formaldehyd (v/v)
<u>6 x RNA-Färbelösung</u>	0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol (w/v), 30 % Glycerin/H ₂ O (v/v)
<u>SSC</u>	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0
<u>1 x TBE</u>	0,9 M Tris-Borat, 2 mM EDTA
<u>2 x RNA-Probenpuffer</u>	48 % (v/v) Formamid; 6,5 % (v/v) Formaldehyd; 6,5 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) 10 x MOPS; 29 % (v/v) H ₂ O; 2,5 % (w/v) Ethidiumbromid
<u>6 x PAGE-Probenpuffer</u>	30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 69,5 % H ₂ O
<u>2 x B&W</u>	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 2 M NaCl
<u>LoTE</u>	3 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,2 mM EDTA; bei 4 °C gelagert
<u>PC8</u>	480 ml Phenol (auf 65 °C erwärmt); 320 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8); 640 ml CHCl ₃ . Die PC8-Lösung wurde geschüttelt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend Aliquots bei -20 °C gelagert.
<u>5 x RNA-Probenpuffer</u>	0,2 % Bromphenolblau; 0,2 % Xylencyanol; 80 % Glycerin
<u>1 x TAE-Puffer</u>	0,04 M Tris-Acetat; 0,001 M EDTA; pH 8,5

2.1.4 Molekulargewichtsstandards

1 Kb Plus DNA-Leiter

Boehringer Mannheim

10 bp DNA-Leiter

Boehringer Mannheim

2.1.5 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Standardchemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Fluka (Neu-Ulm). Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg). Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bestellt. Radioaktiv markierte Nukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Hautbiopsien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, Eggenstein) gewaschen und anschließend die Fettschicht vorsichtig entfernt. Kleine Hautstücke von wenigen Millimetern wurden mit der Dermis nach unten auf den Boden einer Kulturflasche überführt. Nach der Zugabe von DMEM wurde die Flasche für ein bis zwei Stunden mit angedrehtem Deckel in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Flasche vorsichtig so auf die Seite gelegt, dass alle Biopsien mit Medium bedeckt waren. Zwei mal pro Woche wurde das Medium gewechselt. Kurz vor der Konfluenz wurden die Fibroblasten 1:2 subkultiviert.

Zur Lagerung wurden 1.000.000 Zellen in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS; 10 % DMSO) überführt und in einem Ethanolbad bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die durch das Auspflanzen von Hautbiopsien gesunder Spender gewonnenen humanen Hautfibroblasten wurden als Monolayerkultur in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert (5 % CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit). Als Kulturmedium diente DMEM mit einem Zusatz von 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Ascorbat sowie 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS). Konfluente Kulturen wurden nach dem Waschen mit PBS-Lösung durch Inkubation mit einer Lösung von 0,1 % Trypsin, 0,02 % EDTA bei 37 °C von der Kulturschale gelöst und anschließend in einem Verhältnis von 1:2 subkultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Für die Kollagengele (s. 2.2.1.4) wurden Fibroblasten in den Passagen sechs bis neun verwendet.

Es wurden Fibroblasten folgender Spender verwendet:

Nr.	Verwendet in	Geburtsdatum	Geschlecht	Areal	Biopsie am:
354	SAGE	27.04.63	Weiblich	Bauch	10.03.1999
409	PIQOR™:	01.06.40	Männlich	Stirn	13.09.2000
446	PIQOR™:	30.10.37	Männlich	pectoral	22.05.2002
444	PIQOR™:	25.11.75	Männlich	Gesäß	23.04.2002
449	PIQOR™:	20.11.89	Männlich	Stirn	20.06.2002
480	PIQOR™:	unbekannt			

2.2.1.2 Mykoplasmentest

Vor den Experimenten wurden die Fibroblasten auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet. Dazu wurden nach der Trypsinierung Fibroblasten auf einer sechs Zentimeter großen Kulturschale ausgesät. Sobald die Zellen semikonfluent waren, wurde das Medium von der Schale entfernt und die Zellen 5 - 10 min mit 4 °C kaltem Carnoys Fixativ (Methanol/Essigsäure 3:1, pH 5,5) inkubiert. Nach fünfminütigem

Waschen mit McIlvaines-Puffer (0,14 M Na₂HPO₄; 0,05 M Zitronensäure; pH 5,5) wurde die Schale mit Färbelösung [(50 µg/ml Höchst 33258 (Bisbenzimid) in H₂O) 1:1000 mit McIlvaine-Puffer verdünnt] beschichtet, 15 min inkubiert und dann fünf Mal mit H₂O gewaschen. Nach dem Auftragen von einem Tropfen Einbettmedium (Glycerol/McIlvaine-Puffer 1:1) mit einer Pipette wurde ein Deckgläschen unter leichtem Andrücken luftblasenfrei aufgelegt. Die Analyse der angefärbten DNA erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung unter UV-Licht.

2.2.1.3 Herstellung beschichteter Bakterienchalen für Kollagengele

(modifiziert nach Stokes *et al.*, 2001)

Um eine Adhäsion der Kollagengele an die Schalenmatrix zu verhindern, wurden Bakterienchalen mit PolyHEMATM [Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat (P-3932 Sigma, Deisenhofen)] beschichtet. Dazu wurde die PolyHEMATM-Stocklösung (1,2 mg/10 ml EtOH) 1:10 mit EtOH verdünnt und jeweils 15 ml der Lösung bei 37 °C in der mit Parafilm abgedichteten Schale ÜN inkubiert. Die Lösung wurde restefrei abgesaugt und die Schalen einmal mit PBS gewaschen. Die beschichteten Schalen wurden in Frischhaltefolie bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.4 Herstellung der Kollagengele Free und Bound Lattice

(modifiziert nach Bell *et al.*, 1979; Lambert *et al.*, 1992; Langholz *et al.*, 1995)

Zur Herstellung der beiden Kollagengeltypen Free (FL) und Bound Lattice (BL) wurde gereinigtes lyophilisiertes *Kollagen I* aus Kälbern (IFBF, Leipzig) in einer Konzentration von 3 mg/ml bei 4 °C in steriler 0,1 %iger Essigsäure ÜN gelöst. 1,76 x konzentriertes kaltes DMEM wurde mit der Kollagenlösung in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml gemischt, mit 0,1 M steriler NaOH-Lösung neutralisiert (pH 7,1) und anschließend mit FCS in einer Endkonzentration von 10 % versetzt. 15 ml der Suspension mit jeweils 3×10^6 Fibroblasten wurden in PolyHEMATM-beschichteten Bakterienkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm gegeben. Zur Induktion von mechanischem Stress wurde an die Innenseite der Bakterienchale der BL-Gele zusätzlich ein zu einem Ring geflochtener Nylonfaden (0,5 mm Fadenstärke, dreifach gewunden) mit ca. 10 cm Durchmesser gelegt. Die Gele wurden dann zwischen 1 h und 12 h bei 37 °C ohne Mediumwechsel im CO₂-Inkubator kultiviert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Aufreinigung aus Kollagengelen

Die Kollagengele wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt und anschließend 10 min bei 4 °C mit 700 × g und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, einmal Waschen mit eiskühlem PBS und wiederholter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C mit 700 × g und ausgeschalteter Bremse, wurden die Pellets in 1,5 ml TriFast (PeqLab, Erlangen) pro Gel aufgenommen und unter ständigem Schütteln bei RT homogenisiert (in Anlehnung an Chomczynski, 1993). Die genomische DNA wurde durch fünfmaliges Pressen des Lysates durch eine Spritze mit einer 22 G-Kanüle geschert. Anschließend wurden die Proben mit 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem TriFast-Reagenz versetzt, 15 s geschüttelt und fünf min bei RT inkubiert. Die Proben wurden bei 4 °C und 13.000 × g zentrifugiert und dann jeweils 500 µl der wässrigen Phase in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 800 µl 2-Propanol pro 500 µl wässriger Phase. Nach 10 min Inkubation des Gemisches bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation (15 min, 13.000 × g, 4 °C) präzipitiert, das Pellet mit kaltem 70 %igen Ethanol einmal gewaschen und wiederholt für 5 min zentrifugiert (13.000 × g, 4 °C). Das Präzipitat wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Eine zweite Aufreinigung der gewonnenen RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Lösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 mRNA-Isolation mit Qiagen RNeasy Oligotex mRNA Kit

Nach der Aufreinigung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde die mRNA mit Hilfe des RNeasy Oligotex mRNA Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und die Reinheit der Präparation wurden photometrisch bestimmt.

2.2.2.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung im Photometer

Die Konzentrationsbestimmung des Nukleinsäuregehalts erfolgte durch photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentrationen in µg/µl wurden nach den folgenden Formeln berechnet:

$$DNA: (E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor})/1000$$

$$RNA: (E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor})/1000$$

2.2.2.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Falls nicht anders angegeben, wurden Fällungen mit Ethanol wie folgt durchgeführt: 200 µl wässrige Probe wurde nach der Zugabe von 100 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 700 µl EtOH für 1 h bei -20 °C inkubiert, mit 19.400 × g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen. Die Probe wurde im Anschluss im Vakuum für ca. 10 min bei 37 °C getrocknet und in 20 µl LoTE (s. 2.1.3) gelöst.

2.2.2.5 PC8-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion mit PC8 (s. 2.1.3) erfolgte, soweit nicht anders angegeben, durch die Zugabe eines gleichen Volumenanteils an PC8 zur wässrigen Probe, 30 sec kräftigem Mischen und anschließender Zentrifugation bei 19.400 x g für 2 min. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und weiterverwendet.

2.2.2.6 cDNA-Synthese

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA wurde die SuperScriptTMII-Reverse-Transkriptase (SSII) (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für die semiquantitative PCR (s. 2.2.6) wurden 2 µg Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt.

2.2.2.7 Auftrennung von RNA und DNA durch Gelelektrophorese

2.2.2.7.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

1 % (w/v) Agarose wurden in 1 x TBE (s. 2.1.3) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in ein abgedichtetes Gelbett mit einem Probenkamm luftblasenfrei gegossen. Nach dem Aushärten wurde es waagrecht in eine Elektrophoresekammer eingelegt und mit 1 x TBE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden entsprechend mit 6 x DNA-Blaumarker (s. 2.1.3) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Spannung der Elektrophorese betrug 5 V/cm Laufstrecke. Das Anfärben des Gels erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) für 10 min und anschließendem Waschen für 15 min in H₂O oder alternativ durch Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) pro 100 ml Gel nach dem Abkühlen des Gels auf 60 °C. Die Dokumentation erfolgte direkt im Anschluss an die Elektrophorese unter UV-Licht.

2.2.2.7.2 RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

1,5 % (w/v) Agarose wurde in H₂O aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf 55 °C mit 10 x MOPS (s. 2.1.3) in einfacher Endkonzentration versetzt. Nach der Zugabe von 37 % (v/v) Formaldehyd (Endkonzentration 0,7 % (v/v)) und dem Aushärten des Gels wurde es waagrecht in die Laufkammer gelegt und mit 1 x MOPS bedeckt. Die RNA-Proben wurden 2:1 mit denaturierendem RNA-Probenpuffer (s. 2.1.3) versetzt und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte mit einer Spannung von 5 V/cm Laufstrecke. Die Dokumentation erfolgte direkt im Anschluss an die Elektrophorese unter UV-Licht.

2.2.2.7.3 DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für ein 12 %iges PAGE-Gel wurden 14,45 ml H₂O vorgelegt und anschließend 490 µl 50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE) (2 M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA) und 7,35 ml 40%iges Polyacrylamid (19:1 Acrylamid/Bisacrylamid) dazugegeben. Nach der Filtration der Lösung durch einen Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser wurden 21 µl TEMED und 245 µl 10 %iger APS-Lösung dazu pipettiert. Die Lösung wurde schnellstmöglich zwischen zwei mit Spacern abgedichtete Glasplatten gegossen und ein Probenkamm vorsichtig eingesetzt. Nach ca. 1 h wurde das ausgehärtete Gel vertikal in die Laufkammer eingesetzt und die Laufkammern mit 1 x TAE-Puffer (s. 2.1.3) gefüllt. Die Proben wurden entsprechend mit 6 x PAGE-Probenpuffer (s. 2.1.3) versetzt und anschließend aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung

von 60 V gefahren. Die Färbung erfolgte mit SybrGold™ (1:10.000 verdünnt) (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA) für 10 min und anschließender Analyse unter UV-Licht.

Das 8 %ige PAGE-Gel setzte sich aus 4,2 ml 40 % Polyacrylamid (37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid), 16,2 ml H₂O; 0,42 ml 50 x TAE; 0,21 ml 10 % APS und 0,18 ml TEMED zusammen. Das weitere Verfahren entsprach den Angaben des 12 %igen PAGE-Gels.

2.2.2.8 Northernblot

Zwischen 5 und 10 µg RNA wurden je Probe für einen Northernblot eingesetzt. Dazu wurden 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2,5 Volumenanteile 100 %iger Ethanol zur Probe gegeben und ÜN bei -20 °C präzipitiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 x g und 4 °C wurde die RNA gefällt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 2,2 µl H₂O, 5 µl Formamid, 1,2 µl 10 x MOPS und 1,6 µl Formaldehyd (37 %) aufgenommen und für 10 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe mit 2 µl 5 x RNA-Probenpuffer (s. 2.1.3) und 1 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1 %igen, denaturierenden Agarosegel mit einer Spannung von 5 V/cm Laufstrecke in 1 x MOPS-Puffer (s. 2.1.3). Der vertikale Transfer der RNA erfolgte auf eine Nylonmembran (Gene Screen Plus™, DuPont, Bad Homburg) über Kapillarwirkung mit 10 x SSC-Puffer (s. 2.1.3) ÜN bzw. in einem Zeitraum von mindestens 16 h (vgl. Sambrook *et al.*, 1989). Nach einem kurzen Schwenken der Membran in 1 x SSC wurde sie zur Fixierung der RNA mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker, 1200 kJ). Der Transfer der Nukleinsäure wurde durch eine 15 min Färbung der Membran in einer Lösung aus 0,04 % Methylenblau (w/v) in 50 mM Natriumacetatlösung (pH 5,2) überprüft und zur Entfärbung anschließend 2 x 15 min in 25 %igen Ethanol geschwenkt.

2.2.2.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Redi Prime™ Random Labelling System (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide wurden durch Filtration mit ProbeQuant™ G-50 Micro Column Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers entfernt. Die Effizienz des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide wurde im Szintillationszähler LS 6500 der Firma Beckman bestimmt. Zur Hybridisierung wurden 1-2 x 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung (1,6 x 10⁴ - 3,3 x 10⁴ Bq/mL) verwendet.

Als Standard diente 18S-RNA. Für die radioaktive Markierung der 18S-Sonde wurden folgende Komponenten in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben:

4 µl 5 x TdT-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe)

1 µl 18S-Oligo (100 ng/µl)

2,5 µl α³²P-dCTP

11,5 µl TdT-Enzym (Gibco BRL, Karlsruhe)

Die Probe wurde kurz kräftig gemischt, für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann zu der Prähybridisierungslösung gegeben. Zum Entfernen einer radioaktiv markierten Sonde wurde der Northernblot für 10 min in

0,1 % SDS/0,1 x SSC bei 95 °C inkubiert und anschließend die Membran durch das Auflegen eines Films für 24 h auf verbleibende Signale überprüft.

DNA-Sequenz des 18S-Oligonukleotids

5'-ACG GTA TCT GAT CGT CTT CGA ACC-3' Sequenz nach Carlson *et al.*, 1993

2.2.2.8.2 Hybridisierung des Filters mit radioaktiv markierter Sonde

Nach einer einstündigen Inkubation der Membran zur Prähybridisierung in UltraHyb™-Lösung (Ambion, Austin, USA) bei 42 °C wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde zugegeben ($1 - 2 \times 10^6$ cpm/ml oder $1,6 \times 10^4 - 3,3 \times 10^4$ Bq/ml) und mindestens 16 h bei 42 °C inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener DNA wurde der Filter zweimal 5 min bei 42 °C mit $2 \times$ SSC/0,1 % SDS und anschließend 15 min bei 42 °C mit $0,1 \times$ SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte durch Autoradiographie bei -80 °C. Im Falle der 18S-Hybridisierung wurde die Membran 1 h bei 45 °C in HybPuffer [6 x SSC; 5 x Denhardts (1 g/l Ficoll Type 400; 1 g/l Polyvinylpyrrolidon; 1 g/l BSA); 0,5% SDS; 25% Formamid] prähybridisiert und nach der Zugabe der radioaktiven Sonde für mindestens 16 h bei 45 °C inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss zweimal mit 6 x SSC/0,1% SDS bei 45 °C gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte durch Autoradiographie bei -80 °C.

Verwendete DNA-Sonden:

<u>pSPp64PX7</u>	2 kb Insert, spezifisch für die interstitielle Kollagenase (<i>MMP-1</i>) (Angel <i>et al.</i> , 1987)
<u>pPAIJ.7</u>	1,9 kb Insert spezifisch für <i>PAI-2</i> (Schleuning <i>et al.</i> , 1987)
<u>pINCY1297562</u>	Insert spezifisch für humanes <i>Podocalyxin-like protein (PCLP)</i> ; EcoRI-Fragment des Klons pINCY1297562 (Incyte Genomics, Palo Alto, CA, USA)
<u>pA2Integrin</u>	spezifisch für <i>$\alpha 2$-Integrin</i> (Takada und Hemler, 1989)

Die folgenden Sonden wurden aus pGEM-T-Vektoren mit Hilfe genspezifischer Primer über PCR amplifiziert und hatten eine Größe zwischen 200 und 400 bp:

<u>pGEM-T-CDKN1A</u>	<i>spezifisch für Cyclin-dependet kinase Inhibitor 1A</i> sense: 5'-GATGCGCTAATGGCGGGCTG-3' antisense: 5'-TTGGAGTGGTAGAAATCTGTC-3'
<u>pGEM-T-RAB14</u>	<i>spezifisch für Ras related Protein RAB14</i> sense: 5'-CAGATTTGGAGGCACAGAGAG-3' antisense: 5'-GAGGTCCTAGCAGCCACAG-3'
<u>pGEM-T-JWA</u>	<i>Vitamin A responsive; cytoskeleton related</i> sense: 5'-GAGTCCCTTCAACATGATCC-3' antisense: 5'-ATTCTCCAGTTTGTCTTGAGG-3'
<u>pGEM-T- GADD45B</u>	<i>spezifisch für Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta</i> sense: 5'-CTTCCTGGATTATCCTCGCC-3' antisense: 5'-GTCACCGTCTGCATCTTCTG-3'
<u>pGEM-T-ARL6IP</u>	<i>spezifisch für ADP-ribosylation factor like 6 interacting protein</i> sense: 5'-TCTGTGGCTACAGGAAGCTG-3' antisense: 5'-AAGTCTGCTATTA AAAAGCC-3'
<u>pGEM-T-BASP1</u>	<i>spezifisch für Brain Acid Soluble Protein 1</i> sense: 5'-GAGCTCCCACTTAGCTTGCCACATG-3' antisense: 5'-ATTTCAATGCATCCATTGTAC-3'

2.2.3 Serielle Analyse der Genexpression (SAGE)

(modifiziert nach Velculescu *et al.*, 1995)

2.2.3.1 Vorversuche zur SAGE

1) Linkertest

Die in der SAGE verwendeten und selbst hergestellten Linker 1 a/b und 2 a/b wurden auf den prozentualen Grad der Selbstligation geprüft. Dazu wurden jeweils 1 µl (200 ng/µl) des gebildeten Linkers 1 a/b bzw. 2 a/b nach der Zugabe von 14 µl LoTE, 4 µl Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) für 2 h bei 16 °C inkubiert und anschließend mit einem 12 %igen PAGE (s. 2.2.2.7.3) analysiert. Ligierte Linker hatten eine Laufhöhe von 80 bp, nicht ligierte Linker lagen bei 40 bp. Das Verhältnis von ligiertem zu nicht ligiertem Linker wurde mittels der Bandenintensität nach Anfärbung mit SybrGold™ (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA) ermittelt und musste mindestens 70 % betragen.

2) Biotin-Oligo-d(T)-Test

Das 5'-biotinylierte Oligo-d(T)₁₈ wurde auf die Bindungsfähigkeit überprüft, indem steigende Konzentrationen des Oligos mit oder ohne einem 50 µl-Aliquot Dynabeads M-280 (DynaL Biotech, Hamburg) 15 min lang inkubiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und die verbleibende DNA durch photometrische Messung bestimmt. Bei geringen Oligonukleotid-Konzentrationen durfte keine DNA im Überstand durch photometrische Bestimmung nachweisbar sein.

2.2.3.2 mRNA-Präparation

Nach der Präparation der Gesamt-RNA mit TriFast (s. 2.2.2.1) wurde die mRNA durch eine anschließende zweifache Isolation nach den Angaben des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen.

2.2.3.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit der SuperScript II (SSII) (bzw. cDNA-Synthese-Kit Superscript Choice System) (Gibco BRL, Karlsruhe) und einem gelgereinigten 5'-biotinylierten Oligo-(d)T₁₈-Primer (MWG, Ebersberg). Es wurden 5 µg doppelt selektierter poly-(A)⁺-RNA und 2,5 µg biotinylierter Oligo-d(T)₁₈-Primer in einem Volumen von 8 µl bei 70 °C für 10 min erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 4 µl first strand buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix wurde die Probe bei 37 °C für 2 min erwärmt. 5 µl SSII (Endvolumen 20 µl) wurden zu der Probe pipettiert, kräftig gemischt, bei 37 °C für 1 h inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Zweitstrang-Synthese erfolgte durch Zugabe von 93 µl Wasser, 30 µl 5 x second strand buffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E.coli*-DNA-Ligase (10 U/µl), 4 µl *E.coli*-DNA-Polymerase I (10 U/µl) und 1 µl *E.coli* DNA-RNaseH (2 U/µl) in einem Endvolumen von 150 µl. Die Probe wurde sofort kräftig gemischt und bei 16 °C für 2 h inkubiert. Die Probe wurde in dieser Zeit zusätzlich alle 10 min kurz kräftig gemischt. Nach der Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurde die Probe bei 16 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf 200 µl mit LoTE aufgefüllt und nach der PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) eine Ethanol-Fällung durchgeführt (s. 2.2.2.4).

2.2.3.4 Restriktion mit dem Anchoring Enzyme (AE)

10 µl der synthetisierten cDNA (50 % der gesamten cDNA) wurden mit 163 µl LoTE, 2 µl 100 x BSA (New England Biolabs, Frankfurt a. M.), 20 µl Puffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) und 5 µl NlaIII (10 U/µl) (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) vermengt, kräftig gemischt und bei 37 °C für 1,5 h in einem Schüttler inkubiert. Nach der PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) erfolgte die Konzentrierung der DNA über eine Ethanol-Fällung (s. 2.2.2.4).

2.2.3.5 Linker-Ligation an geschnittener cDNA

Der folgende Schritt wurde als Duplikat durchgeführt (Probe 1 und 2). Insgesamt 100 µl Dynabeads M-280 (DynaL Biotech, Hamburg) wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach der Immobilisierung der Beads durch einen Magneten zweimal mit 0,2 ml 1 x B&W (s. 2.1.3) gewaschen. Nach der Zugabe von 0,1 ml 2 x B&W, 90 µl H₂O und 10 µl der verdauten cDNA wurde die Probe bei permanenter Bewegung auf einem Schüttler für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die an die Beads gebundene biotinylierte cDNA viermal mit 0,2 ml 1 x B&W und einmal mit 0,2 ml LoTE gewaschen.

Die Linker-Ligation erfolgte durch Zugabe von 20 µl LoTE, 8 µl 5 x Ligase-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe) und jeweils 10 µl der Linker 1 a/b bzw. Linker 2 a/b (200 ng/µl). Nach der Resuspendierung der Beads und Erhitzen der Probe für 2 min bei 50 °C wurde die Probe für 15 min bei RT inkubiert und nach der Zugabe von 2 µl T4-Ligase (5 U/µl) (Gibco BRL, Karlsruhe) für weitere 2 h bei 16 °C inkubiert.

Herstellung der Linker 1 a/b und 2 a/b

Die Linker 1 a/b und 2 a/b wurden durch Selbstligation von jeweils zwei Oligonukleotide hergestellt.

9 µl Linker X (1 b oder 2 b) (350 ng/µl)

6 µl LoTE

2 µl 10 x Kinase-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe)

2 µl 10 mM ATP (Gibco BRL, Karlsruhe)

1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) (Gibco BRL, Karlsruhe)

Nach der Inkubation bei 37 °C für 30 min wurden jeweils 9 µl des entsprechenden Oligonukleotids (350 ng/µl) (1 a bzw. 2 a) zu der Probe gegeben und bei 95 °C für 2 min, bei 65 °C für 10 min, bei 37 °C für 10 min und bei RT für 20 min inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Sequenzen der verwendeten Linker:

Linker 1A: 5'- *TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG*

Linker 1B: 5'- *tcc cta tta agc cta gtt gta ctg cac cag caa atc c[amino mod. C7]*

Linker 2A: 5'- *TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG*

Linker 2B: 5'- *tcc ccg tac atc gtt aga agc ttg aat tcg agc ag[amino mod. C7]*

2.2.3.6 Restriktion der cDNA mit Tagging Enzyme (TE)

Die Beads wurden viermal mit 0,2 ml 1 x B&W und zweimal mit 0,2 ml Puffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt a .M.) gewaschen, der Überstand entfernt und in 86,2 µl LoTE resuspendiert. Nach der Zugabe von 1,8 µl 100 x BSA (New England Biolabs, Frankfurt a. M.), 10 µl Puffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) und 2 µl des Enzyms BsmFI (2 U/µl) (New England Biolabs, Frankfurt a .M.) wurde die Probe kräftig gemischt, für 1 h bei 65 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Beads mit 50 µl LoTE gewaschen und die beiden Überstände vereint. Nach einer PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) und anschließender Ethanol-Fällung (s. 2.2.2.4) wurde das Präzipitat im Vakuum bei 42 °C getrocknet und in 10 µl LoTE resuspendiert.

2.2.3.7 Bildung der DiTags

Die Blunt-End-Bildung der beiden Proben 1 und 2 erfolgte durch Zugabe von 10 µl 5 x second strand buffer, 1 µl 100 x BSA (New England Biolabs, Frankfurt a.M.), 1 µl 25 mM dNTP-Mix (Gibco BRL, Karlsruhe), 25 µl H₂O und 3 µl Klenow-Enzym (1 U/µl) (Pharmacia Biotech, Freiburg) zu den 10 µl Probe. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 150 µl LoTE zugegeben und nach einer PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) und anschließender Ethanol-Fällung (s. 2.2.2.4) die DNA präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 6 µl LoTE aufgenommen. Die Formierung der DiTags erfolgte durch die Zugabe von 2 µl Probe 1, 2 µl Probe 2, 1,2 µl 5 x Ligase-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe) und 0,8 µl T4-Ligase (5 U/µl) (Gibco BRL, Karlsruhe). Die Probe wurde ÜN bei 16 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 14 µl LoTE wurde die PCR-Amplifikation der DiTags durchgeführt.

2.2.3.8 PCR-Amplifikation der DiTags

Zur Amplifikation der DiTags wurden die Primer 1 und 2 verwendet. Der optimale PCR-Ansatz wurde durch das Testen verschiedener Verdünnungen der DiTags (zwischen 1:20 und 1:1500) experimentell bestimmt. Verwendet wurden Hot Start Tubes (Stratagene, La Jolla, USA) und die PCR Elongase™ (Gibco BRL, Karlsruhe). Die PCR-Produkte wurden mit einem 12 %igen PAGE-Gel und Verwendung der 10 bp-Leiter (s. 2.1.4) auf ihre Qualität überprüft. Für insgesamt 192 PCR-Ansätze wurden zwei Mixe angesetzt:

Der „Reaktionsmix“ bestand pro Reaktion aus:

- 17,5 µl H₂O
- 1 µl Template (in optimaler Verdünnung)
- 0,5 µl Primer 1 (60 µM)
- 0,5 µl Primer 2 (60 µM)
- 0,5 µl dNTP (25 mM) (Gibco BRL, Karlsruhe)

Der „Enzymmix“ bestand pro Reaktion aus:

- 6 µl Elongase Puffer A (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 4 µl Elongase Puffer B (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 19,3 µl H₂O
- 0,7 µl Elongase (Gibco BRL, Karlsruhe)

DNA-Sequenzen der Primer 1 und 2:Primer 1: 5'- gga ttt gct ggt gca gta caPrimer 2: 5'- ctg ctc gaa ttc aag ctt ct

Nach der Überführung von jeweils 20 µl Reaktionsmix wurden die Hot Start™ Tubes für 3 min bei 70 °C im PCR-Cycler inkubiert und anschließend auf 10 °C abgekühlt. Auf die Wachsphase wurden dann jeweils 30 µl Enzymmix gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation der Reaktionsgefäße bei 94 °C wurden insgesamt 28 Zyklen wie folgt gefahren:

94 °C 30 sek

54 °C 60 sek

72 °C 30 sek

2.2.3.9 Isolation der DiTags

Insgesamt zwei Mal 96 PCR-Ansätze wurden auf 16 1,5 ml-Reaktionsgefäße (je 600 µl) aufgeteilt. Nach einer PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) wurden je 330 µl der wässrigen Phase in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von jeweils 100 µl Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 1000 µl EtOH durch eine zehnmünütige Zentrifugation mit 19.400 x g bei 4 °C präzipitiert. Das Präzipitat jedes Reaktionsgefäßes wurde in 15 µl LoTE (26 x 15 µl) resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Die Gelreinigung der DiTags erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Menge an 6 x PAGE-Proben-Puffer (s. 2.1.3) in einem 12 %igen PAGE-Gel (s. 2.2.2.7.3) durch Auftragen von 14 µl je Laufspur. Das Gel wurde anschließend 10 min in einer SybrGold™-Lösung (Verdünnung 1:10.000) (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA) gefärbt. Unter UV-Licht wurden die Banden auf der Laufhöhe von 102 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Jeweils drei Gelstücke wurden in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß vereint. Mit einer 18 G-Nadel wurde in den Boden des Reaktionsgefäßes ein ca. 1 mm großes Loch gestochen, anschließend in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 12.000 x g für 2 min zentrifugiert. Verbleibende Gelstücke wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze in das 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl LoTE je Reaktionsgefäß wurden die Proben ÜN bei 4 °C inkubiert. Zur Verbesserung der Elution der DNA wurden die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert, anschließend der Inhalt in ein SpinX™-Reaktionsgefäß überführt und mit 12.000 x g für 5 min zentrifugiert. Jeweils 300 µl des Eluats wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von jeweils 100 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 940 µl EtOH durch Zentrifugation für 10 min bei 19.400 x g präzipitiert. Nach zweimaligem Waschen mit 75 %igem Ethanol und Trocknung des Präzipitats im Vakuum für 3 min wurden die Proben in jeweils 13 µl LoTE resuspendiert und anschließend in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereint.

2.2.3.10 Restriktion mit NlaIII

Insgesamt 79 µl der isolierten DiTags wurden durch Zugabe von 10 µl NEB Puffer 4, 1 µl 100 x BSA und 10 µl des Enzyms NlaIII (10 U/µl) bei 37 °C für 1 h verdaut. Nach der Zugabe von 100 µl LoTE wurde eine PC8-Extraktion durchgeführt (s. 2.2.2.5) und die DNA durch Zugabe von 67 µl 10 M Ammoniumacetat, 3 µl Glykogen (20 mg/ml) und 733 µl EtOH in einem Trockeneis/Ethanol-Bad für 10 min inkubiert. Nach

der Zentrifugation für 15 min bei 19.400 x g wurde das Präzipitat einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für 3 min im Vakuum getrocknet. Das Präzipitat wurde in 32 µl LoTE resuspendiert.

2.2.3.11 Aufreinigung der verdauten DiTags

Durch eine entsprechende Menge 6 x PAGE-Proben-Puffer (s. 2.1.3) wurden jeweils 9,5 µl der NIaIII-verdauten DiTags pro Laufspur auf ein 12 %iges PAGE-Gel (s. 2.2.2.7.3) aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit einer 1:10.000 SybrGold™-Verdünnung (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA) gefärbt und die 24 bp Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Jeweils zwei Banden wurden in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß, in dessen Boden mit einer 18 G Nadel eine ca. 1 mm großes Loch gestochen worden war, überführt und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt. Nach der Zentrifugation für 2 min bei 13.000 x g wurden jeweils 300 µl LoTE je Reaktionsgefäß zugegeben und die Proben ÜN bei 4 °C inkubiert. Zur besseren Elution wurden die Proben für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend jeweils in ein SpinX™-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g, wurden jeweils 300 µl der Eluate in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 100 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 1.000 µl EtOH durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 19.400 x g gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem EtOH und Trocknen im Vakuum für 3 min wurden die Präzipitate in jeweils 2 µl LoTE resuspendiert und die Reaktionsgefäße mit 1 µl LoTE nochmals gewaschen (insgesamt 9 µl).

2.2.3.12 Konkatemersierung

Zu den 9 µl gepoolten und aufgereinigten DiTags wurden 2,5 µl 5 x Ligase-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe) und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) (Gibco BRL, Karlsruhe) zugegeben und die Probe für 3 h bei 15 °C inkubiert. Danach wurden 1 µl 5 x Ligase-Puffer, 3 µl LoTE und 1 µl T4-Ligase zugegeben und die Probe ÜN bei 15 °C inkubiert. Nach dem Erhitzen der Probe für 15 min bei 65 °C und anschließender Inkubation für 10 min auf Eis wurden 10 µl H₂O und 5 µl 6 x PAGE-Probenpuffer zu der Probe gegeben und die gesamte Probe auf einem 8 %igem PAGE-Gel (s. 2.2.2.7.3) aufgetrennt. Die Konkatemeere formten auf dem Gel auf Grund der unterschiedlichen Größe einen Schmier. In den Bereichen von 0,7 kb bis 1 kb, von 1 kb bis 2 kb und von 2 kb bis 5 kb wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und jeweils in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß, in dessen Boden mit einer 18 G Nadel ein ca. 1 mm großes Loch gestochen worden war, überführt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Nach der Zentrifugation für 2 min bei 12.000 x g wurden jeweils 300 µl LoTE zugegeben und nach einer 15 minütigen Inkubation bei 65 °C jede Probe in ein SpinX™-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g wurden jeweils 300 µl des Eluats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von jeweils 100 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µL Glykogen (20 mg/ml) und 933 µl EtOH durch Zentrifugation für 10 min bei 19.400 x g gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem EtOH und Trocknen der Probe für 3 min im Vakuum wurde das Präzipitat in jeweils 6 µl LoTE resuspendiert.

2.2.3.13 Ligation der Konkatemere in pZero-Vektor und Transformation durch Elektroporation

6 µl der Konkatemere wurden durch Zugabe von 1 µl pZero-Vektor (25 ng/µl) (linearisiert mit SphI), 2 µl 5 x Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) ÜN bei 16 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 190 µl LoTE und einer PC8-Extraktion (s. 2.2.2.5) wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 700 µl EtOH gefällt. Nach viermaligem Waschen des Präzipitats mit 70 %igem EtOH wurde die Probe für 3 min im Vakuum getrocknet und in 8 µl LoTE resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl der Konkatemere in ElectroMAX™-DH10B-Zellen (Life Technologies, Eggenstein) wie folgt transformiert und jeweils 80 µl der Zellsuspension auf Zeocin-Platten ausgestrichen. Die Elektroporation wurde mit dem *E.coli*-Pulser (Bio Rad, München) durchgeführt. Dazu wurden 6,25 ng mit den in pZero-Plasmide ligierten Konkatemeren in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Parallel wurden die DH10B™-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 µl der Zellen wurden vorsichtig mit der Plasmid-DNA vermischt und anschließend in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Kantenlänge von 0,1 cm (Bio Rad, München) überführt. Die Elektroporation wurde dann direkt bei einer Spannung von 2,5 kV, einer elektrischen Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 100 µΩ im *E.coli*-Pulser durchgeführt. Nach einer einminütigen Erholungsphase auf Eis wurde 1 ml 20 °C temperiertes SOC-Medium (2 % (w/v) Pepton; 0,55 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose) auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation der Bakterien für 1 h bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler wurden je 80 µl der Suspension auf Low Salt Medium (1 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1,5 % (w/v) Agarose; 85 mM NaCl) ausplattiert, das 17,5 µg Zeocin/ml Medium enthält. Die Platten wurden dann für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.14 Amplifikation der Konkatemere durch Colony PCR

Die Amplifikation der Konkatemere wurde durch eine PCR mit den Primern SP6 und T7 durchgeführt. Verwendet wurde die PCR Elongase™ (Gibco BRL, Karlsruhe). Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einzelne Kolonien der vorangegangenen Zeocin-Selektion gepickt und in ein Loch einer 96er-Mikrotiterplatte überführt, in dem 25 µl Mastermix vorgelegt waren. Die Amplifikation erfolgte im PCR-Cycler nach einer fünfminütigen Inkubation der Proben bei 95 °C mit insgesamt 30 Zyklen:

95 °C 30 s

55 °C 1 min

72 °C 1 min

„Mastermix“ (je Reaktion)

19,4 µl H₂O

1,5 µl DMSO

0,5 µl Primermix (je 5 µM)

2,5 µl Reaktionspuffer (166 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8, 67 mM MgCl₂,

100 mM β-Mercaptoethanol)

1 µl dNTP-Mix (25 mM)

0,1 µl PCR Elongase™ (5 U/µl).

Konkatemere, die über 700 bp groß waren, wurden über eine Ethanol-Fällung (s. 2.2.2.4) präzipitiert und anschließend sequenziert.

DNA-Sequenzen der Primer SP6 und T7

Sp6: 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.2.3.15 Statistische und bioinformatische Analyse

Nach der Sequenzierung der Tags (s. 2.2.4) wurden die einzelnen Sequenzen zuerst mit Hilfe des Programms SeqMan™ 1.0 (DNA Star, Madison, USA) eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Tag-Identifikation erfolgte mit dem Programm SAGE Analysis Package (Memorec, Köln). Mit Hilfe dieses Programms wurden die entsprechenden 11 bp großen Tags aus den Sequenzen gefiltert. Die einzelnen Tags wurden entsprechend der Auswertung den UniGene-Clustern zugeordnet (Pennartz *et al.*, 2004). Identifizierte Tags wurden zusätzlich in UniGene unter folgenden Kriterien überprüft:

1. Das identifizierte Tag konnte dem angegebenen Gen (UniGene-Cluster) durch Überprüfung der in UniGene publizierten cDNA zugeordnet werden.
2. Das identifizierte Tag lag vor einer NlaIII-Schnittstelle.
3. Die identifizierte NlaIII-Schnittstelle war die letzte in 3'-Richtung in der analysierten cDNA-Sequenz.

Zur statistischen Analyse wurden die entsprechenden Signifikanzen berechnet (Audic und Claverie, 1997). Ein Tag mit einem Wert > 2 wurde als signifikant bewertet. Zur erweiterten Analyse wurden Tags mit einem Wert > 1,3 ebenfalls mit in die weitere Bewertung einbezogen.

Es wurden folgende SAGE-Datenbanken erstellt:

FL: Analyse Free Lattice nach 2 h. Die Datenbank enthält 22.069 Tags.

BL: Analyse Bound Lattice nach 2h. Die Datenbank enthält 22.058 Tags.

ML: Analyse Monolayer. Die Datenbank enthält 10.332 Tags.

FibroSum: Zusammenfassung der Datenbanken FL, BL und ML. Die Datenbank enthält 54.459 Tags.

Zum Vergleich wurden alle Datenbanken auf einen einheitlichen Wert normiert.

2.2.4 DNA-Sequenzierung (modifiziert nach Sanger *et al.*, 1965)

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism®377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer, Boston, USA) durch Fluoreszenzspektroskopie. Die analysierte DNA wurde mit dem ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Boston, USA) nach den Angaben des Herstellers synthetisiert. In einem 250 µl-Reaktionsgefäß wurden 30 – 100 ng PCR-Produkt vorgelegt und nach der Zugabe von 2 µl Primer (SP6 oder T7) (10 µM) und 4 µl Terminator Ready Reaction Mix das Volumen mit H₂O auf 20 µl eingestellt. Der Ansatz wurde kurz kräftig gemischt und anschließend die PCR mit insgesamt 35 Zyklen durchgeführt.

94 °C 30 s

55 °C 20 s

60 °C 4 min

Vor dem Auftragen auf ein 4,25 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel, das 7 M Harnstoff enthielt, wurden die Proben mit 96 %igem Ethanol gefällt, zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 µl Probenpuffer (25 mM EDTA ; 50 mg/ml Dextranblau; 75 % Formamid) aufgenommen. 1,5 µl der Probe wurden für 2 min bei 94 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 12 h bei 55 °C und einer Spannung von 2400 V. Die Sequenz wurde automatisch detektiert. Zur Verbesserung der Qualität wurden die Sequenzen mit dem Programm SeqMan™ 1.0 (DNA Star, Madison, USA) ausgewertet. Die gesetzten Qualitätskriterien entsprachen den Grundeinstellungen des Programms.

2.2.5 PIQOR™ cDNA-Array

Die Konfiguration des PIQOR™ cDNA-Arrays Skin 1.0 umfasste 1376 cDNAs, von denen sechs "house-keeping" Gene waren. Zusätzlich waren vier DNA-Fragmente aus *E.coli* (CR's: *control RNAs*) als Positivkontrollen auf dem Array aufgetragen. Als Negativkontrollen wurden Heringssperma-DNA und Puffer verwendet. Jede cDNA war vierfach auf einem derivatisierten Glasobjektträger aufgetragen, sodass insgesamt 5.504 Spots je PIQOR™ vorhanden waren. Die cDNAs erfüllen folgende Kriterien:

1. Es sind keine repetitiven Elemente (z.B. Alu, B1, MIRs, Mikrosatelliten) enthalten.
2. Die Sequenzhomologie zu allen anderen bekannten cDNAs (öffentliche Datenbanken) ist > 85%.
3. Die Fragmentlänge beträgt 200 bp bis 400 bp.
4. Das ausgewählte Fragment deckt jeweils alle alternativen Spleiß- und Polyadenylierungsvarianten ab.

2.2.5.1 Allgemeines Protokoll des PIQOR™

Zur Bestimmung der Expressionsprofile wurden jeweils 2 µg amplifizierte RNA (aRNA) mit Cyanin-5 (Cy5) und Cyanin-3 (Cy-3) markiert und auf dem PIQOR™-Skin-Array 1.0 (Memorec, Köln) hybridisiert. Die Markierung erfolgte durch reverse Transkription der RNA unter Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide (Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP). Die isolierten RNAs aus dem BL-System wurden grundsätzlich Cy5, die aus dem FL-System mit Cy3 markiert. Die RNA wurde aus den Kollagengelen isoliert (s. 2.2.2.1) und anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.5.2 cDNA-Synthese

Zur Erststrang-Synthese wurden folgende Komponenten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

- 4 µl 5 x First Strand Buffer (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 1 µl 100 µM T7-(T)₂₄ Primer
- 1 µl 10 mM dNTPs

Nach der Zugabe von 2 µg Gesamt-RNA (Endvolumen 20 µl) wurde die Probe kurz gemixt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Probe für 2 min auf 42 °C abgekühlt und nach der Zugabe

von 2 µl SSII-Enzym (400 U) (Gibco BRL, Karlsruhe) kurz kräftig gemischt, für 1 h bei 42 °C inkubiert und anschließend auf Eis gesetzt. Die Zweitstrang-Synthese erfolgte durch die Zugabe von:

- 91,3 µl H₂O (DEPC behandelt)
- 30 µl 5 x Second Strand Buffer (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 4 µl DNA-Polymerase I (40 U) (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 3 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl *E.coli* DNA-Ligase (10 U) (Gibco BRL, Karlsruhe)
- 0,7 µl RNaseH (2 U) (Gibco BRL, Karlsruhe)

Die Probe wurde kurz kräftig gemischt und anschließend für 2 h bei 16 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -20 °C gelagert. Vor der folgenden RNA-Amplifikation erfolgte eine Aufreinigung der Probe mit dem QIAquick Spin Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Probe wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend auf 8 µl im Vakuum bei 42 °C eingengt.

2.2.5.3 mRNA Amplifikation (T7 in vitro Transkription)

Zu den 8 µl Probe wurden folgende Reagenzien in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß gegeben:

- 10 µl NTP Mix (2 µl ATP solution (75 mM), 2 µl GTP solution (75 mM), 2 µl CTP solution (75 mM),
2 µl UTP Solution (75 mM))
- 2 µl 10 x Reaction Buffer (Ambion, USA)
- 2 µl Enzyme Mix (Ambion, USA)

Die Probe wurde kurz kräftig gemischt und dann für 6 h bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte durch eine zweimalige Inkubation der Membran für 4 min mit je 50 µl H₂O und anschließender Zentrifugation. Die OD-Bestimmung erfolgte mit einer 1:50 Verdünnung. Die Probe konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.5.4 Markieren der Proben mit Fluoreszenzfarbstoff

Durch das Markieren der Proben wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte cDNA-Moleküle synthetisiert. Alle Reaktionen fanden aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe unter möglichst lichtarmen Bedingungen statt. Es wurden folgende Komponenten in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt:

- 8 µl 5 x First Strand Buffer
- 2 µl 10 x Hexanucleotide Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 2 µl "low C dNTP" (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 4 mM dCTP)
- 2 µl FluoroLinkTM Cy3/5-dCTP
- 4 µl 0.1 M DTT
- 1 µl RNasin (40 U)

Der Ansatz wurde kräftig gemischt, nach der Zugabe von 2 µg amplifizierter RNA in einem Volumen von 15 µl und der Zugabe von jeweils 2 µl der Kontroll-RNAs 1 und 2 wiederum kurz kräftig gemischt und anschließend bei 65 °C für 5 min inkubiert. Die Probe wurde auf 42 °C abgekühlt und nach der Zugabe von 1 µl (200 U) SSII-Enzym für 30 min unter wiederholtem Mischen der Probe bei 42 °C inkubiert. Der Schritt wurde nach der Zugabe von 1 µl SSII-Enzym bei unveränderten Reaktionsbedingungen wiederholt. Nach der Zugabe von 0,5 µl RNaseH wurde die RNA durch Inkubation für 20 min bei 37 °C hydrolysiert. Die Probe wurde im Anschluss mit dem QIAquick Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers in einem Endvolumen von 30 µl aufgereinigt und unter Vakuum bei 45 °C auf 10 µl eingengt. Nach der Zugabe von 10 µl 2 x Hybridization-Solution (Memorec, Köln), die auf 42 °C vorgewärmt war, wurde die Probe bis zur Weiterverwendung bei RT (bei längeren Zeiträumen bei - 20 °C) im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.5.5 Inkubation der Proben in der PIQOR™-HybChamb

Der PIQOR™ cDNA-Array wurde in einem H₂O-Bad bei 95 °C für 2 min erhitzt, anschließend direkt in ein Bad mit 96 %igem Ethanol überführt und zum Trocknen für 3 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Prähybridisierung erfolgte in der PIQOR™-HybChamb (Memorec, Köln). Dazu wurde die Prähybridisierungslösung für 2 min auf 98 °C erwärmt, anschließend kurz zentrifugiert und auf 42 °C abgekühlt. Der Glasträger wurde in die Kammer eingelegt, nach Auftragen von 20 µl der Prähybridisierungslösung die Kammer luftdicht und lichtundurchlässig verschlossen und bei 62 °C in einem thermalen Cycler (Deckeltemperatur 68 °C) für 30 min inkubiert.

2.2.5.6 Hybridisierung

Die Kammer wurde durch Inkubation für 20 min auf RT abgekühlt. 20 µl der markierten Probe wurden für 2 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf den PIQOR™ cDNA-Array aufgetragen. Die wiederum geschlossene Kammer wurde dann ÜN bei 62 °C in einem thermalen Cycler (Deckeltemperatur 68 °C) inkubiert.

2.2.5.7 Waschen der Arrays

Nach der Hybridisierung wurde der Glasträger aus der Kammer genommen und zweimal mit 50 ml Waschpuffer 1 (Memorec, Köln) und anschließend zweimal mit 50 ml Waschpuffer 2 (Memorec, Köln) jeweils für 5 min bei 50 °C gewaschen. Durch Zentrifugation für 3 min bei 500 x g wurde der Array getrocknet. Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Arrays wurden anschließend mit dem Laser-Scanning-Gerät (ScanArray Lite, Packard Bioscience) eingelesen.

2.2.5.8 Statistische und bioinformatische Auswertung

Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Arrays wurden mit dem ScanArray Lite der Firma Packard Bioscience (Meriden, CT, USA) eingelesen. Zur Erstellung der Expressionsprofile wurden die Signal- und Hintergrundintensitäten für Cy3 und Cy5 unter Verwendung der ImaGene™ Software 5.0 der Firma BioDiscovery bestimmt. Die Hintergrundwerte wurden von den Signalintensitäten subtrahiert und der Quotient aus den Cy5/Cy3-Signalwerten ermittelt. Die Werte wurden anschließend über den Median aller Signalquotienten normiert und die arithmetischen Mittelwerte berechnet. Es wurden nur Werte verwendet,

deren gemessene Intensität mindestens eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5 oder Cy3) nach Subtraktion des Hintergrundes zweifach oder höher (2SS-Werte) über dem entsprechenden Mittelwert der Negativkontrollen (Heringssperma-DNA und Puffer) lag. Die Daten wurden tabellarisch zusammengefasst und wie folgt weiter ausgewertet:

1. Es wurden alle Transkripte ausgewählt, für die es mindestens einen von vier Messwerten gab.
2. Aus dieser Gruppe wurden alle Transkripte ausgewählt, für die es mindestens einen als differentiell eingestuften Messwert gab (für BL ≥ 2 und für FL $\leq 0,5$).
3. Als „differentiell exprimiertes Gen“ wurden aus dieser Gruppe Transkripte eingestuft, die mindestens drei differentielle Messwerte zu einem Zeitpunkt aufzeigten, entweder bei drei verschiedenen Spendern oder bei zwei verschiedenen Spendern und der Poolanalyse. Als signifikant differentiell exprimiert galten nur Transkripte, deren Messwertabweichungen (CV) kleiner als 35 % war.

Für die Analyse der aus der SAGE als differentiell identifizierten Transkripte wurden zusätzlich die unter Punkt 1 beschriebenen Messwerte genauer betrachtet. Transkripte, die den Parametern unter Punkt 2 und 3 nicht entsprachen, wurden als „in Fibroblasten nicht differentiell exprimiert“ bezeichnet.

2.2.6 Semiquantitative PCR

2.2.6.1 Allgemeines Protokoll

Verwendet wurde das QuantiTec™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden). Grundlage für das folgende Protokoll waren die Angaben des Herstellers (Ausgabe August 2003; S. 9-12). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt.

25 μ l 12 x QuantiTec Master Mix
1 μ l Primer A (100 pmol/ μ l)
1 μ l Primer B (100 pmol/ μ l)
3 μ l RNase freies Wasser
20 μ l Template cDNA (50 ng)

Zur genaueren Bestimmung der einzelnen Messwerte wurden jeweils Triplikate angesetzt. Verwendet wurden je 30 μ l „Gesamt-Mastermix“, zu dem 50 ng cDNA in einem Volumen von 20 μ l pipettiert wurden. Als Standard wurde auf Grund der konstanten Expression die S26-Sequenz verwendet (Vincent *et al.*, 1993). Er wurde ebenfalls als Triplikat angesetzt. Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz entsprechend ohne cDNA mit zusätzlich 20 μ l RNase-freiem Wasser.

Zur Aktivierung der HotStartTaq DNA-Polymerase wurden die Proben im ersten Schritt 15 min lang bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde insgesamt vierzigmal der folgende Zyklus wiederholt:

94°C 15 s
55°C 30 s
72°C 15 s

2.2.6.2 Auswertung der Messdaten

Nach der Durchführung der semiquantitativen PCR wurden die jeweiligen Messdaten mit dem Programm GeneAmp 5700 SDS ermittelt. Dazu wurden die Amplifikations-Plots der Messungen als Anzahl der Zyklen gegen den Logarithmus der gemessenen Fluoreszenzintensität graphisch aufgetragen. Es wurde darauf geachtet, dass die gesetzte Auswertungsgrenze in der linearen Phase lag (in der Regel 0,3; interner Wert). Die jeweils erhaltenen Ct-Werte wurden dann zur Ermittlung des relativen Expressionsquotienten wie folgt ausgewertet:

1. Aus den Triplikaten der Ct-Werte der jeweiligen Messungen des Gens und der zugehörigen S26 wurden jeweils die Mittelwerte gebildet. Zusätzlich wurde die statistische Abweichung der Grundgesamtheit der Werte nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma := \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

Dabei ist

- σ die Standardabweichung
- μ der Erwartungswert
- N der Umfang der Grundgesamtheit
- x_i die Merkmalsausprägungen am i -ten Element der Grundgesamtheit

2. Die zu vergleichenden Proben A und B wurden mathematisch auf den geringsten gemessenen Ct-Wert der S26 ($Ct_{S26_{\min}}$) wie folgt normiert. Es wurde die Differenz zwischen $Ct_{S26_{\min}}$ und dem zugehörigen S26-Ct-Wert ($Ct_{S26_{A/B}}$) der Probe A bzw. B gebildet ($Ct_{S26_{A/B}} - Ct_{S26_{\min}} = Ct_{S26_{\text{diff}}}$). Der Wert $Ct_{S26_{\text{diff}}}$ wurde dann von dem zugehörigen Ct-Wert der Probe ($Ct_{A/B}$) abgezogen ($Ct_{A/B} - Ct_{S26_{\text{diff}}} = Ct_{\text{relA/B}}$). Der relative Expressionsquotient (EQ_{rel}) wurde durch Bildung der Betragsdifferenz der beiden normierten Ct-Werte der Proben A (Ct_{relA}) und B (Ct_{relB}) ermittelt und anschließend durch die Exponierung als absoluter Wert berechnet ($EQ_{\text{rel}} = 2^{(|Ct_{\text{relA}} - Ct_{\text{relB}}|)}$). Durch Voranstellen des entsprechenden Summenzeichens (+ oder -) wurde der relative Expressionsquotient aus der Differenz $Ct_{\text{relA}} - Ct_{\text{relB}}$ gebildet. Probe A war grundsätzlich aus BL und Probe B aus FL isolierte und in cDNA umgeschriebene RNA. Dem entsprechend bedeutete ein positiver EQ_{rel} eine höher Expression in BL und ein negativer EQ_{rel} eine höhere Expression in FL.

Sequenzen der verwendeten Primer in der semiquantitativen PCR

Interne Nr.	Genname	Forward-Primer/Reverse-Primer
812	GJA1: gap junction protein, alpha 1, 43kDa (Hs.74471)	Forward: 5'-ATCCAGTGGTACATCTATGG-3' Reverse: 5'-TACCCAGGAGGAGACATAGG-3'
1294	CTGF: connective tissue growth factor (Hs.75511)	Forward: 5'-CCTTGCGAAGCTGACCTGGA-3' Reverse: 5'-TACATCTTCTGTAGTACAG-3'
1296	CYR61: cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (Hs.8867)	Forward: 5'-ACGAGTTACCAATGACAACC-3' Reverse: 5'-CAGGACTGGATCATCATGAC-3'

3636	FOSL2: FOS-like antigen 2 (Hs.301612) Forward: 5'-CTGGAAGAGGACAGCCCCTC-3' Reverse: 5'-GGAGTTCAAGGAGTCTGATG-3'
4091	STAT1: signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (Hs.21486) Forward: 5'-CATCACATTCACATGGGTGG-3' Reverse: 5'-TCAGACACAGAAATCAACTC-3'
0000	S26 Forward: 5'-GCAGCAGTCAGGGACATTCT-3' Reverse: 5'-TTCACATACTTGGGAAGCA-3'

3 Ergebnisse

Mechanische Kräfte spielen in biologischen und pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Auch dermale Fibroblasten sind sensitiv gegenüber Veränderungen von mechanischen Kräften. Sie reagieren auf die Anforderungen der Umgebung, um das dynamische Gleichgewicht (Homöostase) innerhalb eines Gewebes aufrecht zu erhalten. Änderungen der Genexpression (Mudera *et al.*, 2000), der Zellmorphologie, der Aktivität und Anordnung des Zytoskeletts (Ingber, 1997) und der Expression spezifischer EZM-Rezeptoren (Brown *et al.*, 2002) sind nur einige Beispiele für die Auswirkungen mechanischer Kräfte.

Dabei zeigt die Analyse dermalen Fibroblasten in dreidimensionalen Kollagengelen unter der Einwirkung unterschiedlicher mechanischer Kräfte, dass gestresste und nicht gestresste Fibroblasten eine große Zahl an Transkripten differentiell exprimieren und auch die Zellmorphologie in hohem Maße beeinflusst wird. Fibroblasten, die über einen Zeitraum von zwanzig Stunden mechanisch gestresst werden, bilden einen „aktivierten“ Phänotyp aus, der auf Grund der Expression von *alpha smooth muscle actin* und der Ausbildung von Stressfasern dem von Myofibroblasten gleicht. Zusätzlich zeigen sie eine stärkere Expression verschiedener funktioneller Gengruppen aus dem Bereich der Matrixsynthese, des Zytoskeletts, der Proliferation und der fibrogenen Mediatoren. Im Gegensatz dazu zeigen nicht gestresste Fibroblasten eine stärkere Expression von Genen, die verantwortlich für Matrixdegradation, Apoptose und inflammatorische Prozesse sind (Kessler *et al.*, 2001; Kessler, 2002).

Zur Analyse der unterschiedlichen Expression der funktionelle Gengruppen und der Entstehung des „aktivierten“ Phänotyps nach 20 h wurden in dieser Arbeit die Genexpressionsprofile von gestressten und nicht gestressten Fibroblasten in zwei unterschiedlichen Kollagengel-Systemen zu frühen Zeitpunkten in einem Zeitraum von acht Stunden untersucht. Die Zielsetzung war die Identifikation potentieller Faktoren, die die Antwort auf mechanischen Stress und somit den „aktivierten Phänotyp“ initiieren.

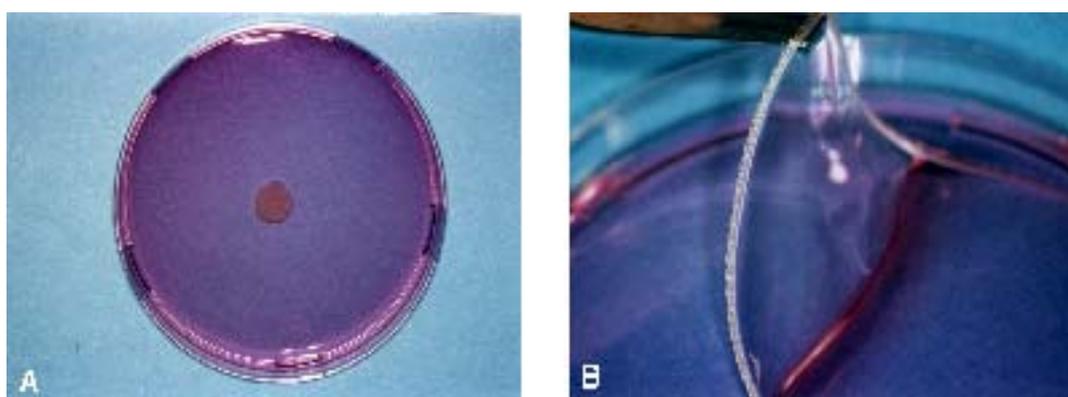


Abb. 3-1 Kollagengele „Free Lattice“ und „Bound Lattice“ nach 20 h Kulturdauer. Zur Herstellung der Kollagengele wurden 3×10^6 Fibroblasten mit bovinem *Kollagen-I* gemischt (Endkonzentration 0,3 mg/ml) und zwanzig Stunden bei 37 °C inkubiert. (A) Free Lattice. Innerhalb von 20 Stunden kontrahieren die Fibroblasten die Kollagen-Matrix zu einer Dermis-ähnlichen Struktur. (B) Bound Lattice. Bei der Gelpräparation wird ein geflochtener Nylonring an die Innenseite der unbeschichteten Kulturschale gelegt. Die Kollagenmatrix haftet an diesem Ring an – die Gelkontraktion wird inhibiert, und die Fibroblasten werden einem mechanischen Stress ausgesetzt (Abb. aus Dethlefsen, 1998).

Die beiden Kollagengelsysteme werden als Free Lattice (FL) und Bound Lattice (BL) bezeichnet (Abb. 3-1). In dem FL-System adhären die Fibroblasten zunächst an Kollagenfibrillen. Das lose Netzwerk wird mit zunehmender Dauer zu einer immer dichter werdenden Matrix kontrahiert (Bell *et al.*, 1979; Mauch *et al.*, 1989). In PolyHEMATM-beschichteten Kulturschalen haften die Gele nicht am Boden an und sind frei im Medium beweglich. Da kein äußerer Widerstand vorhanden ist, erfolgt die Kontraktion unter Abnahme des Geldurchmessers bei isotonischer mechanischer Spannung. Etwa zwei Stunden nach der Gelpräparation nimmt die Gelfläche kontinuierlich ab. Der Prozess ist makroskopisch nach etwa zwanzig Stunden abgeschlossen. Das kontrahierte Gel bildet dann eine kleine opake Scheibe, deren Fläche ca. zwei Prozent des Ausgangswertes angenommen hat (Abb. 3-2 A). Dabei ist die Kontraktion proportional zur Zellzahl und umgekehrt proportional zur Kollagenkonzentration (Bell *et al.*, 1979).

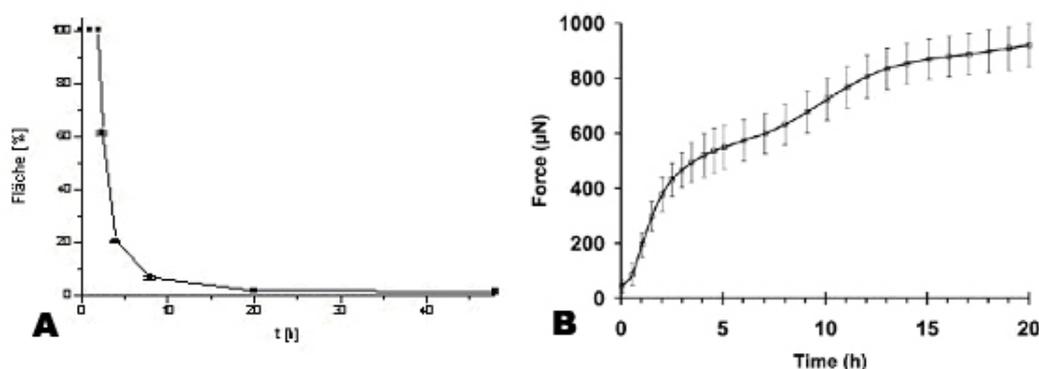


Abb. 3-2 Kontraktion der Kollagengelfläche und entstehende interne Kräfte. (A) Prozentuale Abnahme der Fläche in Abhängigkeit von der Zeit ($n = 5$; 100 % entspricht der Fläche der verwendeten Kulturschale; Kollagenkonzentration 0,3 mg/ml, 2×10^5 Zellen/ml). (B) Fibroblasten wurden in einem dreidimensionalen Kollagengel ausgesät ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml; 1,75 mg Kollagen I/ml). Entstehende Kräfte wurden mit einem Force Transducer gemessen. Messwerte und Standardabweichung wurden aus zwei unabhängigen Experimenten errechnet. Jeder Messwert wurde viermal mit primären humanen Fibroblasten zweier gesunder Individuen bestimmt (Kessler *et al.*, 2001).

Im BL-System wird ein geflochtener Nylonring an die innere Peripherie der Kulturschale gelegt, sodass die Kollagenmoleküle an dem Ring haften und die Kontraktion des Gels inhibiert wird. Der Geldurchmesser bleibt unter isometrischen Bedingungen unverändert. Obwohl innerhalb der ersten zwei Stunden keine morphologischen Veränderungen der Fibroblasten oder eine Reduktion der Gelgröße zu erkennen sind, kann durch Messungen an einzelnen Zellen der interne Kräftezuwachs belegt werden (Kessler *et al.*, 2001). Die gestressten Fibroblasten erkennen die physikalischen Bedingungen und bauen eine erhöhte interne Kraft über das Zytoskelett auf (Abb. 3-2 B).

Da die Kenntnisse über differentiell regulierte Transkripte in Kollagengelen zu frühen Zeitpunkten bei primären Hautfibroblasten lückenhaft sind, ist der Einsatz eines Systems zur Analyse der Genexpression sinnvoll, das eine große Anzahl an Transkripten erfasst und hoch sensitiv ist. Geeignete Techniken sind die vergleichende EST- (Expressed Sequence Tag-) Sequenzierung (Adams *et al.*, 1991), das Differential Display (Liang *et al.*, 1995; Liang and Pardee, 1998; Liang *et al.*, 1994), die cDNA- und Oligonukleotid-

Chip-Technologie (Skena *et al.*, 1995), sowie die Serielle Analyse der Genexpression (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden die SAGE und cDNA-Arrays kombiniert eingesetzt. Die SAGE eignet sich zur Analyse der Genexpressionsprofile besonders, da neben der Identifikation bekannter Transkripte auch unbekannte Transkripte detektiert werden können (Velculescu *et al.*, 1995). Als Zeitpunkt der SAGE wurde der 2 h-Wert ausgewählt, da bis dahin die Kollagengele noch nicht kontrahieren, aber intrazellulär schon Zugkräfte aufbauen (Abb. 3-2). Die durch die SAGE als differentiell exprimiert identifizierten Transkripte wurden dann mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie in einem Zeitexpressionsprofil (1 h – 8 h) und an fünf unterschiedlichen Spendern in den beiden Kollagengel-Systemen verifiziert.

Erweitert wurde die Analyse der beiden Kollagengel-Systeme durch die Erstellung von Zeitexpressionsprofilen bei fünf unterschiedlichen Spendern (ebenfalls im Zeitraum von 1 h – 8 h) unter Verwendung des PIQOR™ cDNA-Arrays Skin 1.0. Dieser Array enthält mehr als 1300 Transkripte aus den Bereichen Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktion, extrazellulärer Matrix u. a., die in der humanen Haut allgemein von Bedeutung sind.

3.1 Serielle Analyse der Genexpression (SAGE)

Die **Serielle Analyse der Genexpression (SAGE)** ist eine Methode zur Analyse von mRNA-Expressionsprofilen (Velculescu *et al.*, 1995) und beruht auf dem Prinzip der EST-Sequenzierung (Adams *et al.*, 1991). In der SAGE wird das Prinzip der „Unique Sequence“ angewendet, die als kleinste Anzahl einer Basenfolge definiert ist, die eine statistisch eindeutige Identifizierung eines Transkriptes erlaubt. Für das humane Genom, das für 30.000 - 100.000 unterschiedliche Transkripte codiert (Fields *et al.*, 1994) ist eine Sequenz von 9 bp (Tag) ausreichend, um jedes Transkript einer Zelle statistisch eindeutig zu erfassen. Für ein 9 bp langes Tag existieren über 260.000 (4^9) mögliche Sequenzen, sodass die statistische Wahrscheinlichkeit, dass zwei unterschiedliche Transkripte dieselbe 9 bp große Tagsequenz besitzen, gegen null geht. Die Wahrscheinlichkeit verringert sich drastisch mit der Erhöhung der Basenzahl der Tags (Saha *et al.*, 2002). Die Bildung von Konkatemeren durch Ligation der Tags ermöglicht dann die Analyse von bis zu 40 Transkripten durch eine einzelne Sequenzierung. Da die Häufigkeit, mit der ein Tag sequenziert wird, direkt proportional zur Anzahl der vorliegenden Transkripte ist, erhält man ein serielles quantitatives Expressionsprofil. Der Vorteil im Vergleich zur EST-Sequenzierung liegt in der erhöhten Anzahl der identifizierten Transkripte pro Sequenzierung, die bei der SAGE bis zu 40 Transkripte (Tags) pro Sequenzierung erreichen kann.

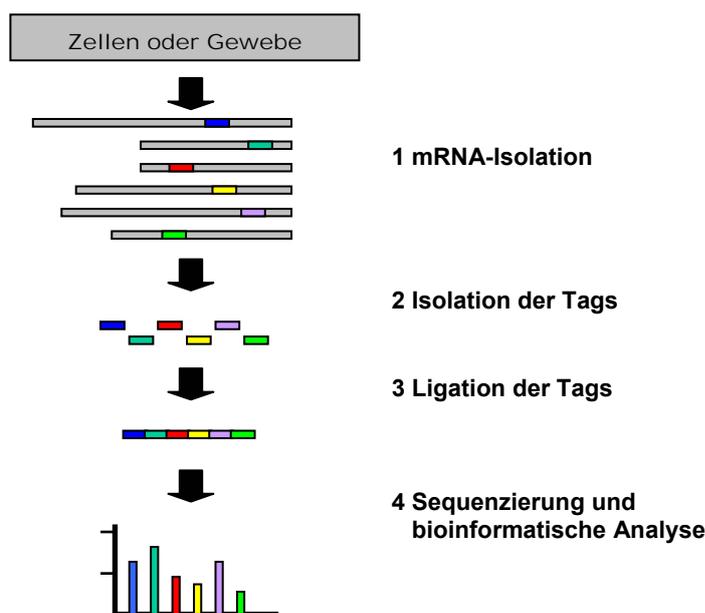


Abb. 3-3 Schematische Darstellung der Seriellen Analyse der Genexpression (SAGE). (1) Aus Zellen oder Gewebe wird mRNA isoliert und über eine Transkription in cDNA umgeschrieben. (2) Aus den cDNA-Molekülen werden dann kurze definierte Bereiche von 15 bp (Tags) ausgeschnitten, die (3) zu Konkatemeren ligiert werden. Nach der Transformation in einen Vektor werden (4) die Inserts amplifiziert, sequenziert und bioinformatisch ausgewertet. Die kurzen Sequenzen der Tags ermöglichen die Identifizierung der Transkripte durch Datenbanken wie UniGene.

Zur Beschreibung und Identifikation potentieller Faktoren wurde die SAGE von Fibroblasten in den beiden Kollagensystemen nach 2 h durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt sind unterschiedlich starke interne Kräfte in den beiden Gelsystemen aufgebaut worden, ohne dass die Kontraktion eingesetzt hat (Abb. 3-2 A und B).

Differentiell exprimierte Transkripte sollten auf die unterschiedliche mechanische Situation zurückzuführen und für die frühe Antwort auf mechanischen Stress verantwortlich sein.

Für die Analyse der Genexpressionsprofile wurden primäre humane Hautfibroblasten (hPDF) eingesetzt. Die SAGE wurde für die als Monolayer (ML) kultivierten hPDF und für die beiden Kollagengeltypen FL und BL durchgeführt. Der Monolayer wurde zeitgleich mit den Zellen für die Kollagengele geerntet und die Gesamt-RNA direkt über Trizol aufgereinigt. Die Kollagengele FL und BL wurden nach 2 h geerntet. Je 16 Gele wurden für FL und BL hergestellt. Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde die mRNA isoliert und zum Erreichen eines höheren Reinheitsgrades ein zweites Mal gereinigt. Jeweils 5 µg mRNA wurden dann für die Erstellung der drei SAGE-Datenbanken ML, FL und BL eingesetzt. Im Anschluss erfolgte eine Verifizierung der Ergebnisse mittels einer cDNA-Array-Analyse bei fünf verschiedenen Spendern, zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten und eine zusätzliche Validierung ausgesuchter Gene mittels Northernblot-Analyse.

3.1.1 Experimentelle Ergebnisse der SAGE

Im Folgenden werden die rein experimentellen Ergebnisse der Analyse von FL stellvertretend für die drei durchgeführten SAGE (FL, BL und ML) kurz dargestellt, da im Wesentlichen alle drei Analysen die gleichen Ergebnisse hervorbrachten.

Nach der Isolation einzelner Tags aus der isolierten mRNA, wurden diese zu Paaren (DiTags) ligiert, um eine PCR mittels der an die Tags ligierten Linker zu ermöglichen. Die im Anschluß über PCR amplifizierten DiTags wurden nach der Reinigung über ein 12 %iges Polyacrylamidgel (PAGE) aufgetrennt (Abb. 3-4 A). Die 24 bp großen DiTags wurden isoliert und die Konkatemere durch Ligation gebildet.

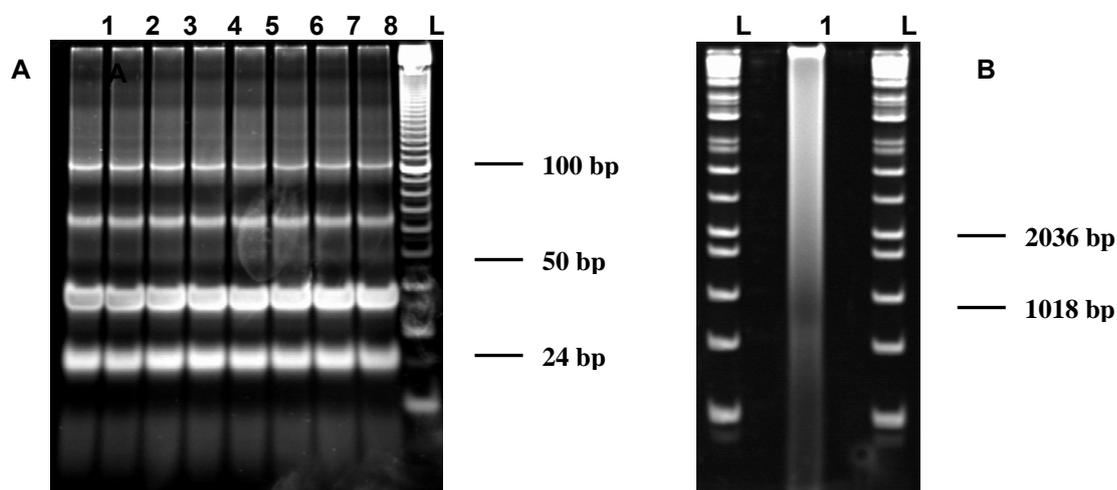


Abb. 3-4 (A und B) Elektrophoretische Auftrennung der (A) 24 bp DiTags (FL) und der (B) Konkatemere (FL) durch PAGE. (A) Nach der Amplifikation der DiTags über PCR wurden die Moleküle erneut mit NlaIII verdaut und die beidseitigen Linker entfernt. Über PAGE wurden die DiTags aufgetrennt und nach der Isolation zu Konkatemeren ligiert (**1-9** „Verdau“ der DiTags der SAGE-Bank FL auf mehrere Lanes aufgetragen; **L** 10 bp Leiter). **(B)** Die Auftrennung der Konkatemere erfolgte ebenfalls über PAGE. Die unterschiedlich langen Konkatemere bilden auf dem Gel einen Schmier (**1** Konkatemere FL; **L** kb-Leiter).

Nach der Auftrennung der Konkatemere über PAGE (Abb. 3-4 B) wurden die DNA-Fragmente in den Bereichen 0,7 kb bis 1 kb, 1 kb bis 2 kb sowie zwischen 2 kb bis 5 kb ausgeschnitten und nach der Isolation in den pZero-Vektor kloniert. Die in ElektroMAX® DH10B™ transformierten Vektoren wurden über eine Colony-PCR amplifiziert und über ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3-5). Fragmente über 700 bp wurden isoliert und sequenziert.

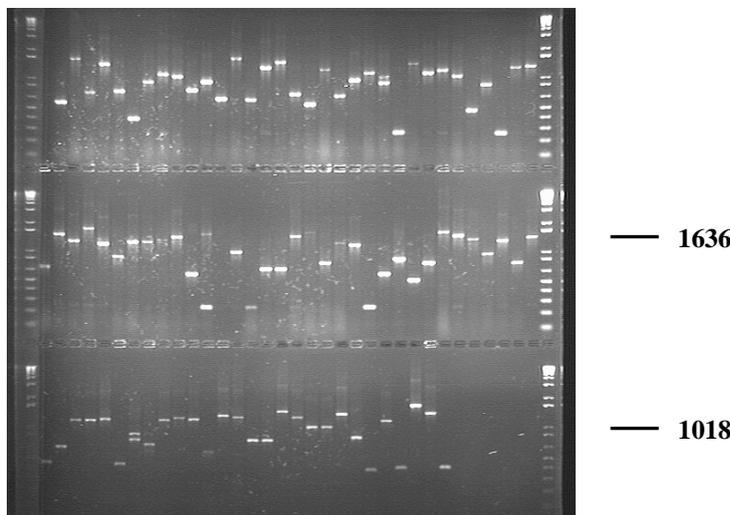


Abb. 3-5 Elektrophoretische Auftrennung der Konkatemere einer 96er Colony-PCR (FL). Nach der Ligation der Konkatemere in den pZero-Vektor und der Transformation in ElektroMAX® DH10B™-Bakterien, wurden einzelne Kolonien gepickt und über Colony-PCR (cPCR) amplifiziert. 96 Amplifikate wurden zur Kontrolle mit einem 1%igem Agarosegel analysiert. Amplifikate, die eine Größe über 700 bp hatten, wurden nach der Aufreinigung sequenziert.

3.1.2 Allgemeine statistische Ergebnisse der SAGE

Nach der Sequenzierung der Konkatemere wurden die Sequenzdaten mit dem Programm SeqMan 1.0™ analysiert und Bereiche, die nicht den gesetzten Qualitätsnormen entsprachen (s. 2.2.3.15) und eventuell fehlerhafte Basen anzeigen von der Analyse ausgeschlossen. Zur Identifikation der einzelnen Tags wurden die Sequenzen mit dem Programm SAGE Analysis Package (Memorec, Köln) ausgewertet (Abb. 3-6).

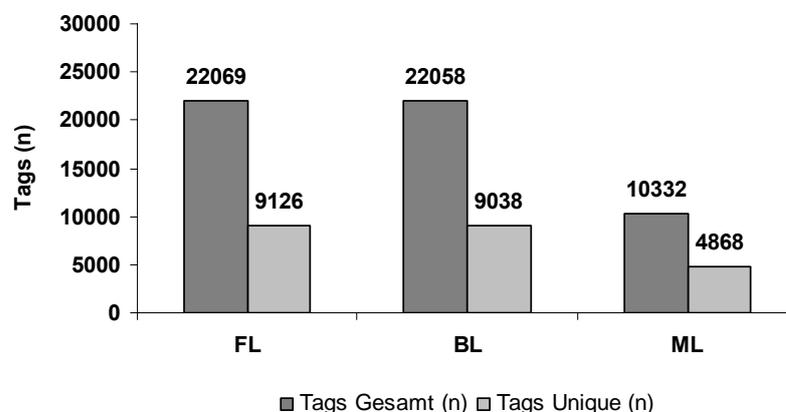


Abb. 3-6 Statistische Auswertung der erstellten SAGE-Datenbanken FL, BL und ML. Für die drei SAGE-Datenbanken wurden insgesamt 54.459 Tags erstellt. Für FL wurden 22.069 Tags sequenziert und 9.126 unterschiedliche Tags identifiziert. Für BL wurden 22.058 Tags sequenziert und 9.038 unterschiedliche Tags identifiziert. ML enthielt insgesamt 10.332 Tags, davon waren 4.868 Tags unterschiedlich.

Die Darstellung der Anzahl der Gesamttags zur Anzahl der unique identifizierten Tags als Funktion gibt Aufschluss darüber, ob der Sättigungsbereich erreicht ist. Als Sättigung wird die Gesamtanzahl aller unterschiedlicher Transkripte in einer Zelle definiert. Da die Funktion einer Sättigungskurve entspricht, gibt die Extrapolation der Kurve den gesättigten bzw. angenäherten Maximalwert der Funktion an. Der Maximalwert entspricht dann der Gesamtanzahl der exprimierten Transkripte im Transkriptom. Allerdings weisen mehrere Publikationen auf den sehr hohen Fehlerquotienten hin, der sich aus dieser Analyse ergibt (Man *et al.*, 2000; Stollberg *et al.*, 2000; Colinge und Feger, 2001; Stern *et al.*, 2003). Der aus der Extrapolation erhaltene Wert ist also äußerst kritisch zu betrachten und wurde aus diesem Grund nicht ermittelt. Allerdings zeigt die Analyse der drei SAGE-Datenbanken FL, BL und ML, dass die Sättigung nicht erreicht worden ist (Abb 3-7 A-C).

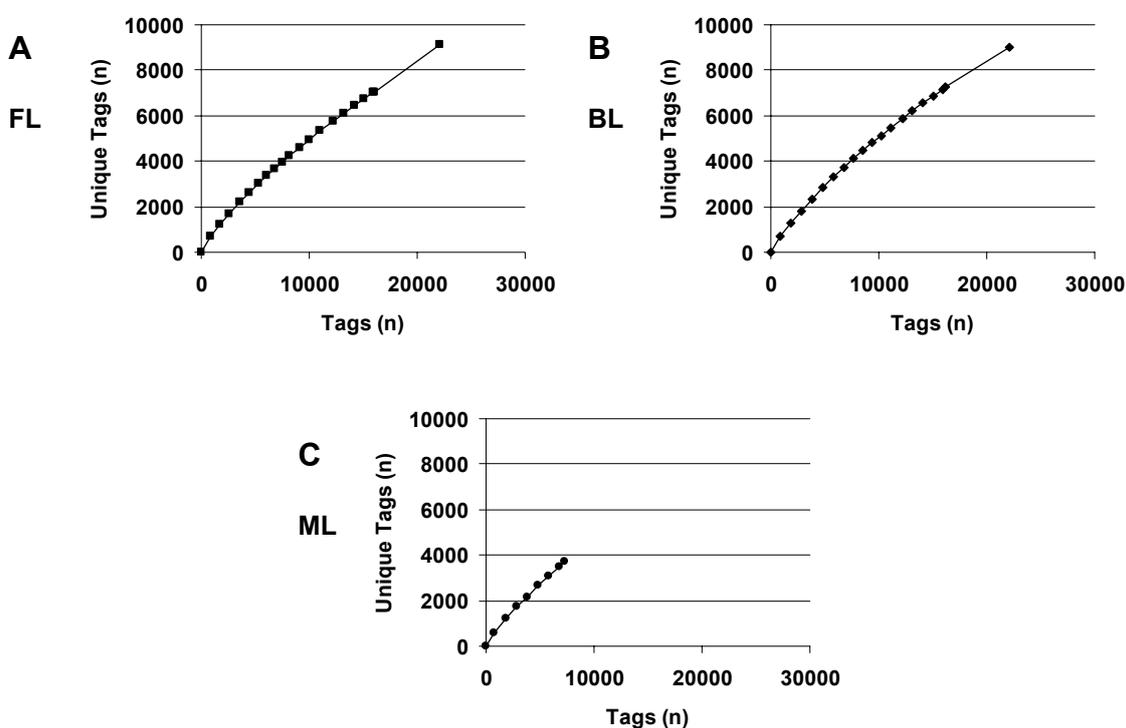


Abb. 3-7 (A bis C) Anzahl der unique identifizierten Transkripte pro Tag in der SAGE für FL, BL und ML. Trägt man die Anzahl der sequenzierten Tags gegenüber der Anzahl der einmalig identifizierten Tags für eine Datenbank auf, erhält man eine Funktion in Form einer Sättigungskurve. Die Funktion gibt Aufschluss darüber, ob der Grad der Sättigung erreicht ist (A FL, B BL, C ML).

3.1.3 Expressionsprofil primärer Fibroblasten im Monolayer

Die SAGE bietet den Vorteil, nicht nur einen relativen Vergleich der differentiellen Expression messen zu können, sondern erlaubt auch die Darstellung der einzelnen SAGE-Datenbanken als Expressionsprofil. Die Zahl der einzelnen Tags innerhalb eines Transkriptoms kann in Form einer Rangliste dargestellt werden. Das Expressionsprofil gibt qualitative und quantitative Einblicke in die biologische Aktivität der Fibroblasten (Tab. 3-1).

Nr.	TAG	TAG (n)	UniGene Nr.	UniGene Name
1	ACCAAAAACCA	210	Hs.172928	collagen, type I, alpha 1
2	GGAAATGTCAA	140	Hs.111301	matrix metalloproteinase 2
3	TTGGGGTTTCC	117	Hs.62954	ferritin, heavy polypeptide 1
4	TGGAAATGACC	100	Hs.172928	collagen, type I, alpha 1
5	TTTGGTTTCC	94	Hs.179573	collagen, type I, alpha 2
6	GATGAGGAGAC	87	Hs.179573	collagen, type I, alpha 2
7	ATGTGAAGAGT	70	Hs.111779	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
8	ATCTTGTTACT	64	Hs.287820	fibronectin 1
9	CCCTGGGTTCT	63	Hs.111334	ferritin, light polypeptide
10	TGTGTTGAGAG	61	Hs.181165	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
11	GTTGTGGTTAA	60	Hs.75415	beta-2-microglobulin
12	GCCCCAATAA	43	Hs.227751	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)
13	TTGCTGACTTT	36	Hs.108885	collagen, type VI, alpha 1
14	TTGGTGAAGGA	34	Hs.356629	thymosin, beta 4, X chromosome, clone MGC:22726 IMAGE:4095465
15	GTGCTGAATGG	30	Hs.77385	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
16	TGCAGTCACTG	30	Hs.367639	hypothetical protein FLJ20032
17	GTGTGTTTGTA	29	Hs.118787	transforming growth factor, beta-induced, 68kD
18	CTAGCCTCACG	28	Hs.14376	actin, gamma 1
19	GGGAAATCGC	28	Hs.76293	thymosin, beta 10
20	AGGTCTTCAAT	26	Hs.87409	thrombospondin 1

Tab. 3-1 Expressionsprofil Monolayer - Top 20. Dargestellt sind die 20 häufigsten identifizierten Tags mit einer eindeutigen Annotation in UniGene. Die Liste der Tags wurde von mitochondrialen Tags, Alu repeats, Sage Linkern und Tags, die für mehrere Gene annotieren, bereinigt.

Um eine Einsicht in das Expressionsverhalten der hPDF zu erhalten, wurden die 100 meist exprimierten Tags von ML in Gruppen eingeteilt (Tab. 3-2). Für die ersten 100 unterschiedlichen Transkripte wurden insgesamt 2.616 Tags gezählt. Ribosomalen Proteine und Komponenten der EZM stellen mit 53 unterschiedlichen Tags und fast 60 % der exprimierten Tags die beiden größten Gruppen in ML dar. Wird der prozentuale Anteil der Tags einer Gruppe an der Gesamtsumme gemessen, werden Gene der EZM am stärksten exprimiert. *Kollagen Typ I alpha 1* und *alpha 2* sowie *Fibronectin 1* sind Beispiele typischer Matrixkomponenten dermalen Fibroblasten.

Die dritte Gruppe beinhaltet Transkripte, die für Bestandteile des Zytoskeletts codieren. Auch hier äußert sich die biologische Funktion dermalen Fibroblasten in Form des Expressionsprofils. Die von den Fibroblasten entwickelten mechanischen Kräfte werden mit Hilfe des Zytoskeletts produziert und weitergeleitet (Chiquet *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2004). Daraus erklärt sich, dass Transkripte wie *myosin*

light polypeptide 6 (alkali, smooth muscle and non-muscle), *actin gamma 1* und *actin related protein 2/3 comple, subunit 2 (34 kD)* unter den stark exprimierten Transkripten zu finden sind. Auch die Gruppen der Rezeptoren mit den *Integrinen $\beta 1$* (Tian *et al.*, 2002) und *αV* (Gloe *et al.*, 2002) und der Wachstumsfaktoren mit *connective tissue growth factor* (Zhang *et al.*, 2004) zeigen die Expression fibroblastentypischer Transkripte im Monolayer auf. Die komplette Liste der 100 stärksten exprimierten unigenen Tags befindet sich im Anhang (s. 6.3).

Nr.	Kategorie	UT (n)	Tags (n)	Tags (%)
1	Ribosomal	36	608	23,24
2	EZM	17	951	36,35
3	Zytoskelett	9	179	6,84
4	Elongation/Proteine	9	168	6,42
5	Keine Kategorie	9	189	7,22
6	unbekannt	6	90	3,44
7	Metabolismus	5	225	8,60
8	Rezeptor	5	113	4,32
9	Wachstumsfaktor	4	93	3,56
Summe		100	2616	100

Tab. 3-2 Funktionelle Gruppen der 100 stärksten unigenen exprimierten Tags des Monolayers. Die ersten 100 unterschiedlichen Tags wurden in neun Kategorien eingeteilt und absteigend nach der Anzahl der unterschiedlichen unigenen Tags (UT) geordnet. Zur genaueren Interpretation wurde die Summe der Tags einer Kategorie als absolute Zahl [Tags (n)] und als prozentualer Wert der Gesamtsumme der Tags [Tags (%)] berechnet. Alu repeats, mitochondriale Tags und Tags ohne Annotation wurden nicht berücksichtigt. Tags, die für den gleichen UniGene-Cluster annotierten, wurden als unterschiedliche Tags behandelt.

3.1.4 Vergleich der Expressionsprofile der SAGE Free Lattice gegen Bound Lattice

Zur Analyse der differentiellen Expression der beiden Kollagengelsysteme BL und FL wurden die beiden erstellten SAGE-Datenbanken auf die Zahl von 20.000 Tags normiert und anschließend verglichen. Insgesamt acht Transkripte zeigten eine signifikante differentielle Expression, sowohl in Form des relativen Expressionsquotienten (> 2) als auch in der berechneten Signifikanz (> 2). Davon waren die beiden Transkripte *Cytochrome P450* und *Aldose Reductase* in BL und die sechs Transkripte *Endothelial Differentiation-related Factor 1*, *Interferon induced Transmembrane Protein 3*, *Collagen Type XII (alpha 1)*, *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A*, *Myosin Light Polypeptide 9 (regulatory)* und *15 kDa Selenoprotein* in FL stärker exprimiert (Tab. 3-3).

Nr.	FL	BL	Ratio	S	UniGene-Name
Bound Lattice					
1	4	24	6	4,0	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1
2	0	7	14	2,1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)
Free Lattice					
3	11	0	-22	3,3	endothelial differentiation-related factor 1
4	20	4	-5	3,0	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
5	23	7	-3,3	2,5	collagen, type XII, alpha 1
6	10	1	-10	2,2	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
7	45	23	-2	2,1	myosin, light polypeptide 9, regulatory
8	7	0	-14	2,1	15 kDa selenoprotein

Tab. 3-3 SAGE – differentiell exprimierte Transkripte in FL und BL nach 2 h. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der SAGE-Datenbanken für FL und BL nach 2 h. Dargestellt sind die Gene, die einen relativen Expressionsquotienten > 2 (**Ratio**) und eine Signifikanz > 2 (**S**) zeigten (Signifikanz berechnet nach Audic und Claverie (1997)). Die Werte für BL und FL geben die Anzahl der Tags nach der Normierung (20.000) wieder.

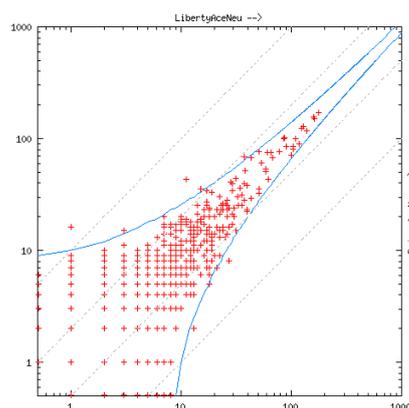
Das Kollagengelsystem ist ein dynamisches System, das erst nach mehreren Stunden in ein stabiles Gleichgewicht gelangt (Kessler *et al.*, 2001). Da in dem Experiment nur der 2 h-Zeitpunkt analysiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass Transkripte, die keinen eindeutigen relativen differentiellen Expressionsquotienten aufzeigen (< 2) zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt in den Kollagengelen einen höheren Quotienten (> 2) besitzen. Ebenfalls müssen experimentelle Abweichungen berücksichtigt werden, die sich aus drei Bereichen zusammensetzten.

1. Varianz der SAGE
2. Varianz des Zellkultursystems
3. Varianz des Spenders

Aus diesem Grund wurden auch Transkripte in die weitere Analyse mit einbezogen, die einen relativen Expressionsquotienten kleiner als 2 aufweisen. Zusätzlich ist die Gesamttagzahl einer Bank maßgeblich für die Anzahl und die Signifikanz der als differentiell detektierten Transkripte (Audic und Claverie, 1997). Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass potentiell differentiell exprimierte Transkripte nicht eindeutig signifikant und somit grenzwertig sind. Deshalb wurden auch Transkripte bis zu einer Signifikanz $\geq 1,3$ mit in die weiteren Analysen einbezogen. Der Scatterplot (Abb. 3-8) ist eine Form der graphischen Darstellung der differentiellen Expression, die die Problematik der grenzwertig liegenden Transkripte verdeutlicht. Die

Tagzahlen der jeweiligen Datenbank FL (LibertyAceNeu) und BL (PrisonAceNeu) wurden nach der Normierung (Tag (n) = 20.000) logarhythmisch gegeneinander aufgetragen.

Abb. 3-8 Scatterplot FL gegen BL. Zur graphischen Darstellung der differentiellen Expression wurden die Tagzahlen der Datenbanken FL (LibertyAceNeu) und BL (PrisonAceNeu) nach der Normierung (n = 20.000) logarhythmisch gegeneinander aufgetragen. Die beiden Linien grenzen den nicht signifikanten Bereich ab. Werte, die sich links oder rechts dieser Region befinden, haben einen Wert von 2 oder größer 2 und gelten als statistisch signifikant (nach Audic und Claverie, 1997).



Eine große Anzahl an Transkripten befindet sich innerhalb der von den beiden Linien begrenzten Region. Transkripte in dieser Region können zwar gemäß dem gebildeten relativen Quotienten eine differentielle Expression aufzeigen, auf Grund der zu geringen Tagzahlen sind diese aber nicht statistisch signifikant.

Nr	FL	BL	Ratio	S	UniGene-Name
1	23	43	1,9	1,9	laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)
2	0	6	12	1,8	hypothetical protein PRO1855
3	0	6	12	1,8	hypothetical protein BC007384
4	0	6	12	1,8	glutathione-S-transferase like; glutathione transferase omega
5	1	8	8	1,7	sterol carrier protein 2
6	1	8	8	1,7	Homo sapiens, clone IMAGE:4154219, mRNA, partial cds
7	1	8	8	1,7	hypothetical protein MGC10433
8	3	12	4	1,7	molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide
9	2	10	5	1,6	CD59 antigen p18-20
10	2	10	5	1,6	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)
11	0	5	10	1,5	TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein
12	0	5	10	1,5	KIAA1728 protein
13	0	5	10	1,5	chromosome 21 open reading frame 4
14	0	5	10	1,5	MSTP031 protein
15	0	5	10	1,5	spinocerebellar ataxia 7
16	1	7	7	1,4	vitamin A responsive; cytoskeleton related
17	1	7	7	1,4	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide
18	1	7	7	1,4	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
19	1	7	7	1,4	TPA regulated locus
20	2	9	4,5	1,4	CGI-97 protein
21	2	9	4,5	1,4	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
22	12	24	2	1,3	annexin A5
23	12	24	2	1,3	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
24	4	12	3	1,3	FK506 binding protein 9 (63 kD)
25	4	12	3	1,3	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)

Tab. 3-4 Differentiell exprimierte Transkripte nach 2 h in BL. Auf Grund der Dynamik des Systems wurden neben den deutlich signifikanten Transkripten auch Gene mit einer Signifikanz $\geq 1,3$ zur Analyse ausgewählt. Die Liste zeigt die ausgewählten Transkripte auf, die in BL nach 2 h höher exprimiert waren. Die Transkripte sind absteigend nach der berechneten Signifikanz (S) geordnet und wie der relative Expressionsquotient (Ratio) auf eine Stelle hinter dem Komma gerundet. Die Tagwerte für FL und BL sind auf natürliche Zahlen gerundet (Signifikanz berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Neben den acht identifizierten „Top“-Kandidaten wurden weitere 57 Transkripte zur Analyse in einem Zeitexpressionsprofil ausgewählt, 25 Transkripte die in BL (Tab. 3-4) und 32 Transkripte die in FL (Tab. 3-5) stärker exprimiert waren. Dermale Fibroblasten von fünf Spendern wurden dazu in den beiden Kollagensystemen BL und FL zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h und 8 h kultiviert. Die RNA wurde dann mittels der cDNA-Array Technologie in Form des PIQOR™ Skin 1.0 analysiert. Die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h und 8 h wurden als Pool der fünf Spender untersucht. Zur erweiterten Analyse wurden die ersten drei Zeitpunkte 1 h, 2 h und 4 h zusätzlich als Einzelspender getrennt analysiert.

Nr	FL	BL	Ratio	S	UniGene-Name
26	18	6	-3	1,8	6.2 kd protein
27	6	0	-12	1,8	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
28	6	0	-12	1,8	ubiquitously-expressed transcript
29	6	0	-12	1,8	spondin 2, extracellular matrix protein
30	6	0	-12	1,8	dynein light chain 2A
31	6	0	-12	1,8	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein
32	14	4	-3,5	1,7	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
33	22	9	-2,4	1,7	milk fat globule-EGF factor 8 protein
34	8	1	-8	1,7	predicted osteoblast protein
35	10	2	-5	1,6	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
36	17	6	-2,8	1,6	lysyl oxidase-like 2
37	18	7	-2,6	1,5	brain abundant, membrane attached signal protein 1
38	21	9	-2,3	1,5	sequestosome 1
39	5	0	-10	1,5	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)
40	5	0	-10	1,5	synaptophysin-like protein
41	5	0	-10	1,5	KIAA1538 protein
42	5	0	-10	1,5	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like
43	5	0	-10	1,5	golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)
44	5	0	-10	1,5	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586P1622)
45	5	0	-10	1,5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
46	5	0	-10	1,5	Ets2 repressor factor
47	5	0	-10	1,5	Homo sapiens cDNA: FLJ21367 fis, clone COL03051
48	5	0	-10	1,5	KIAA1001 protein
49	5	0	-10	1,5	thioredoxin 2
50	5	0	-10	1,5	cellular retinoic acid binding protein 2
51	5	0	-10	1,5	chromosome 20 open reading frame 24
52	5	0	-10	1,5	ESTs, Weakly similar to A42442 integrin beta-1 chain, splice form beta-1-S
53	5	0	-10	1,5	RAB14, member RAS oncogene family
54	11	3	-3,7	1,4	fibulin 5
55	9	2	-4,5	1,4	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
56	7	1	-7	1,4	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
57	54	35	-1,5	1,3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Tab. 3-5 Differenziell exprimierte Transkripte nach 2 h in FL. Auf Grund der Dynamik des Systems wurden neben den deutlich signifikanten Transkripten auch Gene mit einer Signifikanz $\geq 1,3$ zur Analyse ausgewählt. Die Liste zeigt die ausgewählten Transkripte auf, die in FL nach 2 h höher exprimiert waren. Die Transkripte sind absteigend nach der berechneten Signifikanz (S) geordnet und wie der relative Expressionsquotient (Ratio) auf eine Stelle hinter dem Komma gerundet. Die Tagwerte für FL und BL sind auf natürliche Zahlen gerundet (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

In der Analyse der gepoolten Spender mittels des PIQOR™ erwiesen sich von insgesamt 65 Transkripten 37 als in den Systemen FL und BL exprimiert. Acht Transkripte davon zeigten an einem der vier untersuchten Zeitpunkte eine differentielle Expression (≥ 2 für BL; $\leq 0,5$ für FL) (Tab. 3-6). Auffällig ist, dass keines der identifizierten Transkripte eine differentielle Expression zu dem im SAGE analysierten 2 h-Wert aufweist (Tab. 3-3). Die drei in BL identifizierten Transkripte *hypothetical protein PRO1855*, *vitamin A responsive (cytoskeleton related)* und *growth arrest and DNA-damage-inducible (beta)* zeigen erst nach 4 h einen im PIQOR™-System messbaren differentiellen Quotienten. Von den fünf laut SAGE in FL höher exprimierten Transkripten zeigte ebenfalls keines eine differentielle Expression nach 2 h. Die vier Transkripte *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)*, *15 kDa selenoprotein*, *ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein* und *RAB14 (member RAS oncogene family)* zeigen sogar für den 4 h- oder 8 h-Wert eine höhere Expression im BL-System an (Tab. 3-6).

Nr.	UniGene Name	UniGene Nr	T	SAGE		PIQOR™							
				Ratio	S	1h	CV	2h	CV	4h	CV	8h	CV
Bound Lattice													
1	hypothetical protein PRO1855	Hs.283558	X	12,0	1,8	1,40	44	0,81	3	2,14	22	0,96	22
2	vitamin A responsive; cytoskeleton related	Hs.92384	X	7,0	1,4	1,45	46	0,91	54	2,02	3	0,44	47
3	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	Hs.110571	X	4,5	1,4	1,26	35	1,02	9	2,10	25	1,49	21
Free Lattice													
4	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Hs.179665		-10,0	2,2	0,98	6	0,82	11	1,01	23	2,03	-
5	15 kDa selenoprotein	Hs.90606		-14,0	2,1	-	-	-	-	4,38	45	0,59	30
6	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	Hs.75249		-12,0	1,8	-	-	1,09	8	2,76	5	0,79	22
7	brain acid soluble protein 1	Hs.79516	X	-2,6	1,5	0,51	30	0,53	37	0,49	17	0,66	25
8	RAB14, member RAS oncogene family	Hs.5807		-10,0	1,5	1,07	42	1,11	11	2,13	30	1,05	4

Tab. 3-6 Liste der mittels PIQOR™ verifizierten SAGE-Kandidaten der Poolanalyse. Die Analyse der im SAGE identifizierten differentiell exprimierten Transkripte wurde mittels des PIQOR™ cDNA-Arrays im Zeitexpressionsprofil zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h und 8 h analysiert. Verwendet wurden die gepoolte RNA von fünf Spendern. Insgesamt acht Transkripte zeigten eine differentielle Expression. Die Transkripte, die mit der im SAGE gemessenen Tendenz (T) übereinstimmen, sind mit einem X markiert (Ratio = relativer Expressionsquotient der SAGE-Analyse; S = Signifikanz des SAGE-Wertes; CV = Standardabweichung der PIQOR™-Analyse in %) (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Da die Expressionsgrenzen für die differentielle Expression eines Transkriptes stringent mit ≥ 2 für das BL-System und $\leq 0,5$ für das FL-System gesetzt wurden, gibt es auch innerhalb der PIQOR™-Analyse Transkripte, die als grenzwertig einzustufen sind. Ein Beispiel hierfür ist das durch SAGE in FL identifizierte Transkript *brain acid soluble protein 1*. Die im PIQOR™ ermittelten Messwerte zeigen eine über den gesamten Zeitverlauf höhere Expression in FL an, die aber nur bei 4 h als differentielle eingestuft wird (Tab. 3-6). Der 1 h- bzw. 2 h-Wert liegt mit 0,51 und 0,53 knapp an der Grenze. Biologische Änderungen innerhalb einer Zelle drücken sich zwar sehr häufig durch Änderungen der Aktivität eines Genes in Form einer veränderten RNA-Expression aus, aber wann eine Expressionsänderung zu einer

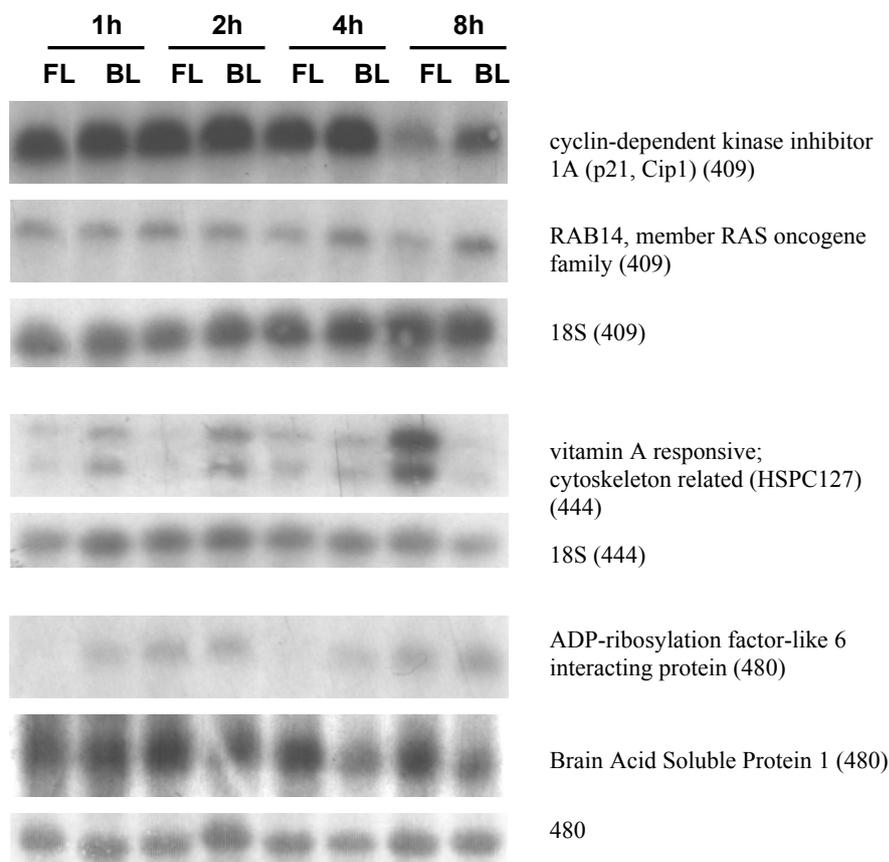
biologischen Reaktion führt, ist durch den Quotienten allein nicht direkt zu ermitteln. Ein Transkript kann mit einem Faktor ≤ 2 ebenfalls maßgeblich in die Physiologie einer Zelle eingreifen.

Neben der Analyse der gepoolten RNA wurde jeder einzelne der fünf Spender zusätzlich zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 4 h untersucht. Dabei wurden drei Transkripte in BL und zwei weitere in FL als differentiell höher exprimiert identifiziert (Tab. 3-7). Die Transkripte in BL, *cytochrome P450 subfamily I (dioxin-inducible) polypeptide 1*, *CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies)* und *vitamin A responsive cytoskeleton related*, waren den Ergebnissen der SAGE entsprechend nach 2 h bei mindestens zwei Spendern differentiell reguliert. Die in FL identifizierten Transkripte *endothelial differentiation-related factor 1* und *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)* waren zu jeweils zwei Zeitpunkten bei zwei Spendern differentiell exprimiert.

NR	UniGene Name	UniGene Nr.	Zeit	PIQOR™										SAGE			
				409		444		446		449		480		S	Ratio	FL	BL
				V	CV	V	CV	V	CV	V	CV	V	CV				
Bound Lattice																	
1	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)	Hs.154654	1h	2,3	8	1,3	-	1,4	6	2,0	7	0,4	17	4,0	6,0	4	24
			2h	1,3	12	2,0	17	1,6	9	2,2	14	1,1	3				
			4h	0,9	14	1,1	10	1,3	10	1,2	3	1,9	12				
2	CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344)	Hs.278573	1h	2,3	5	2,5	11	2,7	4	2,8	9	2,1	12	1,7	5,0	2	10
			2h	1,6	5	3,0	14	3,1	10	3,0	10	1,9	6				
			4h	1,9	9	1,4	8	1,4	10	1,6	11	2,8	6				
3	vitamin A responsive; cytoskeleton related	Hs.92384	1h	2,2	8	2,0	2	2,6	5	2,7	3	1,2	-	1,4	7,0	1	7
			2h	1,6	16	2,8	3	3,0	5	3,4	8	2,1	11				
			4h	1,1	12	1,4	9	1,2	11	1,4	9	3,6	9				
Free Lattice																	
4	endothelial differentiation-related factor 1	Hs.174050	1h	0,4	10	-	-	0,6	10	0,3	16	-	-	3,3	-22,0	11	0
			2h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			4h	0,8	10	0,7	7	0,6	10	0,5	2	0,5	6				
5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Hs.179665	1h	0,7	7	0,6	4	0,5	10	0,6	2	0,1	15	2,2	-10,0	10	1
			2h	-	-	0,7	8	0,5	4	0,7	-	0,5	2				
			4h	0,7	4	0,8	3	0,9	15	0,7	0	0,7	2				

Tab. 3-7 Liste der mittels PIQOR™ verifizierten SAGE-Kandidaten der Einzelspenderanalyse. Die Analyse der im SAGE identifizierten differentiell exprimierten Transkripte wurde mittels PIQOR™ cDNA-Array im Zeitexpressionsprofil zu 1 h, 2 h und 4 h analysiert. Verwendet wurde die RNA von insgesamt fünf Spendern (409, 444, 446, 449 und 480), die einzeln zu den genannten Zeitpunkten untersucht wurden. Insgesamt fünf Transkripte zeigten eine differentielle Expression, drei in BL und zwei in FL (V = relativer Expressionsquotient der PIQOR™-Analyse; CV = Standardabweichung der PIQOR™-Analyse in %; Ratio = relativer Expressionsquotient der SAGE-Analyse; S = Signifikanz des SAGE-Wertes; FL und BL = Tagzahlen in der entsprechenden SAGE-Analyse) (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Zur Validierung der Ergebnisse der SAGE und der PIQOR™-Analysen wurden insgesamt fünf Transkripte an zufällig gewählten Spendern verifiziert (Abb. 3-9 A-E). Die Ergebnisse der relativen Expressionsquotienten sind tabellarisch dargestellt.



Nr	UniGene Name	V	1h		2h		4h		8h	
			CV		CV		CV		CV	
A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Pool	0,98	6	0,82	11	1,01	23	2,03	-
		409	0,7	7	-	-	0,7	4	-	-
		NB	1,0	-	0,8	-	1,1	-	1,9	-
B	RAB14, member RAS oncogene family	Pool	1,07	42	1,11	11	2,13	30	1,05	4
		409	1,26	5	1,05	-	1,04	6	-	-
		NB	-1,7	-	-1,3	-	2,5	-	2,3	-
C	vitamin A responsive; cytoskeleton related	Pool	1,45	46	0,91	54	2,02	3	0,44	47
		444	2	2	2,79	3	1,35	9	-	-
		NB	1,7	-	2,6	-	1,3	-	-5	-
D	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	Pool	-	-	1,09	8	2,76	5	0,79	22
		480	-	-	1,59	-	5,05	11	-	-
		NB	13,2	-	2,4	-	4,8	-	-1,4	-
E	brain acid soluble protein 1	Pool	0,51	30	0,53	37	0,49	17	0,66	25
		480	-	-	1,25	-	1,05	16	-	-
		NB	1,6	-	1,2	-	-4,6	-	-6	-

Abb. 3-9 (A-E) Verifizierung von fünf der im PIQOR™ als differentiell identifizierten SAGE-Kandidaten mittels Northernblotanalyse. Die fünf Transkripte (A) *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)*, (B) *RAB14 (member RAS oncogene family)*, (C) *vitamin A responsive cytoskeleton related (HSPC127)*, (D) *ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein* und (E) *Brain Acid Soluble Protein 1* wurden zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h und 8 h mittels Northernblotanalyse bei jeweils einem Spender (Spender in Klammern genannt) verifiziert. Die zugehörige 18S-Hybridisierung befindet sich unter der jeweiligen Hybridisierung. Für Spender 480 wurde zur Quantifizierung die Methylenblaufärbung verwendet (s. 2.2.2.8). Die Tabelle zeigt die Ratio BL/FL für die entsprechenden Gene (A-E) an. Ein negatives Vorzeichen bedeutet eine stärkere Expression in FL. Zusätzlich zu den Werten der Northernblot-Analysen (NB) wurden die zugehörigen Messwerte der PIQOR™-Analysen der gepoolten RNA (Pool) und der RNA der Einzelspender (409, 444 bzw. 480) dargestellt.

3.1.5 Bioinformatische Analyse zur Identifikation potentieller Fibroblastenmarker

Neben der Analyse der SAGE-Datenbanken in Form eines Transkriptionsprofils (s. 3.1.3) oder dem Vergleich der Datenbanken innerhalb eines Experiments (s. 3.1.4), besteht auf Grund des seriellen Charakters der Analyse die Möglichkeit, die erstellten Datenbanken FL, BL und ML mit publizierten SAGE-Daten (z. B. NCBI) zu vergleichen. Solche vergleichenden Analysen ermöglichen unter anderem die bioinformatische Auswertung und genauere Charakterisierung unterschiedlicher Zelltypen zur Identifizierung spezieller Zellmarker. Die Datenbanken FL, BL und ML wurden genutzt, um Fibroblasten-charakterisierende Gene oder einen eventuell existenten Fibroblastenmarker zu identifizieren. Potentiell gibt es zwei verschiedene bioinformatische Ansätze:

1. Analyse potentieller Fibroblastenmarker mittels „Gesamtanalyse“

Die Summe aller zur Verfügung stehenden Datenbanken, ausgenommen Datenbanken, die nur Fibroblasten charakterisieren, werden mit der Summe der erstellten Datenbanken FL, BL und ML verglichen. In diesem Fall werden auch Datenbanken verwendet, die Gewebe und somit teilweise Fibroblasten charakterisieren.

Der Vorteil besteht darin, dass viele Gewebe und Zelltypen in den Vergleich eingehen und allgemeine oder nicht spezifische Gene herausgefiltert werden. Der Nachteil ist, dass ein evtl. Fibroblasten-spezifisches Gen wegen einer möglichen „Kontamination“ der Gesamtdatenbank nicht eindeutig hervortritt.

2. Analyse potentieller Fibroblastenmarker mittels „Zelllinienanalyse“

Die zweite Möglichkeit besteht darin, nur ausgewählte Banken in einem Pool zusammenzufassen, die definitiv keine Fibroblasten enthalten. In diesem Fall werden nur Zelllinien genutzt. Der Vorteil besteht darin, dass fibroblastenspezifische Gene eindeutiger hervortreten.

In der Gesamtanalyse wurden insgesamt 122 SAGE-Datenbanken (ausgenommen reine Fibroblasten-datenbanken), die auf der NCBI-Webseite unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/> publiziert sind, gepoolt (NonFibro) und mit den gepoolten SAGE-Daten der drei selbst erstellten Datenbanken FL, BL und ML (FibroSum) verglichen. Die für die Bank NonFibro verwendeten NCBI-Datenbanken sind im Appendix (s. 6.1.2) aufgelistet.

Die 20 signifikantesten Gene wurden tabellarisch dargestellt und näher analysiert (Tab. 3-8 A). Es ist ersichtlich, dass der größte Teil der identifizierten Gene definitiv keine Fibroblasten-spezifischen Gene sind. Zwar zeichnen sie sich durch eine hohe Expression in Fibroblasten aus, werden allerdings auch von anderen Zelltypen exprimiert. Zur genaueren Identifikation potentieller Kandidaten wurden zusätzlich die in UniGene publizierten cDNA-Ressourcen ausgewertet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dabei zeigten die 20 identifizierten Kandidaten keine Fibroblasten-spezifische Expression.

Für jedes identifizierte Gen konnte mindestens eine cDNA-Bank unter der angegebenen UniGene-Nr. im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in Form einer Zelllinie oder eines Zelltyps gefunden werden, die nicht aus Fibroblasten synthetisiert wurde.

Nr.	UniGene-Name	S	Ratio	Fibro Sum	Non Fibro	UniGene-Nr.	Tag
1	matrix metalloproteinase 2	298,7	-35,0	321	9	Hs.111301	combined
2	collagen, type I, alpha 2	298,7	-21,6	856	40	Hs.179573	combined
3	collagen, type I, alpha 1	298,7	-21,0	1221	58	Hs.172928	combined
4	fibronectin 1	298,7	-20,5	523	26	Hs.287820	combined
5	osteonectin	183,2	-7,3	394	54	Hs.111779	combined
6	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	174,1	-10,1	300	30	Hs.118787	combined
7	transgelin	157,2	-11,3	254	23	Hs.433399	combined
8	collagen, type III, alpha 1	153,8	-16,1	207	13	Hs.119571	combined
9	osteoblast specific factor 2	88,8	-29,6	93	3	Hs.136348	combined
10	follistatin-like 1	81,7	-10,8	134	12	Hs.433622	combined
11	collagen, type VI, alpha 1	69,8	-10,3	117	11	Hs.108885	combined
12	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp666G247	68,6	-17,3	88	5	Hs.376814	CTGAGAGCTGG
13	collagen, type VI, alpha 2	66,5	-9,1	120	13	Hs.420269	combined
14	BMP antagonist 1	60,1	-42,1	56	1	Hs.40098	combined
15	sulfatase 1	49,6	-41,6	46	1	Hs.70823	combined
16	connective tissue growth factor	49,5	-7,0	107	15	Hs.75511	combined
17	Homo sapiens, clone IMAGE:4874518, mRNA	46,3	-12,4	69	6	Hs.356289	combined
18	interleukin 6 (interferon, beta 2)	42,8	-39,8	40	1	Hs.93913	GGCACCTCAGA
19	insulin-like growth factor binding protein 3	39,5	-7,7	79	10	Hs.77326	combined
20	thrombospondin 1	39,3	-6,2	93	15	Hs.87409	combined

Tab. 3-8 (A) Liste der identifizierten potentiellen Fibroblastenmarker mittels „Gesamtanalyse“. Die Expressionsprofile von insgesamt 122 SAGE-Datenbanken, ausgenommen reine Fibroblasten-Datenbanken, wurden in einer Datenbank gepoolt (**NonFibro**). Zur Identifikation potentieller Fibroblastenmarker wurde die erstellte Datenbank mit der gepoolten Datenbank (**FibroSum**) der drei SAGE-Datenbanken FL, BL sowie ML nach der Normierung verglichen. In der Tabelle sind die relativen Expressionsquotienten (**Ratio**) der entsprechenden Tags im Vergleich bzw. die Anzahl der identifizierten Tags innerhalb einer Datenbank (**NonFibro und FibroSum**) nach der Normierung dargestellt. (**S**=Signifikanz). Die zur Analyse verwendeten Datenbanken sind im Appendix aufgelistet (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997). Der Begriff „combined“ bezeichnet Gene, denen mehrere Tags zugeordnet wurden.

In der Zelllinienanalyse wurden insgesamt sechs potentielle Kandidaten identifiziert, die auf Grund des Vergleichs mit Nicht-Fibroblasten spezifisch für Fibroblasten sein könnten (Tab. 3-8 B, fett gedruckt). Die verwendeten NCBI-Datenbanken sind im Appendix (s. 6.1.1) aufgelistet. Die sechs Kandidaten sind:

1. PSG2: pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2
2. NR4A3: nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
3. SNAI1: snail homolog 1 (Drosophila)
4. BMP1 Antagonist
5. SULF1: sulfatase 1
6. CTSK: cathepsin K (pseudodysostosis)

Auch für diese Gene wurden cDNA-Ressourcen identifiziert, die nicht von Fibroblasten abstammten. Allerdings muss die Expression *in vivo* analysiert werden. Zwar können diese Gene auch von Nicht-Fibroblasten exprimiert werden, sind aber vielleicht innerhalb der humanen Haut spezifisch für Fibroblasten.

UniGene Name	FibroSum/NonFibro2	FibroSum/NonFibro2_max	Nonfibro2	Nonfibro2_max2	Fibrosum	LibertyAceNeu	PrisonAceNeu	TrivialAceNeu	UniGene Nr.	Tag
COL3A1, collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	82,0	82,0	0	0	4,1	4,1	3,6	5,8	Hs.119571	CCACGGGATTC
PSG2, pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2 or PSG5	30,0	30,0	0	0	1,5	1,8	1,8	0	manual	AGTATTCATAT
NR4A3, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	18,0	18,0	0	0	0,9	2,3	0	0	Hs.80561	CCTTCTGTGGG
SNAI1, snail homolog 1 (Drosophila)	18,0	18,0	0	0	0,9	0,9	1,4	0	Hs.48029	GCCATTTCTGT
BMP1 Antagonist	18,0	18,0	0	0	0,9	0,5	1,4	1	Hs.40098	GCCTTCTTGGA
COL1A1, collagen, type I, alpha 1	18,0	18,0	0	0	0,9	2,3	0	0	manual	TTCAGCTTTGT
SULF1, sulfatase 1	63,0	12,6	0,1	0,5	6,3	4,5	7,7	6,8	Hs.70823	GCTAATAATGT
IL6, interleukin 6 (interferon, beta 2)	148,0	12,3	0	0,6	7,4	8,6	6,8	6,8	Hs.93913	GGCACCTCAGA
MMP3, matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	48,0	12,0	0	0,2	2,4	1,8	0,9	6,8	Hs.83326	GAGCCAGGCTT
COL1A1, collagen, type I, alpha 1	35,0	11,7	0,1	0,3	3,5	2,3	5	2,9	Hs.172928	TGGAAATGAAA
COL1A1, collagen, type I, alpha 1	38,0	9,5	0	0,2	1,9	3,6	0,5	1	Hs.172928	GGAGGAGAGCG
FNDC1, fibronectin type III domain containing 1	34,0	8,5	0	0,2	1,7	0,9	0,9	4,8	Hs.334838	CTTCTGTTTT
CTSK, cathepsin K (pseudodeficiency)	30,0	7,5	0,1	0,4	3	1,8	3,6	3,9	Hs.83942	ATAAAAAGAAA
TNFRSF11B, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	44,0	7,3	0	0,3	2,2	0,5	2,7	4,8	Hs.81791	GATGAGTAAAC
COL1A1, collagen, type I, alpha 1	40,0	6,7	0	0,3	2	1,8	1,8	2,9	manual	CGGGGGTAAGT
THBS2, thrombospondin 2	20,0	6,7	0,1	0,3	2	0,5	1,8	5,8	Hs.108623	GTCAAATTTTC
DCN, decorin	52,0	6,5	0,1	0,8	5,2	5	5,4	4,8	Hs.433989	ACTTATTATGC
FN1, fibronectin 1	26,0	6,5	0	0,2	1,3	2,7	0,5	0	Hs.287820	ATCTTGTTACT
FN1, fibronectin 1	26,0	6,5	0	0,2	1,3	1,4	0,5	2,9	Hs.287820	CGTGTCACCTG
FN1, fibronectin 1	52,0	6,5	0	0,4	2,6	2,3	2,7	2,9	Hs.287820	GCAGCCGCCAC

Tab. 3-8 (B) Liste der identifizierten potentiellen Fibroblastenmarker mittels „Zelllinienanalyse“. Die Expressionsprofile von insgesamt 34 SAGE-Datenbanken, die Zelllinien oder primäre Zellen, ausgenommen Fibroblasten, enthielten, wurden in einer Datenbank gepoolt (**NonFibro2**). Zur Identifikation potentieller Fibroblastenmarker wurde die erstellte Datenbank mit der gepoolten Datenbank (**FibroSum**) der drei SAGE FL (**LibertyAceNeu**), BL (**PrisonAceNeu**) sowie ML (**TrivialAceNeu**) nach der Normierung verglichen. In der Tabelle sind die relativen Expressionsquotienten der entsprechenden Tags im Vergleich bzw. die Anzahl der identifizierten Tags innerhalb einer Datenbank nach der Normierung dargestellt. Zur besseren Analyse wurde zusätzlich die höchste identifizierte Tagzahl aus den 34 Datenbanken angegeben (**Nonfibro2_max**) und der relative Expressionsquotient gebildet (**FibroSum/NonFibro2_max**). Die zur Analyse verwendeten Datenbanken sind im Appendix aufgelistet.

3.1.6 Vergleich Primärer Fibroblasten mit transfizierten und Vorhautfibroblasten

Der serielle Charakter der SAGE kann nicht nur zur Analyse eines potentiellen Fibroblastenmarkers genutzt werden, sondern bietet auch die Möglichkeit, verschiedene Zelltypen miteinander zu vergleichen. Dieser Vorteil wurde genutzt, um die Unterschiede innerhalb der Genexpressionsprofile verschiedener Fibroblasten genauer zu betrachten. Ausgewählt wurden die SAGE-Datenbank einer immortalisierten Zelllinie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM712>) und primärer Vorhautfibroblasten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM1>). Die Analyse dieser beiden SAGE-Datenbanken erlaubt eine Antwort auf die Fragestellung, ob sich die Expression der verschiedenen Fibroblasten unterscheidet.

3.1.6.1 Transfizierte Fibroblasten

Zelllinien werden in biologischen Experimenten häufig wegen der einfacheren Handhabung und der besseren Charakterisierung der Zellen genutzt. Außerdem ist die Reproduktion der Ergebnisse besser gewährleistet, da die Experimente mit Zellen eines Genotyps durchgeführt werden und die Problematik der Spendervariabilität, wie bei primären Zelllinien, ausgeschlossen wird. Allerdings zeigen Zelllinien durch die Immortalisierung eine gravierende Änderung ihres Expressionsprofils und weichen von dem primären Zelltyp stark ab. Die Analyse der Expressionsprofile von Large-T-Antigen transformierten Fibroblastenklonen mittels des Vergleiches der auf der NCBI-Webseite publizierten Datenbank *SAGE Duke precrisis fibroblasts* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM712>) und der in dieser Arbeit erstellten Datenbank *FibroSum* zeigte wesentliche Unterschiede im Expressionsprofil auf. Die Ergebnisse wurden zur besseren Übersicht in zwei Tabellen aufgeteilt, die die ersten 30 signifikant höher exprimierten Tags in primären dermalen Fibroblasten (Tab. 3-9 A) und die ersten 30 signifikant höher exprimierten Tags in der transfizierten Zelllinie (Tab. 3-9 B) darstellen.

Auffällig ist, dass Transkripte für Komponenten der EZM in den primären Fibroblasten signifikant höher exprimiert werden. Die beiden Kollagene *collagen type I alpha 1* und *collagen type I alpha 2* sowie das Matrixprotein *fibronectin 1* werden ca. 10- bis 20-fach höher exprimiert als in den transformierten Fibroblasten. Auch die *matrix metalloproteinase 2* wird in den primären Zellen 9,6-fach höher exprimiert. Das für Fibroblasten charakteristische Transkript *transforming growth factor beta-induced* ist sogar 44,8 fach höher exprimiert. Das *Integrin alpha V*, Rezeptor für *Vitronectin*, und *collagen type VI alpha 3* zeigen sogar nur eine Expression in den primären Fibroblasten.

Der Vergleich der Ergebnisse mit dem Expressionsprofil der hPDF im ML (Tab. 3-1) zeigt, dass eine große Anzahl an Transkripten, die auf Grund ihrer hohen Expression als Fibroblasten-typische Gene beschrieben wurden, in den transformierten Zellen eine viel geringere Expression aufweisen. Die Gruppe der Gene, die für die EZM von Bedeutung sind, scheinen dabei sehr stark betroffen zu sein. Auch Gene des Zytoskeletts sind stärker exprimiert. Beispiele sind *transgelin* und *tropomyosin 1 (alpha)* (Tab. 3-9 A).

Nr	UniGene Name	UniGene Nr.	S	Ratio	Fibro Sum	Fibro CellLine
1	collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	51,5	11,4	1221	107
2	collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	38,5	14,2	856	60
3	fibronectin 1	Hs.287820	25,4	19,5	523	27
4	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.118787	16,3	44,8	300	7
5	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	Hs.111301	13,1	9,6	321	34
6	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	10,9	4,5	394	87
7	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	Hs.119571	7,8	7,7	207	27
8	ferritin, light polypeptide	Hs.430150	6,6	3,5	285	81
9	Human promyelocytic leukemia cell mRNA, clones pHH58 and pHH81	Hs.426138	6,3	2,7	378	141
10	ferritin, heavy polypeptide 1	Hs.418072	5,3	2,2	429	194
11	transgelin	Hs.433399	4,4	2,7	254	94
12	thrombospondin 1	Hs.87409	4,3	13,9	93	7
13	collagen, type VI, alpha 2	Hs.420269	4,1	6,0	120	20
14	tropomyosin 1 (alpha)	Hs.77899	4,1	13,4	90	7
15	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp666G247	Hs.376814	4,0	13,1	88	7
16	collagen, type VI, alpha 1	Hs.108885	4,0	5,8	117	20
17	major histocompatibility complex, class I, C	Hs.277477	3,7	19,4	65	0
18	folliculin-like 1	Hs.433622	3,6	4,0	134	34
19	osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	Hs.136348	3,4	6,9	93	13
20	ESTs, Highly similar to ITB1_HUMAN Integrin beta-1 precursor (Fibronectin receptor beta subunit) (CD29)	Hs.380983	3,3	11,2	75	7
21	collagen, type VI, alpha 3	Hs.80988	2,9	15,5	52	0
22	Human heat shock protein 86 mRNA, 5'end	Hs.381246	2,7	9,6	64	7
23	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	Hs.406455	2,5	13,7	46	0
24	sulfatase 1	Hs.70823	2,5	13,7	46	0
25	actin, beta	Hs.426930	2,5	2,4	163	67
26	chromosome 14 open reading frame 31	Hs.250705	2,4	12,8	43	0
27	calumenin	Hs.7753	2,4	5,4	72	13
28	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Hs.295726	2,3	12,5	42	0
29	insulin-like growth factor binding protein 7	Hs.119206	2,3	12,5	42	0
30	reticulon 4	Hs.65450	2,3	8,5	57	7

Tab. 3-9 (A) Liste der ersten 30 signifikant höher exprimierten Tags in primären dermalen Fibroblasten gegenüber einer Fibroblastenzelllinie. Zur Analyse der Expressionsprofile wurden die beiden SAGE-Datenbanken **FibroSum** (humane primäre dermale Fibroblasten) und **FibroCellLine** (transfizierte Fibroblasten) normiert und anschließend die relativen Expressionsquotienten (**Ratio = FibroSum/FibroCellLine**) nach ihrer Signifikanz absteigend geordnet. Die Liste zeigt die ersten 30 signifikant (> 2) stärker exprimierten Tags. Ausgenommen sind mitochondriale Tags, Alu repeats, ribosomale Tags und Tags, die keine oder keine eindeutige Zuordnung besaßen. Die Tagwerte wurden auf natürliche Zahlen gerundet (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Auch die in den transformierten Fibroblasten stärker exprimierten Transkripte betreffen mindestens zwei funktionelle Gruppen (Tab. 3-9 B).

Nr	UniGene Name	UniGene Nr.	S	Ratio	Fibro CellLine	Fibro Sum
1	H2A histone family, member Z	Hs.119192	11,9	-18,2	127	7
2	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	Hs.265827	8,2	-7,5	127	17
3	16.7Kd protein	Hs.180859	7,8	-8,1	114	14
4	profilin 1	Hs.408943	7,6	-3,2	268	85
5	tubulin alpha 6	Hs.406578	7,1	-9,4	94	10
6	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67kDa)	Hs.181357	6,6	-3,2	228	72
7	cofilin 1 (non-muscle)	Hs.180370	6,3	-2,8	262	94
8	aldolase A, fructose-bisphosphate	Hs.273415	6,2	-3,6	174	48
9	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	Hs.73818	5,9	-12,0	40	0
10	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	Hs.108809	5,8	-15,1	60	4
11	H3 histone, family 3A	Hs.367720	5,7	-9,2	74	8
12	likely ortholog of mouse deleted in polyposis 1	Hs.178112	5,1	-40,2	40	1
13	HLA class II region expressed gene KE2	Hs.438541	5,0	-10,0	34	0
14	histone deacetylase 8	Hs.112272	4,7	-10,7	54	5
15	barrier to autointegration factor 1	Hs.433759	4,5	-20,1	40	2
16	chondroitin sulfate proteoglycan BEHAB/brevican	Hs.6194	4,1	-8,0	27	0
17	apolipoprotein E	Hs.169401	4,1	-8,0	27	0
18	proteoglycan 1, secretory granule	Hs.1908	4,1	-8,0	27	0
19	ubiquitous tetratricopeptide containing protein RoXaN	Hs.25347	4,1	-8,0	27	0
20	small inducible cytokine subfamily E, member 1 (endothelial monocyte-activating)	Hs.333513	4,1	-8,0	27	0
21	cyclin B1	Hs.23960	4,0	-9,4	47	5
22	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	Hs.177530	3,9	-4,5	81	18
23	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa	Hs.424327	3,8	-5,2	67	13
24	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	Hs.58189	3,7	-16,8	34	2
25	sperm associated antigen 7	Hs.90436	3,4	-26,8	27	1
26	chromosome condensation protein G	Hs.193602	3,4	-26,8	27	1
27	CD3-epsilon-associated protein; antisense to ERCC-1	Hs.211956	3,4	-26,8	27	1
28	non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	Hs.118638	3,3	-8,1	40	5
29	ovarian carcinoma immunoreactive antigen	Hs.132071	3,3	-5,4	54	10
30	DAZ associated protein 1	Hs.65588	3,3	-6,0	20	0

Tab. 3-9 (B) Liste der ersten 30 signifikant stärker exprimierten Tags in einer Fibroblastenzelllinie gegenüber primären dermalen Fibroblasten. Zur Analyse der Expressionsprofile wurden die beiden SAGE-Datenbanken **FibroSum** (humane primäre dermale Fibroblasten) und **FibroCellLine** (transfizierte Fibroblasten) normiert und anschließend die relativen Expressionsquotienten (**Ratio = FibroCellLine/FibroSum**) nach ihrer Signifikanz absteigend geordnet. Die Liste zeigt die ersten 30 signifikant (> 2) höher exprimierten Tags. Ausgenommen sind mitochondriale Tags, Alu repeats, ribosomale Tags und Tags, die keine oder keine eindeutige Zuordnung besitzen. Zur Kennzeichnung der stärkeren Expression und zum besseren Vergleich wurde diesen Zahlen ein negatives Vorzeichen zugeordnet (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Transkripte des Metabolismus wie *aldolase A fructose-bisphosphate* und *ubiquinol-cytochrome c reductase (hinge protein)* und Gene, die die Gruppe der Histone umfassen wie *H2A histone family (member Z)*, *H3 histone family (3A)* und *histone deacetylase 8*, wurden signifikant stärker in den transformierten Fibroblasten exprimiert.

Der Vergleich zwischen transformierten Fibroblasten und hPDFs zeigt, dass es zu einer Veränderung des Expressionprofils kommt. Die primären Fibroblasten sind im Kollagengel oder als ML kultiviert der biologischen Situation wesentlich näher. Gerade der Kontakt zu Kollagen wird hPDFs veranlassen, die Homöostase der EZM zu erhalten und entsprechend Komponenten der Matrix oder des Zytoskeletts zu produzieren. Die transformierten Zellen hingegen verschieben die Synthese der relevanten Gene auf Komponenten, die für den Stoffwechsel notwendig sind und verringern die Expression von Komponenten der EZM.

3.1.6.2 Vorhautfibroblasten

Neben der Analyse der Unterschiede zwischen transformierten und primären Fibroblasten ist auch der Vergleich von primären Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft von Interesse. Fibroblasten sind ein nicht homogener Zelltyp, der sich zwar allgemein durch die Organisation des Bindegewebes auszeichnet, allerdings im Genexpressionsprofil und im Phänotyp je nach Lage innerhalb des menschlichen Körpers wesentliche Unterschiede aufzeigt. Durch die jeweiligen Anpassungen an die lokalen Bedingungen und die Änderungen in der Expression der notwendigen Gene entstehen unterschiedliche Phänotypen (Regan *et al.*, 1991; Fritsch *et al.*, 1997; Zangani *et al.*, 1999; Hakenjos *et al.*, 2000; Scaffidi *et al.*, 2001). Dass Fibroblasten das Potential zur Differenzierung besitzen, kann an der Ausbildung von Myofibroblasten belegt werden (Shephard *et al.*, 2004). Sowohl innerhalb des Bindegewebes als auch während der Wundheilung, kommt es zur Differenzierung der Fibroblasten in den Myofibroblastentyp, der sich unter anderem durch die Expression von *alpha smooth muscle actin* auszeichnet und zur Ausbildung von gerichteten mechanischen Kräften besser geeignet ist (Cogan *et al.*, 2002; Shephard *et al.*, 2004). Dass Unterschiede zwischen Fibroblasten bestehen, kann auch am Beispiel von primären Vorhautfibroblasten gegenüber primären dermalen Fibroblasten aufgezeigt werden. Fetale Vorhautfibroblasten weisen z. B. eine wesentlich höhere Teilungsrates auf, die im Vergleich zu den adulten Fibroblasten auch über mehr Passagen erhalten bleibt (Khorramizadeh *et al.*, 1999).

Um einen Einblick in die unterschiedlichen Expressionen zu erhalten, wurde die auf der NCBI-Webseite veröffentlichte SAGE-Datenbank *Foreskin Fibroblasts* von primären humanen Vorhautfibroblasten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM1>) mit der erstellten SAGE-Datenbank *FibroSum* verglichen. Wie bei dem Vergleich mit den transfizierten Fibroblasten wurden auch hier die jeweils 30 ersten signifikant höher exprimierten Transkripte der jeweiligen Zellen tabellarisch dargestellt (Tab. 3-10 A und B).

Nr.	UniGene Name	UniGene Nr.	S	Ratio	Fibro Sum	Fibro ForeSkin
1	collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	25,1	5,0	446,6	89,2
2	collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	19,8	6,1	312,0	51,4
3	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.118787	17,2	25,4	174,4	6,9
4	collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	16,8	11,7	200,8	17,1
5	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	13,0	6,4	197,3	30,9
6	transgelin	Hs.433399	11,7	8,9	152,2	17,1
7	matrix metalloproteinase 2	Hs.111301	8,3	3,4	197,3	58,3
8	osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	Hs.136348	4,4	8,4	57,4	6,9
9	thymosin, beta 10	Hs.76293	4,3	2,7	128,8	48,0
10	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Hs.401787	4,1	4,4	74,9	17,1
11	beta-2-microglobulin	Hs.48516	4,0	2,5	135,2	54,9
12	actin, gamma 1	Hs.14376	3,9	4,3	73,2	17,1
13	connective tissue growth factor	Hs.75511	3,8	3,8	78,4	20,6
14	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	Hs.119571	3,8	3,8	77,9	20,6
15	tubulin, alpha, ubiquitous	Hs.334842	3,6	12,3	42,1	3,4
16	follistatin-like 1	Hs.433622	3,6	3,4	81,4	24,0
17	actin, beta	Hs.426930	3,6	2,9	97,8	34,3
18	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type	Hs.82085	3,2	17,1	29,3	0,0
19	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle;	Hs.77385	3,1	2,4	107,7	44,6
20	collagen, type VI, alpha 2	Hs.420269	2,9	15,7	26,9	0,0
21	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	Hs.83169	2,9	4,8	49,2	10,3
22	tropomyosin 1 (alpha)	Hs.77899	2,9	10,2	35,1	3,4
23	interleukin 6 (interferon, beta 2)	Hs.93913	2,8	15,0	25,8	0,0
24	hypothetical protein MGC5560	Hs.207251	2,8	3,9	53,9	13,7
25	myosin, light polypeptide 9, regulatory	Hs.9615	2,6	4,4	45,7	10,3
26	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 2	Hs.9930	2,4	5,5	37,5	6,9
27	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1	Hs.40098	2,4	8,9	30,4	3,4
28	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Hs.287797	2,3	4,1	42,1	10,3
29	immediate early response 3	Hs.76095	2,2	12,3	21,1	0,0
30	myosin, light polypeptide, regulatory, non-sarcomeric (20kD)	Hs.180224	2,2	12,3	21,1	0,0

Tab. 3-10 A Liste der ersten 30 signifikant stärker exprimierten Tags in dermalen gegenüber Vorhautfibroblasten. Zur Analyse der Expressionsprofile wurden die beiden SAGE-Datenbanken **FibroSum** (hPDFs) und **FibroForeSkin** normiert und anschließend die relativen Expressionsquotienten (**Ratio = FibroSum/FibroForeSkin**) nach ihrer Signifikanz absteigend geordnet. Die Liste zeigt die ersten 30 signifikant (> 2) höher exprimierten Tags. Ausgenommen sind mitochondriale Tags, Alu repeats und Tags, die keine oder keine eindeutige Zuordnung besaßen (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Auch hier zeigt sich bei den in hPDFs höher exprimierten Transkripten ein ähnliches Bild wie bei dem Vergleich mit transfizierten Fibroblasten (s. 3.1.6.1). Gene, die für die Organisation der EZM verantwortlich sind, werden wesentlich stärker exprimiert (Tab. 3-10 A). Beispiele sind *collagen type I alpha 1* und *alpha 2*.

Auch die extrazellulären Proteasen *matrix metalloproteinase 1* und *2* und Faktoren wie *connective tissue growth factor* werden signifikant stärker in den primären Fibroblasten der Haut exprimiert.

Nr	UniGene Name	UniGene Nr.	S	Ratio	Fibro ForeSkin	Fibro Sum
1	fibulin 1	Hs.79732	9,5	-27,3	48,0	1,8
2	Homo sapiens cDNA FLJ23836 fis, clone KAIA4592	Hs.433139	8,2	-7,3	68,6	9,4
3	insulin-like growth factor binding protein 5 (far downstream tag1)	Hs.180324	8,0	-23,4	41,2	1,8
4	insulin-like growth factor binding protein 5 (far downstream tag2)	Hs.180324	6,7	-16,1	37,7	2,3
5	collagen, type VI, alpha 2	Hs.420269	6,2	-2,9	123,4	42,1
6	fibulin 1	Hs.79732	5,8	-17,6	30,9	1,8
7	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	Hs.76224	5,8	-8,8	41,2	4,7
8	tenascin XB	Hs.169886	5,6	-12,0	20,6	0,0
9	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	Hs.169610	5,5	-41,0	24,0	0,6
10	collagen, type VI, alpha 1	Hs.108885	4,9	-20,5	24,0	1,2
11	decorin	Hs.433989	4,7	-3,7	65,2	17,6
12	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F	Hs.173594	3,9	-10,3	24,0	2,3
13	Adipsin, major tag	Hs.155597	3,9	-8,0	13,7	0,0
14	ribosomal protein S4, Y-linked	Hs.180911	3,9	-8,0	13,7	0,0
15	DKFZP586H2123 protein	Hs.55044	3,7	-11,7	20,6	1,8
16	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E	Hs.21858	3,6	-4,1	41,2	10,0
17	ribosomal protein L23a	Hs.419463	3,5	-3,8	44,6	11,7
18	chromosome 6 open reading frame 48	Hs.109798	3,4	-14,6	17,1	1,2
19	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	Hs.79706	3,4	-14,6	17,1	1,2
20	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	Hs.252189	3,3	-6,8	24,0	3,5
21	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	Hs.58189	3,2	-23,4	13,7	0,6
22	slit homolog 3 (Drosophila)	Hs.57929	3,2	-23,4	13,7	0,6
23	eukaryotic translation elongation factor 2	Hs.75309	3,1	-2,1	102,9	49,2
24	secreted frizzled-related protein 1	Hs.7306	3,0	-6,0	10,3	0,0
25	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	Hs.79339	3,0	-6,0	10,3	0,0
26	ESTs, Highly similar to A43542 lymphocyte-specific protein 1 - human	Hs.446566	3,0	-6,0	10,3	0,0
27	apolipoprotein E	Hs.169401	3,0	-6,0	10,3	0,0
28	c-src tyrosine kinase	Hs.77793	3,0	-6,0	10,3	0,0
29	hypothetical protein MGC13047	Hs.97031	3,0	-6,0	10,3	0,0
30	hypothetical protein FLJ21919	Hs.105894	3,0	-6,0	10,3	0,0

Tab. 3-10 B Liste der ersten 30 signifikant stärker exprimierten Tags in Vorhaut- gegenüber dermalen Fibroblasten. Zur Analyse der Expressionsprofile wurden die beiden SAGE-Datenbanken **FibroSum** (hPDFs) und **FibroForeSkin** normiert und anschließend die relativen Expressionsquotienten (**Ratio = FibroForeSkin/FibroSum**) nach ihrer Signifikanz absteigend geordnet. Die Liste zeigt die ersten 30 signifikant (> 2) höher exprimierten Tags. Ausgenommen sind mitochondriale Tags, Alu repeats und Tags, die keine oder keine eindeutige Zuordnung besaßen. Zur Kennzeichnung der höheren Expression und zum besseren Vergleich wurde diesen Werten ein negatives Vorzeichen zugeordnet (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

Komponenten des Zytoskeletts wie *beta actin* und *gamma actin 1* sowie *myosin light polypeptide 6 alkali (smooth muscle and non-muscle)* werden ebenfalls bei den primären Fibroblasten der Bauchhaut höher exprimiert.

Interessant ist vor allem die höhere Expression des *integrin beta 1*, unter anderem ein Rezeptor für *Fibronectin*. Dieses Integrin ist mit seinen beiden Bindungspartnern, den *Integrinen alpha 1* und *alpha 2*, bedeutend innerhalb der Organisation der EZM. Allgemein scheinen die Fibroblasten der Bauchregion Komponenten des Bindegewebes stärker zu exprimieren (Chiquet *et al.*, 2003; Tsuruda *et al.*, 2004; Zoppi *et al.*, 2004). Eine Erklärung könnte das Alter der ausgewählten Spender sein. Es ist bekannt, dass das Alter und die Anzahl der Passagen der Fibroblasten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Einfluss auf den Grad der Expression von Komponenten der EZM hat (Khorramizadeh *et al.*, 1999; Mawal-Dewan *et al.*, 2002). Auf Grund der Angaben über die Vorhautfibroblasten kann aber nur eine Aussage über die verwendete Passage (15-18) und nicht über das Alter des Spenders gemacht werden.

Die in den Vorhautfibroblasten stärker exprimierten Transkripte (Tab. 3-10 B) zeigen sich im Vergleich zu den primären Fibroblasten der Bauchhaut nicht einheitlich. Auffällig ist, dass eine Vielzahl von Transkripten höher exprimiert werden, deren Funktionen bisher nicht genauer bekannt sind und die teilweise in den Fibroblasten der Bauchhaut gar nicht detektiert werden konnten. Beispiele sind *Homo sapiens cDNA FLJ23836 fis clone KAlA4592*, *ESTs Highly similar to A43542 lymphocyte-specific protein 1 (human)*, *MGC13047 (hypothetical protein)* und *FLJ21919 (hypothetical protein)*. Eventuell spielen diese Transkripte für Vorhautfibroblasten eine spezifische Rolle. Die höhere Expression der Matrixkomponenten *fibulin 1*, *decorin*, *tenascin XB* und *EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1* weist auf eine andere notwendige Zusammensetzung der EZM für Vorhautfibroblasten hin. Hinweis dafür sind auch die beiden Proteinaseinhibitoren *serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E (PAII)* und *serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade F. PAII* konnte im Rahmen der Analyse der beiden Kollagensysteme BL und FL mittels PIQOR™ cDNA-Array-Analyse (s. 3.2) in den mechanisch gestressten Fibroblasten als stärker exprimiert identifiziert werden.

Der Vergleich der transfizierten Zellen und der Vorhautfibroblasten wurden zusätzlich auf unterschiedliche Expressionen einzelner Tags eines Genes analysiert. Nur im Fall der Vorhautfibroblasten konnte ein signifikanter Unterschied für zwei Tags des Transkriptes *collagen, type VI, alpha 2* festgestellt werden (Tab. 3-11). Unterschiede in Form des alternativen Spleißens bzw. Unterschiede in der Länge der mRNA eines Transkriptes können Einfluss auf die weitere biologische Funktion haben (Elliott, 2003; Kherrouche *et al.*, 2004; Kuiper *et al.*, 2004). Für *collagen type VI alpha 2* konnten verschiedene Spleißformen des Transkriptes gefunden werden, die den identifizierten Tags zugeordnet werden können. Ob die einzelnen mRNA-Varianten, die auch auf der Proteinebene übersetzt werden, einen Einfluss auf die Funktion haben, ist bis heute nicht bekannt (Saitta *et al.*, 1990; Saitta *et al.*, 1992).

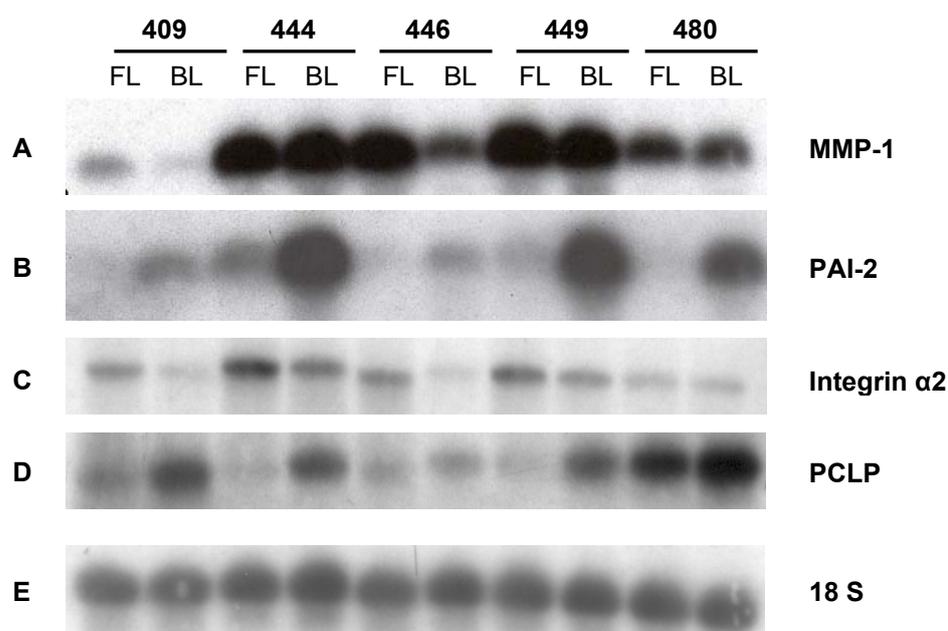
UniGene Name	UniGene-Nr.	S	Ratio	Fibro Sum	Fibro ForeSkin	Tag
collagen, type VI, alpha 2	Hs.420269	2,9	15,7	26,9	0,0	GTGCGAAGCG
		6,2	-2,9	42,1	123,4	GTGCTAAGCG

Tab. 3-11 Differentiell exprimierte Tags (Transkripte) in humanen dermalen Fibroblasten der Bauchhaut und der Vorhaut. Dargestellt sind die in der Bauchhaut (**FibroSum**) und in Vorhautfibroblasten (**FibroForeSkin**) unterschiedlich stark exprimierten Tags des *collagen type VI alpha 2* (**S** = Signifikanz der SAGE-Analyse; **Ratio** = relativer Expressionsquotient) (Signifikanzen berechnet nach Audic und Claverie, 1997).

3.2 PIQOR™ cDNA-Array Skin 1.0

Das Auflösungsvermögen der SAGE ist unter anderem stark abhängig von der Anzahl der sequenzierten Tags. Schwach exprimierte Transkripte bzw. Transkripte mit einer geringen Ratio können evtl. nicht detektiert werden. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Analyse der differentiellen Expression von FL und BL die RNA von insgesamt fünf Spendern mittels PIQOR™ cDNA-Array Skin 1.0 zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h und 8 h analysiert. Der cDNA-Array Skin 1.0 der Firma Memorec (Köln) enthält insgesamt 1.376 Transkripte, die in biologischen und pathologischen Situationen der humanen Haut von Bedeutung sind (Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren, Proteine der EZM etc.).

Zur internen Kontrolle wurde zusätzlich der 12 h-Wert mittels Northernblot analysiert (Abb. 3-10). Aus früheren Versuchen ist bekannt, dass die Gene *MMP-1*, *PAI-2*, *α2-Integrin* und *PCLP* sensitiv auf mechanischen Stress reagieren (Kessler, 2002). *PAI-2* und *PCLP* sind in BL, das *α2-Integrin* in FL stärker exprimiert. *MMP1* ist ein allgemein sensitives Gen gegenüber diversen Stressformen (Brenneisen *et al.*, 1997; Westermarck *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000; Redlich *et al.*, 2004), zeigt sich aber in der Regel in FL als stärker exprimiert (Lambert *et al.*, 1998).



	409	444	446	449	480
MMP1	-2,27	-1,12	-2,56	-1,28	-1,09
PAI2	4,98	2,83	4,01	9,18	13,59
α2-Integrin	-5,00	-1,96	-10,67	-2,13	1,40
PCLP	2,37	5,08	-1,19	21,75	1,80

Abb. 3-10 Stress sensitive Gene. Zur genaueren Analyse des Kollagengelsystems wurden vier Stress-sensitive Gene auf ihren Expressionsgrad im Northernblot analysiert. (A) *MMP1* reagiert allgemein auf Stress, während die Gene (B) *PAI2*, (C) *α2-Integrin* und (D) *PCLP* sensitiv auf mechanischen Stress reagieren. (E) 18S-Hybridisierung. Unter den Hybridisierungen befinden sich die Ergebnisse der densitometrischen Analyse. Dargestellt ist das relative Expressionsverhältnis bezogen auf die 18S-Hybridisierung. Stärkere Expressionen in BL sind positiv.

Die Analyse der genannten Transkripte mittels Northernblot zeigte, dass die RNA aller fünf Spender entsprechend in den beiden Kollagengel-Systemen auf der Expressionsebene reagierten. Sowohl *PAI-2* als auch *PCLP* waren bei den fünf untersuchten Spendern im BL-System höher exprimiert. Dies gilt für das $\alpha 2$ -*Integrin* aus Sicht des FL-Systems. Ausnahme ist *MMP1*, das nur bei zwei Spendern signifikant stärker im FL-System exprimiert war. Der Grund liegt wahrscheinlich in der Vorbereitung der Zellen während der ML-Kultur. Es ist bekannt, dass das Alter und die Anzahl der Passagen der Fibroblasten Einfluss auf den Grad der *MMP1*-Expression nimmt. Abhängig vom Alter und der Passagenzahl steigt die *MMP1*-Expression der Fibroblasten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Khorramizadeh *et al.*, 1999; Mawal-Dewan *et al.*, 2002). Zusätzlich reagiert *MMP1* nicht nur auf mechanischen Stress, sondern ist auch gegenüber anderen Formen, z. B. oxidativem Stress, sensitiv (Brenneisen *et al.*, 1997; Wenk *et al.*, 1999). Ein weiterer Aspekt sind die Bedingungen während der Zellkultur. So konnte gezeigt werden, dass Trypsin einen Einfluss auf den Expressionsgrad einzelner Gene hat. *MMP1* und *TGF β 1* wurden durch die Behandlung mit Trypsin signifikant induziert (Varedi *et al.*, 1997).

Allerdings wird durch die differentielle Expression der Transkripte *PAI-2*, *PCLP* und $\alpha 2$ -*Integrin* eindeutig belegt, dass alle Spender unabhängig von der *MMP1*-Expression sensitiv auf mechanischen Stress reagierten. Auffällig ist zudem, dass der Expressionsgrad eine hohe Spendervariabilität aufweist, die besonders bei den Transkripten *MMP-1*, *PAI-2* und *PCLP* deutlich wird.

3.2.1 Konfiguration des PIQOR™ Skin 1.0

Zum besseren Verständnis der durchgeführten Analysen werden kurz die Konfiguration des PIQOR™ Skin 1.0, die Art der Hybridisierung und die Form der statistischen Auswertung beschrieben. Die Konfiguration des PIQOR™ Skin 1.0 umfasste 1.376 cDNAs, davon waren sechs „house-keeping“ Gene enthalten. Zusätzlich waren vier DNA-Fragmente aus *E.coli* als Positivkontrollen aufgetragen. Sie wurden in Form von *in vitro* transkribierter RNA zu der zu hybridisierenden RNA gegeben, um den Markierungs- und Hybridisierungsprozess zu kontrollieren. Als Negativkontrollen wurden Heringssperma-DNA und Puffer verwendet. Jede cDNA war vierfach aufgetragen, so dass insgesamt 5.504 Spots vorhanden waren.

3.2.2 Allgemeine Statistik des PIQOR™ - detektierbare und differentiell exprimierte Gene

Ein Expressionsquotient = 1 bedeutet eine Detektion des entsprechenden Transkripts in beiden auf dem Array hybridisierten Proben. Ein Expressionsquotient > 1 bedeutet, dass in der Cy5-markierten Probe (im vorliegenden Fall BL) eine größere Zahl der entsprechenden Transkripte vorhanden ist, als in der Cy3-markierten Probe (hier FL). Ein Expressionsquotient < 1 bedeutet, dass in der Cy3 markierten Probe das entsprechende Transkript in größerer Menge detektiert wird als in der Cy5-markierten Probe. Eine differentielle Expression zwischen 0,5 und 2 wird nicht als differentielle Regulation betrachtet, da durch Technologie und Experiment bedingte Schwankungen in diesem Bereich auftreten können. Der Variationskoeffizient (CV) gibt Auskunft darüber, wie stark die Abweichungen zwischen den Einzelspot-Ratios sind. Wurde für Werte kein Variationskoeffizient angegeben, dann wurden drei der insgesamt vier Replikate „geflaggt“, d. h. von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Kriterien dafür können

Verunreinigungen, zu niedrige Signalintensitäten, die im Bereich des Backgrounds liegen, oder das Fehlen eines Signals sein.

Die statistischen Ergebnisse der Hybridisierung der Poolanalysen sind tabellarisch zusammengestellt (Tab. 3-12). In den vier Hybridisierungen wurden zwischen 309 und 334 cDNAs als exprimiert detektiert. Das entspricht ca. 23 bis 24 % der gesamten cDNAs. Der Prozentwert erklärt sich u. a. durch die hohe Anzahl an Keratinozyten-typischen bzw.-spezifischen Genen des PIQOR™ Skin 1.0.

Zeitpunkt	1 h	2 h	4 h	8 h
Anzahl cDNAs Gesamt	1370	1370	1370	1370
Detektiert	319	309	328	334

Tab. 3-12 Statistik der differentiellen Genexpression der Poolanalyse (bei Cy3 und/oder Cy5 mindestens 2-fach höhere Signalintensität als die Negativkontrollen). Dargestellt sind die Gesamtanzahl der cDNAs und die jeweilige Anzahl an exprimiert identifizierten Transkripten zu den jeweiligen Zeitpunkten der Poolanalyse.

In den Analysen der gepoolten und der einzelnen Spender wurden 56 Transkripte in den beiden Kollagengel-Systemen BL und FL als differentiell exprimiert bewertet, davon wurden 35 in BL und 21 in FL identifiziert (Abb. 3-11). Somit wurden im Mittel ($n = 322,5$; Mittelwert der Anzahl der detektierten Gene der Poolanalysen) ca. 17 % der detektierten Gene differentiell exprimiert. Zur besseren Charakterisierung des biologischen Geschehens, werden die Ergebnisse in zwei Teile gegliedert: Gene, die in den Analysen nur zu einem Zeitpunkt identifiziert wurden, und Gene, die zu zwei oder mehr Zeitpunkten identifiziert wurden. Insgesamt 35 Gene wurden in BL als differentiell detektiert, 24 davon zu einem Zeitpunkt und 11 zu zwei oder mehr Zeitpunkten. In FL wurden 21 Gene als differentiell detektiert. 17 davon zu einem Zeitpunkt und 4 Gene zu zwei oder mehr Zeitpunkten. (Abb. 3-11).

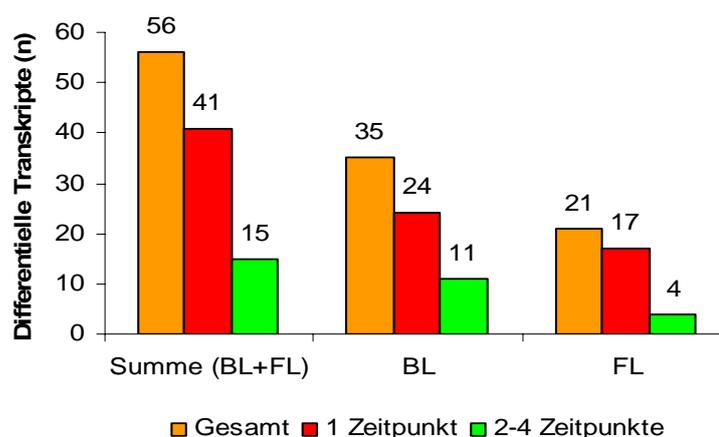


Abb. 3-11 Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte (PIQOR™ Skin 1.0) - Gesamt und für die beiden Kollagengel-Systeme BL und FL. Dargestellt sind die Anzahl der als differentiell bewerteten Transkripte im Gesamten (Summe BL + FL) und in den beiden Kollagengel-Systemen BL und FL aufgegliedert in Gene, die zu einem Zeitpunkt und zu zwei oder mehr Zeitpunkten als differentiell exprimiert bewertet wurden.

Die Verteilung der differentiell exprimierten Gene im Zeitexpressionsprofil zeigt die größte biologische Aktivität nach 1 h und 4 h. Nach 1 h sind 31 Transkripte differentiell exprimiert, davon 19 in BL und 12 in FL. Nach 4 h sind es 21 Transkripte, 12 in BL und 9 in FL. Nach 2 h und 4 h sind in beiden Fällen insgesamt 10 Transkripte differentiell exprimiert, davon nach 8 h alle im BL-System und nach 2 h 7 Transkripte in BL und 3 Transkripte in FL. In der Auswertung wurden die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimierten Transkripte entsprechend mehrfach gezählt (Abb. 3-12).

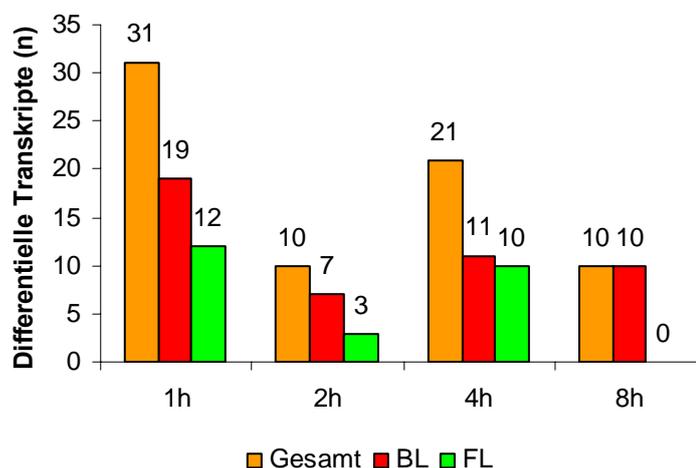


Abb. 3-12 Anzahl der differentiell exprimierten Gene im Zeitexpressionsprofil. Dargestellt ist die Anzahl der als differentiell exprimiert eingestuft Transkripte zu den untersuchten Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h und 8 h) in den beiden Kollagensystemen BL und FL. Zusätzlich wurde für jeden Zeitpunkt die Summe der differentiell exprimierten Transkripte der beiden Systeme (Gesamt) gebildet.

3.2.3 Differentiell exprimierte Transkripte in den Kollagensystemen BL und FL

Zur Charakterisierung der beiden Gelsysteme FL und BL werden im Folgenden die in der Literatur beschriebenen Funktionen der identifizierten differentiell exprimierten Transkripte beschrieben und ihre mögliche Rolle im Zusammenhang mit mechanischem Stress und pathologischen Situationen, in denen mechanischer Stress eine Rolle spielt, dargestellt. Die Darstellung teilt sich in zwei Bereiche auf, die für die beiden Systeme getrennt beschrieben werden:

1. Transkripte, die über mehrere Zeitpunkte differentiell höher exprimiert waren.
2. Transkripte, die zu einem Zeitpunkt differentiell höher exprimiert waren.

Neben der Funktion werden auch die potentiellen Zusammenhänge mit anderen identifizierten Transkripten bzw. Genen erwähnt. Die Ergebnisse der PIQOR™-Analysen sind für die jeweiligen Zeitpunkte tabellarisch zusammengefasst. In einer Übersicht werden die erwähnten Zusammenhänge der einzelnen Gene schematisch dargestellt und diskutiert (Abb. 4-1).

3.2.3.1 Bound Lattice

3.2.3.1.1 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell exprimierte Transkripte in BL

3.2.3.1.1.1 Ab 1 h differentiell in BL

Gen Name	UniGene Nr.	Zeit	I	Einzelspender										Pool		
				409 V	CV (%)	444 V	CV (%)	446 V	CV (%)	449 V	CV (%)	480 V	CV (%)	V	CV (%)	
MAGP2: Microfibril-associated glycoprotein-2	Hs.300946	1h	+	<u>2,78</u>	-	-	-	<u>2,96</u>	54	-	-	-	-	-	-	-
		2h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>2,20</u>	-
		4h	+	<u>2,52</u>	13	<u>2,85</u>	8	1,64	6	<u>2,28</u>	16	<u>5,71</u>	11	-	-	-
		8h												1,24	16	
CD59: CD59 antigen p18-20	Hs.278573	1h	+	<u>2,26</u>	5	<u>2,50</u>	11	<u>2,72</u>	4	<u>2,80</u>	9	<u>2,12</u>	12	1,42	28	
		2h	+	1,56	5	<u>3,01</u>	14	<u>3,08</u>	10	<u>2,95</u>	10	1,85	6	1,21	7	
		4h		1,90	9	1,37	8	1,35	10	1,59	11	<u>2,81</u>	6	1,30	22	
		8h												0,80	17	
CCT2: chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	Hs.189772	1h	+	<u>2,36</u>	14	<u>2,32</u>	4	<u>2,77</u>	11	<u>2,86</u>	10	<u>4,90</u>	8	1,74	21	
		2h	+	1,53	10	<u>4,82</u>	4	<u>3,17</u>	12	<u>3,43</u>	32	1,41	6	1,17	15	
		4h		1,85	5	1,87	7	1,57	11	<u>2,65</u>	12	<u>5,70</u>	11	1,89	26	
		8h												0,91	18	
DDR2: discoidin domain receptor family, member 2	Hs.71891	1h	+	<u>3,52</u>	7	-	-	<u>2,87</u>	10	<u>2,84</u>	11	-	-	1,32	16	
		2h		-	-	<u>4,67</u>	-	-	-	-	-	1,11	9	1,84	12	
		4h	+	<u>2,67</u>	14	1,53	12	1,82	16	<u>2,51</u>	8	<u>3,70</u>	8	<u>2,02</u>	6	
		8h												1,05	16	
GJA1: gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	Hs.74471	1h	+	<u>3,70</u>	6	-	-	<u>2,00</u>	14	<u>3,38</u>	7	-	-	<u>2,13</u>	-	
		2h	+	1,56	23	<u>5,84</u>	-	<u>2,64</u>	27	<u>2,66</u>	10	1,24	6	1,76	50	
		4h		1,29	10	1,08	9	1,70	7	1,98	17	<u>4,25</u>	7	<u>3,25</u>	20	
		8h												0,77	50	
SDCBP: syndecan binding protein (syntenin)	Hs.164067	1h	+	<u>2,64</u>	8	<u>2,01</u>	13	<u>2,89</u>	5	<u>3,46</u>	13	-	-	<u>2,18</u>	5	
		2h	+	1,52	2	<u>3,47</u>	10	<u>3,81</u>	24	<u>2,66</u>	15	1,42	7	1,04	10	
		4h		1,30	6	1,23	3	1,31	9	1,88	6	<u>4,38</u>	4	1,69	18	
		8h												0,75	9	
TRA1: tumor rejection antigen (gp96) 1	Hs.192374	1h	+	<u>4,54</u>	11	-	-	<u>3,24</u>	19	3,84	-	-	-	-	-	
		2h		-	-	-	-	-	-	-	-	1,22	5	1,13	-	
		4h	+	<u>2,08</u>	9	1,13	6	1,90	0	<u>2,38</u>	6	<u>5,05</u>	7	0,84	-	
		8h												1,37	-	
JWA: cytoskeleton related vitamin A responsive protein	Hs.92384	1h	+	<u>2,18</u>	8	<u>2,00</u>	2	<u>2,62</u>	5	<u>2,65</u>	3	1,17	-	1,45	46	
		2h	+	1,60	16	<u>2,79</u>	3	<u>2,96</u>	5	<u>3,35</u>	8	<u>2,13</u>	11	0,91	54	
		4h		1,09	12	1,35	9	1,17	11	1,40	9	<u>3,61</u>	9	<u>2,02</u>	3	
		8h												0,44	47	

Tab. 3-13 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell höher exprimierte Transkripte in BL ab 1 h. Dargestellt sind die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimierten Transkripte in dem BL-System, die nach 1 h erstmals eine differentielle Expression aufzeigen. Die in der Spalte I (induziert) mit + markierten Zeitpunkte kennzeichnen eine differentielle Expression. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP2): *MAGP2* ist eine Komponente von Elastin-assoziierten Mikrofibrillen und *Fibrillin-1* in der EZM, ähnlich dem verwandten *MAGP1*. Elektronenmikroskopische Studien und Färbungen von Geweben mit *MAGP2*-spezifischen Antikörpern zeigten, dass in den Geweben die Verteilung und Assoziation zu *Fibrillin-1* unterschiedlich ist. Die Koordination des Proteins innerhalb der EZM scheint von den Anforderungen des Gewebes abhängig zu sein (Gibson *et al.*, 1998). In Mikrofibrillen besitzt *MAGP2* eine wichtige Rolle und ist wahrscheinlich für Interaktionen mit der Zelloberfläche während der Entwicklung und Differenzierung von Bedeutung (Gibson *et al.*, 1998). *MAGP2* wurde außerdem in Melanomzellen im Zusammenhang mit der Bildung von Metastasen identifiziert (Zebda *et al.*, 1994).

CD59 antigen p18-20 (CD59): *CD59* ist an der Signaltransduktion zur Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Es interagiert mit dem T-Zellen-Oberflächenantigen *CD2* und ist somit Bestandteil inflammatorischer Prozesse (Cole *et al.*, 2003). Eine hohe Expression des auch als *Protectin* bezeichneten Proteins schützt die Zelle nach Verletzungen vor der Lysis (Iborra *et al.*, 2003). Eine spezielle Funktion von *CD59* in Fibroblasten wurde bisher nicht beschrieben.

Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2): *CCT2* ist ein Chaperon, das sich unter anderem durch die Fähigkeit auszeichnet, *beta-Aktin* zu binden und kooperativ dessen Faltung zu fördern (McCormack *et al.*, 2001). Ebenso kann es mit *Cyclin E* interagieren, das als positiver Regulator der G1/S-Phasentransition wirkt (Won *et al.*, 1998).

Discoidin domain receptor family, member 2 (DDR2): Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor für fibrilläres Kollagen ist in Fibroblasten an der Migration und Proliferation beteiligt (Leitinger, 2003). In *DDR2*-(-/-)-Mäusen zeigen die Fibroblasten eine wesentlich schlechtere Migration, Proliferation und eine stark reduzierte *Kollagen-I*-Synthese (Olaso *et al.*, 2002). In PBC (primary biliary cirrhosis), die in einer Fibrose münden kann, ist *DDR2* in den pathologischen Zellen stark überexprimiert (Mao *et al.*, 2002). Ein ähnliches Bild zeigt sich in der rheumatoiden Arthritis. In synovialen Fibroblasten kann ebenfalls eine wesentlich höhere Expression von *DDR2* gemessen werden (Wang *et al.*, 2002). Im Zusammenhang mit mechanischem Stress kann *DDR2* in den dreidimensionalen Kollagengelen eine zentrale Rolle einnehmen. Eine Besonderheit des Rezeptors ist die langsam voranschreitende Autophosphorylierung in einem Zeitraum von 16 bis 24 h (Vogel, 1999), die eine längerfristige Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat.

Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin43) (GJA1): *GJA1* ist ein Bestandteil von Gap Junctions und gehört zu der Gruppe der Connexine. Diese sind durchlässig für Moleküle mit kleinem Molekulargewicht und fördern den Austausch zwischen den Zellen per Diffusion. Bei 3T3-Mausfibroblasten führen mechanische Kräfte (fluid shear stress) zur Clusterbildung von *Connexin43* an Zell-Zell-Verbindungspunkten (Chotard-Ghodsniya *et al.*, 2003). In Endothelzellen führt die mechanische Verletzung der als Monolayer kultivierten Zellen zu einer erhöhten Expression von *Connexin43* (Kwak *et al.*, 2001). Auch in vaskulären glatten Muskelzellen führen mechanische Kräfte zu einer signifikant stärkeren Expression des *Connexin43* (Cowan *et al.*, 1998). Dieses Protein scheint von maßgeblicher Bedeutung bei mechanischen Kräften hinsichtlich des Informationsaustausches durch kleinere Moleküle wie Ca^{2+} und ATP (Stout *et al.*, 2002) sowie von zyklischem AMP zu sein (Chotard-Ghodsniya *et al.*, 2003).

Syndecan binding protein (syntenin) (SDCBP): *SDCBP* besitzt die Fähigkeit, mittels der PDZ-Domäne eine Großzahl an Syndecanen zu binden. Diese bindet an kurze sequenzspezifische Segmente innerhalb der Zielproteine (Im *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). In adhärenen Zell-Zell-Verbindungen vermittelt das Protein Bindungen der Syndecane, z. B. an Proteine des Zytoskeletts und Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion (Zimmermann *et al.*, 2001). Enz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der *metabotropic glutamate receptor (mGluR) type 7* unter anderem mit *Syntenin* und *Filamin A* einen Komplex bildet (Enz *et al.*, 2003). *Filamin A*, das ebenfalls mittels PIQOR™ als differentiell exprimiert identifiziert wurde

(Tab. 3-21), kann mit *Aktin* interagieren und spielt eine wesentliche Rolle in der Organisation des Zytoskeletts (Tseng *et al.*, 2004).

Tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1) (Endoplasmin): *TRAI* ist ein Chaperon, das bei oxidativem Stress von Bedeutung ist (van der Vlies *et al.*, 2002). Die Expression von *Endoplasmin* kann durch *Interleukin 6*, das ebenfalls mittels PIQOR™ in BL als stärker exprimiert identifiziert worden ist (Tab. 3-17), induziert werden (Haverty *et al.*, 1997). Ein weiterer Aspekt ist die Komplexbildung von *Endoplasmin* mit dem *eukaryotic translation initiation factor 2* (*eIF-2*) während der Proteinsynthese (Riera *et al.*, 1999). Ob diesem Komplex bei gestressten Zellen eine größere Bedeutung zukommt, ist nicht bekannt.

Cytoskeleton related, vitamin A responsive protein (JWA) (HSP127): Das mit dem Zytoskelett verbundene heat shock Protein *JWA* kann den MAPK-Pathway aktivieren (Matsuda *et al.*, 2003). In K562-Zellen konnte eine korrelierte Expression von *JWA* und *HSP70* beobachtet werden (Mao *et al.*, 2004). Interessanter Weise wird *HSP70* unter anderem von *HSF1* reguliert (Dai *et al.*, 2003), das ebenfalls mittels PIQOR™ im BL-System als stärker exprimiert identifiziert worden ist (Tab. 3-18). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen den drei Genen *JWA*, *HSP70* und *HSF1* besteht, ist allerdings unklar.

3.2.3.1.1.2 Ab 4 h differentiell in BL

Gen Name	UniGene Nr	Zeit	I	Einzelspender										Pool	
				409 V	CV (%)	444 V	CV (%)	446 V	CV (%)	449 V	CV (%)	480 V	CV (%)	V	CV (%)
CTGF: connective tissue growth factor	Hs.75511	1h		0,99	4	1,13	5	0,73	3	0,89	4	<u>0,27</u>	12	1,05	17
		2h		1,24	6	1,11	4	1,25	14	1,37	6	1,07	2	1,10	17
		4h	+	<u>3,03</u>	10	<u>2,51</u>	6	1,45	10	<u>2,13</u>	6	1,29	4	<u>2,51</u>	11
		8h	+											<u>4,17</u>	33
CYR61: cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Hs.8867	1h		1,08	2	1,27	5	1,31	13	1,03	8	0,51	6	0,87	34
		2h		<u>2,34</u>	12	1,80	10	1,11	7	1,79	2	<u>2,09</u>	6	1,35	21
		4h	+	<u>9,86</u>	18	<u>7,44</u>	9	<u>3,36</u>	20	<u>8,29</u>	19	<u>5,62</u>	14	<u>6,01</u>	21
		8h	+											<u>14,53</u>	-
SERPINB2: serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (PAI2)	Hs.75716	1h		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2h		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4h	+	<u>2,01</u>	13	1,99	11	1,92	0	<u>6,16</u>	73	<u>3,90</u>	0	-	-
		8h	+											<u>3,06</u>	-

Tab. 3-14 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell stärker exprimierte Transkripte in BL ab 4 h. Dargestellt sind die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimierten Transkripte in BL, die nach 4 h erstmals eine differentielle Expression aufzeigen. Die in der Spalte I (induziert) mit + markierten Zeitpunkte kennzeichnen eine differentielle Expression. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Connective tissue growth factor (CTGF): *CTGF* vermittelt in vielen Zelltypen wie Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothel- und Epithelzellen die Zelladhäsion (Ball *et al.*, 2003). Die Rolle von *CTGF* im Zusammenhang mit mechanischen Kräften ist gut untersucht (Schild und Trueb, 2002; Ott *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2004). *Transforming growth factor β 1* (*TGF β 1*) stimuliert die Expression von *CTGF*. In Anwesenheit von mechanischem Stress sind *CTGF* und *TGF β 1* zur Myofibroblasten-Differenzierung und zur Kontraktion der Kollagenmatrix notwendig. *CTGF* alleine ist nicht ausreichend (Schild *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2004).

Dabei scheinen unter anderem mechanische Kräfte über das Zytoskelett Einfluss auf die Expression von *CTGF* zu haben. Bei der mechanischen oder chemisch induzierten Zerstörung der Mikrotubuli wird *rhoA* zur Stabilisierung der Stressfasern aktiviert. Experimentell wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von *rhoA* die Synthese von *CTGF* induziert. Ein weiterer Zusammenhang besteht in der Synthese von *CTGF* und den beiden Formen an *F-* und *G-Aktin*. Nach der Zugabe von *Cytochalasin D*, das *G-Aktin* wieder zerlegt, führte eine Senkung des *G-Aktins* zu einer Erhöhung an *CTGF*, während ein Anstieg an *G-Aktin* mit einer reduzierten *CTGF*-Expression korreliert (Ott *et al.*, 2003). Auch in pathologischen Situationen, wie fibrotischen Prozessen, wird *CTGF* in Koronararterien und in Fibroblasten der Haut überexprimiert (Riser *et al.*, 2000).

Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61): *Cyr61* fördert die Zellproliferation, Chemotaxis, Angiogenese und Zelladhäsion. Ebenso scheint es bei humanen Hautfibroblasten in der Wundheilung durch Erhöhung der Expression einer Vielzahl an Genen beteiligt zu sein. Transkripte, die bei der Angiogenese, inflammatorischen Prozessen und dem Matrix-Remodeling involviert sind (z.B. *VEGA-A*, *VEGA-C*, *MMPI*, *MMP3*, *TIMP1*, *uPA*, *PAI-1* (ebenfalls in BL identifiziert; Tab. 3-18) und die *Integrine alpha-3* und *alpha-5*) (Chen *et al.*, 2001). *Cyr61* kann ebenfalls die Expression der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I* regulieren. Es kann in Zusammenarbeit mit *TGF β 1* die Expression spezifischer Gene antagonistisch, additiv oder synergistisch beeinflussen (Chen *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass mechanischer Stress die Expression von *Cyr61* erhöht. Dabei wirken die *Protein Kinase C* als negatives und *rhoA* als positives Signaltransduktionselement (Tamura *et al.*, 2001).

Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (PAI2) (SERPINB2): *PAI2* ist in Zellen sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert und inhibiert den *urokinase-type plasminogen activator* in Prozessen der Blutgerinnung. Als Inhibitor kann *PAI2* direkt auf die Matrixdegradation oder indirekt durch die Inhibierung der proteolytischen Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen agieren (Kruithof *et al.*, 1995). In mechanisch gestressten 3D-Kollagengelen konnte *PAI-2* bereits identifiziert werden (Kessler *et al.*, 2001).

3.2.3.1.2 Zu einem Zeitpunkt differentiell exprimierte Transkripte in BL

3.2.3.1.2.1 Zu 1 h differentiell in BL

Genname	UniGene Nr	Einzelspender										Pool	
		409		444		446		449		480		V	CV (%)
		V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)		
LAPTM4A : lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha	Hs.111894	<u>2,52</u>	15	2,1	-	<u>3,09</u>	6	<u>2,59</u>	5	-	-	1,4	21
Homo sapiens BTF2p44 mRNA, partial cds.	Hs.191356	<u>2,11</u>	10	-	-	<u>2</u>	9	-	-	-	-	<u>2,6</u>	-
CDC10 : CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae)	Hs.396503	<u>2,65</u>	12	-	-	1,97	1	1,95	1	-	-	<u>2,4</u>	31
ITGB1 : integrin, beta 1	Hs.287797	<u>2,43</u>	6	1,3	-	<u>2,69</u>	10	<u>2,57</u>	17	-	-	2	48
HMGB1 : high-mobility group box 1	Hs.434102	<u>2,5</u>	5	-	-	<u>3,28</u>	10	<u>2,76</u>	11	-	-	1,3	45
DCN : decorin	Hs.156316	1,87	4	<u>2,7</u>	2	<u>2</u>	6	<u>2,43</u>	17	-	-	1,8	25
TP53BP2 : tumor protein p53 binding protein, 2	Hs.44585	<u>2,36</u>	18	-	-	<u>3,55</u>	39	<u>2,51</u>	-	-	-	-	-
ARL6IP : ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	Hs.75249	<u>2,4</u>	11	1,7	-	<u>2,38</u>	10	<u>2,76</u>	9	-	-	-	-
MDH1 : malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Hs.75375	<u>2,99</u>	6	2,6	-	<u>2,62</u>	2	<u>4,78</u>	18	-	-	1,9	13
DAD1 : defender against cell death 1	Hs.82890	1,88	13	<u>2,2</u>	-	<u>2,24</u>	2	1,71	13	<u>2,33</u>	-	1,1	19
STAT1 : signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.21486	<u>2,19</u>	-	-	-	1,89	10	1,74	8	-	-	<u>2,1</u>	-

Tab. 3-15 Zum Zeitpunkt 1 h differentiell stärker exprimierte Transkripte in BL. Dargestellt sind die differentiell exprimierten Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in Prozent) für die Einzelspender-(409, 444, 446, 449 und 480) und die Poolanalyse (Pool) mittels PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4A): *LAPTM4A* ist ein hoch konserviertes Membranprotein in Lysosomen und Endosomen von Säugern. Es scheint an dem Transport kleinerer Moleküle innerhalb der Zelle zwischen dem Zytosol und einzelnen Kompartimenten von Bedeutung zu sein (Hogue *et al.*, 1999).

Homo sapiens BTF2p44 mRNA: *BTF2p44* ist an der Reparatur der DNA während der Transkription der *RNA-Polymerase II* beteiligt. Es kommt in mehreren Kopien im menschlichen Genom vor (Humbert *et al.*, 1994; Mackenzie *et al.*, 1997).

CDC10 cell division cycle 10 homolog (CDC10): Die Funktion von *CDC10* ist in Metazoen noch unklar. In Hefe ist es an der Zytokinese beteiligt (Lippincott *et al.*, 1998). Nach Untersuchungen des Proteins wird aber auch in Metazoen eine Beteiligung dieses Proteins an der Zytokinese und Exozytose postuliert (Sheffield *et al.*, 2003).

Integrin, beta 1 (ITGB1): Der Zellrezeptor *ITGB1* kann durch unterschiedliche α -Untereinheiten eine ganze Reihe von Komponenten der EZM wie *Kollagen*, *Fibronectin* und *Laminin* binden. Er ist maßgeblich an der physikalischen Übertragung von äußeren mechanischen Kräften ins Zellinnere beteiligt. Dabei wird eine direkte mechanische Verbindung des Integrins über Adapterproteine zum Zytoskelett postuliert (Wang *et al.*, 1993). Durch mechanische Stimulation von *ITGB1* können mehrere biologische Prozesse initiiert werden. Die Bildung von Stressfasern, die Exozytose spezieller Proteine (*actin*, *annexin II* und *VI*) und Rezeptoren

(Lee *et al.*, 1993) sowie die Signaltransduktion über Proteine der Signalkaskaden (z. B. *p38*) oder über Transkriptionsfaktoren (z. B. *SP1*) sind die bedeutendsten Prozesse (D'Addario *et al.*, 2002).

High-mobility group box 1 (HMGB1): *HMGB1* bindet an einzelsträngige DNA und hat die Fähigkeit doppelsträngige DNA zu entwinden. Es kann mit Proteinen der HOX-Genfamilie interagieren und die Transkription von Genen fördern, die im Promoterbereich HOX-Elemente enthalten (Zappavigna *et al.*, 1996). Auch die Bindung von Steroidrezeptoren kann durch *HMGB1* gefördert werden (Nordeen *et al.*, 1998).

Decorin (DCN): *Decorin* ist ein kleines Proteoglykan in der EZM, das zu der Familie der strukturbegleitenden Proteoglykane gehört. Zu derselben Familie gehört das *Biglycan*, das ebenfalls mittels PIQOR™ in BL als höher exprimiert identifiziert wurde (Tab. 3-18). Experimentell konnte von Tufvesson *et al.* gezeigt werden, dass durch Stimulation mit diesen beiden Proteoglykanen morphologische Veränderungen induziert werden, die Einfluss auf das Zytoskelett haben (Tufvesson *et al.*, 2003). Die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen *RhoA* und *Rac1* ist bei Veränderungen des Zytoskeletts und bei der Migration von Fibroblasten von Bedeutung (Tufvesson *et al.*, 2003).

Tumor protein p53 binding protein, 2 (TP53BP2): *TP53BP2* spielt eine Rolle bei der Apoptose und im Zellwachstum. Potentiell kann es sowohl *p53* als auch *bcl-2* binden. Die Bindung an *bcl-2* be- bzw. verhindert die Transition G2/M im Zellzyklus (Naumovski *et al.*, 1996). Die durch das Protein *TP53BP2* induzierte Apoptose kann durch Bindung von *NFκB* supprimiert werden (Yang *et al.*, 1999). In primären Neuronen zeigt sich ein anderes Bild. Hier kann das Protein die Apoptose verhindern, indem es die Bildung eines für die Apoptose notwendigen Proteinkomplexes inhibiert (Chen *et al.*, 2003).

ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein (ARF6IP): *ARF6IP* besitzt die Fähigkeit, mit *ADP-ribosylation-like factor-6 (ARF6)*, das zu der Ras-Superfamilie gehört, zu interagieren. In der Hämatopoese scheint dieses Protein potentiell bei der Differenzierung bzw. Reifung, dem Proteintransport, dem Membranverkehr und der Signaltransduktion beteiligt zu sein (Pettersson *et al.*, 2000). Die genaue Funktion in Fibroblasten ist nicht bekannt.

Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) (MDH1): *MDH1* ist ein grundlegendes Enzym im Citratzyklus. Es tritt im Zusammenhang mit oxidativem Stress als differentiell reguliert auf (Baris *et al.*, 2004).

Defender against cell death 1 (DAD1): *DAD1* ist maßgeblich an dem Prozess der Apoptose beteiligt. Es zeigte sich, dass *DAD1*-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind. Der Verlust des Genes verursacht in den Zellen die Einleitung der Apoptose (Nishii *et al.*, 1999). Auch in Keloiden der Haut, die unter anderem von mechanischem Stress gekennzeichnet sind, ist dieses Gen wichtig. Hier ist *DAD1* im Vergleich zu normalen Narben neben weiteren Apoptose-assoziierten Genen stark reprimiert (Sayah *et al.*, 1999).

Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1): *STAT1* ist an der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und Migration beteiligt. Es stellt ein Bindeglied zwischen der Übertragung von äußeren Kräften ins Zellinnere und der Signalweiterleitung dar. Bindeglied im Zellinneren ist die *focal*

adhesion kinase (FAK). Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung von *STAT1* zu einer Steigerung der Zelladhäsion und einer Abnahme der Zellmigration führt (Xie *et al.*, 2001).

3.2.3.1.2.2 Zu 2 h differentiell in BL

Gen Name	UniGene Nr.	Einzelspender										Pool	
		409		444		446		449		480		V	CV (%)
		V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)		
EEF1A1 : Elongation Factor 1 Alpha 1	Hs.422118	1,54	2	<u>3,48</u>	11	<u>2,41</u>	3	<u>5,16</u>	7	1,8	4	1,42	13

Tab. 3-16 Zum Zeitpunkt 2 h differentiell stärker exprimierte Transkripte in BL. Dargestellt sind die differentiell exprimierte Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in %) für die Einzelspender-(409, 444, 446, 449 und 480) und die Poolanalyse (Pool) mittels PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Elongation Factor 1 Alpha (EEF1A1): *EEF1A1* fördert die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-Seite des Ribosoms während der Proteinsynthese. Ein Zusammenhang zwischen mechanischen Kräften oder diversen Formen des Stresses wurde bisher nicht beobachtet.

3.2.3.1.2.3 Zu 4 h differentiell in BL

Gen Name	UniGene Nr.	Einzelspender										Pool	
		409		444		446		449		480		V	CV (%)
		V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)		
XBP1 : X-box binding protein 1	Hs.437638	1,57	9	<u>3,05</u>	3	<u>2,01</u>	5	<u>2,17</u>	14	<u>2,36</u>	17	1,29	25
IL6 : interleukin 6 (interferon, beta 2)	Hs.512234	<u>2,44</u>	9	<u>2,04</u>	4	-	-	<u>2,46</u>	5	-	-	<u>3,56</u>	-
LUM : lumican	Hs.406475	<u>2,06</u>	14	1,7	4	1,42	2	<u>2,91</u>	6	<u>6,43</u>	7	<u>4,4</u>	35
MMP1 : matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	Hs.83169	<u>2,14</u>	6	1,04	4	1,46	1	<u>2,32</u>	11	<u>5,4</u>	7	<u>2,18</u>	26
HSPA1A : heat shock 70kDa protein 1A	Hs.75452	1,56	17	<u>3,12</u>	2	1,44	9	0,67	7	<u>3,65</u>	10	<u>2,69</u>	20

Tab. 3-17 Zum Zeitpunkt 4 h differentiell stärker exprimierte Transkripte in BL. Dargestellt sind die differentiell exprimierte Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in Prozent) für die Einzelspender-(409, 444, 446, 449 und 480) und die Poolanalyse (Pool) mittels PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

X-box binding protein 1 (XBP1): *XBPI* spielt eine entscheidende Rolle in der sog. Endoplasmic Reticulum Stress Response (ERSR) (Yoshida *et al.*, 2001). Induziert werden kann diese Reaktion durch verschiedene Faktoren wie osmolaren, oxidativen oder metabolischen Stress (Mai *et al.*, 1997). Die Bedeutung von *XBPI* konnte an dem Mausmodell des murinen Insulingens, *Ins2*, gezeigt werden. Die dominante Mutation von *Ins2* (*C96Y*) verursacht in Mäusen *Diabetes mellitus*. Eine Reaktion dieser Zellen ist die ERSR, die unter anderem zur verstärkten Expression von Chaperonen wie dem *Endoplasmin* (*TRAI*) führt, das auch in BL mittels PIQOR™ als stärker exprimiert identifiziert wurde (Tab. 3-13). *XBPI* bindet an das sog. *ER Stress Response Element* (ERSE) im Promoterbereich diverser Gene und ist während der ERSR sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene stärker exprimiert (Nozaki *et al.*, 2004).

Interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6): Das Zytokin *IL6* spielt eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Prozessen. Mechanische Kräfte können ebenfalls die Expression von *IL-6* induzieren. In Endothelzellen verursacht der sogenannte *Shear Stress* die Freisetzung von *IL-6* (Sterpetti *et al.*, 1993). In Fibroblasten von Sehnen reicht eine 15 minütige Exposition mit biaxialen Kräften zur Induktion von *IL-6*. Bei Krankheiten mit starken Entzündungsprozessen wie der rheumatoiden Arthritis und der Arthrofibrose, in denen zu mindest sekundär mechanische Kräfte eine Rolle spielen, scheint *IL-6* unter anderem für die erhöhte Proliferation der Fibroblasten verantwortlich zu sein (Skutek *et al.*, 2001).

Lumican (LUM): Das extrazelluläre Proteoglykan *LUM* bindet Laminin. Zellen des *Annulus fibrosus* (bindegewebiger und knorpeliger äußerer Ring der Bandscheibe) reagieren auf eine mechanische Deformation durch statische Kompression mit einer Erhöhung der Genexpression für *Typ I und II Kollagene*, *Aggrecan*, *Biglycan*, *Decorin* und *Lumican* (Chen *et al.*, 2004). Die drei Proteine *Biglycan* (Tab. 3-18), *Decorin* (Tab. 3-15) und *Lumican* (Tab. 3-17) wurden alle mittels PIQOR™ in BL als stärker exprimiert identifiziert. Ursache für die Expression dieser Proteine ist der Abbau kleiner Kollagenfibrillen durch Stress-aktivierte Metalloproteinasen, welchem eine erhöhte Expression von Komponenten der EZM folgt (z. B. *Decorin*, *Biglycan*, *Fibromodulin*, *Lumican*, *Thrombospondin-2* und die *Kollagene I und III*). Dadurch kommt es zur Formierung neuer Fibrillen mit einem größeren Durchmesser (Wang *et al.*, 2003).

Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1): Matrix-Metalloproteinasen werden bei mechanischem Stress zur Reorganisation der EZM stärker exprimiert bzw. aktiviert. In humanen Fibroblasten der Wurzelhaut von Zähnen führen Zentrifugalkräfte auf der mRNA-Ebene zu einer erhöhten Expression von *MMP1* (Redlich *et al.*, 2004). Die Stimulation mit zyklischem mechanischem Stress erhöht die *MMP1*-Sekretion von Fibroblasten des Gebärmutterhalses (Yoshida *et al.*, 2002). Auch bei relaxierenden mechanisch gestressten Fibroblasten in 3D-Kollagengelen ist die *MMP1* hochreguliert (Lambert *et al.*, 1998). Bei Arteriosklerose wurde eine erhöhte Menge und Korrelation der *MMP1* innerhalb des mechanisch gestressten fibrösen Gewebes gezeigt (Lee *et al.*, 1996).

Heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A) (HSP70): In Verbindung mit anderen Chaperonen schützt *HSP70* Proteine vor Aggregation und vermittelt die Faltung neu synthetisierter Proteine sowohl im Zytosol als auch in Organellen. Im Endoplasmatischen Retikulum spielt es eine Rolle als treibende Kraft bei der Proteintranslokation. Die Aktivierung von Chaperonen ist eine charakteristische protektive Antwort von Zellen auf verschiedene Stressformen (Drabent *et al.*, 1986). Reguliert wird dieses Programm von dem *heat shock factor 1 (HSF1)*. In murinen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass *CHIP (C-terminus of Hsp70-interacting protein)* die Aktivierung der Stress-Chaperone durch die Trimerisierung und transkriptionelle Aktivierung von *HSF1* induzieren und protektiv gegen die Stress-induzierte Apoptose wirken (Dai *et al.*, 2003). *HSF1* wurde mittels PIQOR™ ebenfalls im BL-System als stärker exprimiert identifiziert (Tab. 3-18).

3.2.3.1.3.4 Zu 8 h differentiell in BL

Gen Name	UniGene Nr	Pool	
		V	CV (%)
ENIGMA: enigma (LIM domain protein)	Hs.436339	<u>2,12</u>	19
PGF: placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	Hs.252820	<u>2,27</u>	22
HSF1: heat shock transcription factor 1	Hs.132625	<u>2</u>	10
SERPINE1: serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin), member 1 (PAI1)	Hs.82085	<u>2,05</u>	3
BGN: biglycan	Hs.821	<u>2,29</u>	13
CCND1: cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	Hs.371468	<u>2,01</u>	21
CREB3L1: cAMP responsive element binding protein 3-like 1	Hs.405961	<u>2,48</u>	15

Tab. 3-18 Zum Zeitpunkt 8 h differentiell stärker exprimierte Transkripte in BL. Dargestellt sind die differentiell exprimierten Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in Prozent) für die Poolanalyse (Pool) per PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Enigma (LIM domain protein) (ENIGMA): *ENIGMA* wurde als potentieller Bindungspartner des Insulinrezeptors (InsR) identifiziert und enthält zwei LIM-Domänen (Wu und Gill, 1994). Die postulierte Funktion der LIM-Domänen umfasst die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen, die sowohl im Zellkern und Zytoplasma als auch innerhalb des Zytoskeletts von Bedeutung sind (Wu und Gill, 1994).

Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein (PGF): Der Wachstumsfaktor *PGF* ist innerhalb der Angiogenese und dem Wachstum von Endothelzellen aktiv. Er fördert die Proliferation und Migration (Park *et al.*, 1994). Exogenes *PGF* induziert die spezifische Aktivierung des *stress-activated protein kinase-* (SAPK-) Pathways, *c-Jun-N terminal kinase (JNK)* und *p38 kinase* in primären Trophoblasten. Die Aktivierung des SAPK-Pathways schützt Trophoblasten vor Apoptose, allerdings nicht vor derjenigen, die durch proinflammatorische Zytokine, *Interferon gamma* oder *Tumor necrosis factor alpha* induziert ist (Desai *et al.*, 1999).

Heat shock transcription factor 1 (HSF1): *HSF1* reguliert die Expression von *HSP70* (ebenfalls im BL-System identifiziert; Tab. 3-17) in gestressten Zellen und schützt vor Apoptose (Dai *et al.*, 2003). In embryonalen Sehnervenzellen von Hühnern konnte eine Beziehung zwischen dem Chaperon *Hsp47*, *Prokollagen Type I* und *HSF1* in Stresssituationen wie erhöhter Temperatur und mechanischem Stress belegt werden. Mechanischer Stress erhöht die mRNA-Expression von *Hsp47* und dessen Proteinsynthese. *Hsp47* ist ein Kollagen-bindendes Stressprotein, das als Kollagen-spezifisches Chaperon während der Biosynthese und Sekretion von Prokollagen fungiert. Die Induktion der Proteinexpression von *Hsp47* durch Hitzeschock, mechanischen Stress und *TGFβ1* wird von der Aktivierung und Translokation von *HSF1* in den Zellkern begleitet (Pan *et al.*, 2003). In vaskulären glatten Muskelzellen führt zyklischer mechanischer Stress zur Expression von *Hsp70*, die durch *HSF1* vermittelt wird (Xu *et al.*, 2000). Auch bei der Arteriosklerose konnte eine Beziehung zu *HSF1* gezeigt werden. In Läsionen wurden in Proteinextrakten Hitzeschock-Komplexe, die *HSF1* enthalten, nachgewiesen. Weitere Untersuchungen an glatten Muskelzellen belegen

nach der mechanischen Dehnung der Zellen eine *HSF1*-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern, begleitet von einer Hyperphosphorylierung und einer verstärkten *HSP70*-Expression (Metzler *et al.*, 2003).

Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin), member 1 (PAI1) (SERPINE1): Wie *PAI2* (Tab. 3-14) gehört auch *PAI1* zu den Inhibitoren innerhalb der Plasminogen-Aktivierung und kann durch die Inhibierung von Proteasen Einfluss auf den Abbau der EZM nehmen (Lee *et al.*, 1996). Dieses Gen wurde bereits in mechanisch gestressten 3D-Kollagengelen als differentiell exprimiert beschrieben (Kessler *et al.*, 2001).

Biglycan (BGN): *Biglycan* ist innerhalb der EZM für die Anordnung der Kollagenfasern verantwortlich. Es ist bei mechanischem Stress häufig hochreguliert, um die Homöostase durch Neuordnung der Kollagene wiederherzustellen (Wang *et al.*, 2003). Vaskuläre glatte Muskelzellen (Lee *et al.*, 2001), Bandscheibenzellen aus dem Bereich des *Annulus Fibrosus* (Rannou *et al.*, 2003) oder Zellen aus Sehnen zeigen nach einer mechanischen Stimulation eine Überexpression von *Biglycan* (Robbins *et al.*, 1997).

Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1) (CCND1): *CyclinD1* ist essentiell für die Kontrolle der G1/S-Transition. In Podozyten senkt eine mechanische Dehnung den mRNA- und Proteinlevel der *Zykline D1, A* und *B1* innerhalb von 24 h (Petermann *et al.*, 2002). Allerdings scheint neben der mechanischen Stimulation vor allen Dingen die Zellform entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus zu haben. Endothelzellen, bei denen eine reguläre Spreizung inhibiert wird, können nicht in die Synthesephase eintreten (Huang *et al.*, 1998). Da in diesem Fall *CyclinD1* im BL- System hochreguliert ist, scheint nicht die mechanische Stimulation, sondern die Zellform Einfluss auf die *CyclinD1*-Expression zu nehmen.

cAMP responsive element binding protein 3-like 1 (OASIS) (CREB3L1): *CREB3L1* gehört zu der CREB/ATF-Familie und spielt unter anderem in der embryonalen Knochenentwicklung bei Mäusen eine essentielle Rolle (Nikaido *et al.*, 2001). Dabei scheint *OASIS* ein regulatives Element für potentiell downstream-gelegene Proteoglykane zu sein. *Decorin*, *Biglycan*, *Syndecan-1* und *Syndecan-3* zeigen in Mäusen eine mit *OASIS* überlappende Genexpression (Hikake *et al.*, 2003).

3.2.3.2 Free Lattice

3.2.3.2.1 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell exprimierte Transkripte in FL

Gen Name	UniGene Nr	Zeit	I	Einzelspender										Pool	
				409 V	CV (%)	444 V	CV (%)	446 V	CV (%)	449 V	CV (%)	480 V	CV (%)	V	CV (%)
MAGED2: melanoma antigen, family D, 2	Hs.376719	1h	+	<u>0,32</u>	5	<u>0,39</u>	16	<u>0,28</u>	7	<u>0,22</u>	7	0,17	59	1,10	18
		2h	+	<u>0,32</u>	7	<u>0,33</u>	2	<u>0,32</u>	5	-	-	<u>0,38</u>	8	0,86	12
		4h		<u>0,35</u>	9	0,68	5	0,58	8	<u>0,42</u>	11	0,57	4	1,57	28
		8h												0,75	15
IGFBP4: insulin-like growth factor binding protein 4	Hs.1516	1h	+	0,52	9	-	-	<u>0,37</u>	12	<u>0,32</u>	21	<u>0,07</u>	37	0,90	23
		2h		-	-	0,52	2	<u>0,40</u>	11	-	-	<u>0,42</u>	16	0,87	11
		4h	+	<u>0,46</u>	10	0,52	3	0,56	2	<u>0,35</u>	3	<u>0,46</u>	8	<u>0,47</u>	21
		8h												1,55	8
PTRF: polymerase I and transcript release factor	Hs.437191	1h	+	<u>0,37</u>	5	<u>0,49</u>	5	<u>0,28</u>	4	<u>0,34</u>	7	<u>0,06</u>	59	0,63	35
		2h	+	<u>0,47</u>	11	<u>0,45</u>	4	<u>0,36</u>	10	<u>0,43</u>	7	<u>0,47</u>	10	0,65	25
		4h		<u>0,50</u>	9	0,73	8	0,73	2	0,53	11	0,60	7	0,99	15
		8h												1,03	45
EF1D: (EEF1D OR EF1D) Elongation Factor 1- Delta (EF-1-DELTA)	Hs.438947	1h	+	<u>0,38</u>	12	-	-	<u>0,49</u>	8	<u>0,34</u>	37	<u>0,29</u>	9	0,82	28
		2h	+	<u>0,45</u>	0	<u>0,45</u>	3	<u>0,41</u>	7	-	-	0,53	11	0,74	14
		4h		0,53	9	0,61	3	0,64	2	<u>0,46</u>	4	<u>0,42</u>	11	0,92	19
		8h												0,95	15

Tab. 3-19 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell stärker exprimierte Transkripte in FL ab 1 h. Dargestellt sind die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimierten Transkripte im FL-System, die nach 1 h erstmals eine differentielle Expression aufzeigen. Die in der Spalte I (induziert) mit + markierten Zeitpunkte kennzeichnen eine differentielle Expression. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Melanoma antigen, family D, 2 (MAGED2): Gene der MAGE-Familie kodieren für Antigene, die bei vielen humanen Tumoren von T-Zellen erkannt werden und Tumor-spezifisch sind. Diese Gene werden außer in männlichen Keimbahnzellen nicht von adulten Zellen exprimiert. *MAGED2* bildet eine Ausnahme, da es in den humanen Geweben ubiquitär exprimiert wird (Lucas *et al.*, 1999). Es wurde in verschiedenen Krebsarten als differentiell exprimiert identifiziert. In der kolorektalen Karzinogenese ist *MAGED2* mit der Bildung von Metastasen assoziiert. (Li *et al.*, 2004).

Insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4): Die IGF- (Insulin-like growth factor-) bindenden Proteine können wachstumsfördernde Effekte sowohl inhibieren als auch unterstützen. Dabei verändern sie die Interaktionen von IGFs mit ihren Zelloberflächenrezeptoren. *IGFBP4* wird unter anderem in Knochenzellen produziert und scheint dort als ein potentieller Inhibitor von *IGF* zu wirken (Zazzi *et al.*, 1998). In Kultur gehaltene Endothelzellen produzieren ebenfalls *IGFBPs* (Moser *et al.*, 1992). In der menschlichen Zunge stimuliert *IGFI* die Differenzierung der Myoblasten und induziert die Expression von endogenem *IGFBP4*, 5 und 6. Die Konzentration an freien *IGF* scheint die Differenzierung der Myoblasten abhängig von *IGFBP4* zu regulieren (Yamane *et al.*, 2002). *IGFBP4* spielt ebenfalls in der Transition von der Proliferation hin zur Differenzierung in der Dickdarmkrebs-Zelllinie *CaCo2* eine entscheidende Rolle. Dabei scheint das *activator protein 1 (AP1)* wichtig zu sein (Shen *et al.*, 2004).

Polymerase I and transcript release factor (PTRF): Allgemein fördert *PTRF* die Reinitiation der *Polymerase I* während der Transkription ribosomaler Gene (Jansa *et al.*, 2001). Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems wurde *PTRF* als Bindungspartner von *BFCOL1* (*binding factor of a type-I*

collagen promoter zinc-finger transcription factor) identifiziert, das die beiden murinen proximalen Promotoren des *Kollagen-I*-Gens binden kann. Rekombinantes *PTRF* fördert die Bindung von *BFCOL1* an den murinen proximalen *Pro- α 2(I)*-Kollagen-Promoter. Die transiente Transfektion von *PTRF* hatte einen suppressiven Effekt auf die Expression von *Pro- α 2(I)*-Kollagen (Hasegawa *et al.*, 2000).

Elongation Factor 1-Delta (EEF1D OR EF1D) (EF-1-DELTA) (EF1D): *EF1D* und das Homolog *EF1- β* vermitteln den Nukleotidaustausch im *elongation factor I*-Komplex und interagieren mit *EF1 gamma*, einer weiteren Komponente des *elongation factor I* (van Damme *et al.*, 1990). Eine differentielle Regulation durch mechanische Kräfte wurde bislang nicht beschrieben.

3.2.3.2.2 Zu einem Zeitpunkt differentiell in FL

3.2.3.2.2.1 Zu 1 h differentiell in FL

Genname	UniGene Nr	Einzelspender										Pool	
		409		444		446		449		480		V	CV (%)
		V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)
FKBP8: FK506 binding protein 8, 38kDa	Hs.173464	<u>0,34</u>	20	-	-	<u>0,32</u>	-	<u>0,06</u>	-	<u>0,12</u>	44	0,5	47
COL6A1: collagen, type VI, alpha 1	Hs.415997	<u>0,46</u>	6	0,6	4	<u>0,49</u>	10	<u>0,43</u>	7	<u>0,23</u>	9	0,8	10
FOSL2: FOS-like antigen 2	Hs.301612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,4</u>	37
JUNB: jun B proto-oncogene	Hs.400124	0,63	2	-	-	<u>0,46</u>	2	<u>0,45</u>	14	<u>0,15</u>	13	0,9	30
TAGLN: transgelin	Hs.410977	<u>0,45</u>	6	0,7	11	<u>0,44</u>	3	<u>0,38</u>	9	0,73	8	0,9	20
SPRR2C: small proline-rich protein 2C	Hs.2421	0,53	6	-	-	<u>0,47</u>	4	<u>0,39</u>	-	<u>0,27</u>	12	0,9	23
CORO1B: coronin, actin binding protein, 1B	Hs.6191	<u>0,45</u>	9	-	-	<u>0,39</u>	8	<u>0,26</u>	23	<u>0,37</u>	18	0,8	18
MVP: major vault protein	Hs.80680	<u>0,29</u>	8	-	-	<u>0,47</u>	-	<u>0,28</u>	14	<u>0,4</u>	11	1	26

Tab. 3-20 Zu dem Zeitpunkt 1 h differentiell höher exprimierte Transkripte in FL. Dargestellt sind die differentiell exprimierten Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in Prozent) für die Einzelspender-(409, 444, 446, 449 und 480) und Poolanalyse (Pool) mittels PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

FK506 binding protein 8, 38kDa (FKBP8): *Fkbp8* gehört zu der FK-506-binding protein- (FKBP-) Genfamilie und ist in aggressiven Tumoren herunterreguliert. Experimentell konnten *Syndecan1* (*Sdc1*) und die *Matrix Metalloproteinase 9* (*MMP9*), als von den beiden Genen *Fkbp1a* und *Fkbp8a* direkt reguliert, identifiziert werden. Die *FKBP*-Genexpression induziert die Expression des antiinvasiven *Sdc1*-Gens und suppremiert die proinvasive *MMP9* (Fong *et al.*, 2003).

Collagen, type VI, alpha 1 (COL6A1): s. FL zu einem Zeitpunkt differentiell nach 4 h (s. 3.2.3.2.2.2).

FOS-like antigen 2 (FOSL2): *FOSL2* spielt eine Rolle in der Zelltransformation und Tumorsuppression. Diese Funktionen werden wahrscheinlich durch die stärkere und durch *JDP2* induzierte Expression von *JunB* (ebenfalls im FL-System als höher exprimiert identifiziert; Tab. 3-20), *JunD* und *Fra2* sowie der Senkung der *c-Jun*-Expression durch die Generierung von *API*-inhibierenden Komplexen vermittelt (Heinrich *et al.*, 2004). Ein weiterer Zusammenhang besteht in der Myoblasten-Differenzierung. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Kooperation von *c-Fos* and *Fra2* mit *c-Jun* in beide Richtungen in Abhängigkeit

von der Expression weiterer Kooperationspartner Einfluss auf die Myoblasten-Differenzierung nehmen kann (Daury *et al.*, 2001).

Jun B proto-oncogene (JUNB): *JunB* ist ein Transkriptionsfaktor, der in mechanischen Prozessen (Black *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 2004) und der Myoblastendifferenzierung (Rauch *et al.*, 2002) beteiligt ist. Die Transdifferenzierung eines Myoblasten zu einem Osteoblasten regelt unter anderem das *bone morphogenetic protein 2 (BMP2) signaling protein*. Maßgeblich ist dabei die Inhibierung der Endozytose von exogenem *BMP2*. Experimentell konnte belegt werden, dass die chemische und mechanische Inhibierung der Endozytose von *BMP2* über die *smad1*-abhängige Expression des *JunB*-Gens, welche den ersten Schritt in der Myoblasten-Dedifferenzierung auf der Transkriptionsebene darstellt, zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von *JunB* führte. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beleg dafür, dass die mechanische Deformation eines Gewebes zu einer veränderten Genexpression führen kann (Rauch *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von *JunB* im Zusammenhang mit mechanischen Kräften ist die Expression von *alpha smooth muscle actin (α -sma)* in der kardialen Hypertrophie. In diesem Fall gilt *α -sma* als molekularer Marker für die durch überhöhten Druck entstehende Hypertrophie. Die Induktion von *α -sma* wird nach der arteriellen Abschnürung inhibiert, während *c-Jun* und *JunB* eine signifikant stärkere Expression zeigten (Black *et al.*, 1991). Primäre Muskelzellen der Ratte zeigen nach dem Aussäen auf *Kollagen-I*-beschichteten flexiblen Platten und einer statischen Dehnung eine Induktion der Expression von *c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *c-jun* sowie *junB*. Die Expression von *c-fos* und *junB* ist bereits nach 30 min maximal induziert (Mitchell *et al.*, 2004).

Transgelin (TAGLN): *Transgelin* ist ein Aktin-vernetzendes Protein, das an den kontraktilen Eigenschaften der Zelle beteiligt ist und sensitiv auf mechanische Kräfte reagiert (Zeidan *et al.*, 2004). Experimentell konnte belegt werden, dass die Inhibition der *RhoA*-Aktivität, die Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2*, das Wachstum sowie die Synthese von *Aktin* und *Transgelin* reduziert (Zeidan *et al.*, 2003).

Das *Aortic carboxypeptidase-like Protein (ACLP)* ist ein sekretiertes Protein, das mit der EZM assoziiert und während der Differenzierung von glatten Muskelzellen induziert ist. Die Überexpression von *ACLP* fördert die Transdifferenzierung von Präadipozyten in glatte Muskel-ähnliche Zellen, die Markergene wie *Transgelin* und *α -sma* exprimieren (Abderrahim *et al.*, 2004). *TGF β* scheint in der Regulation von *Transgelin* beteiligt zu sein (Chen *et al.*, 2003).

Paired mesoderm homeobox protein 1 (MHox) (PMX1): *PMX1* ist ein transkriptioneller Regulator der *muscle creatine kinase (MCK)* und spielt eine Rolle in der Etablierung diverser mesodermaler Muskeltypen (Cserjesi *et al.*, 1994). In glatten Muskelzellen scheint *PMX1* einen positiven Einfluss auf die Expression von *α -sma* zu haben (Hautmann *et al.*, 1997).

Coronin, actin binding protein, 1B (CORO1B): *Coronin* ist bei der Zytokinese, der Zellmotilität und der Phagozytose von Bedeutung (Asano *et al.*, 2001). In Fibroblasten und *HEK 293*-Zellen (humane embryonale Nierenepithelzellen) ist es sowohl im Zytosol als auch im submembranen Zytoskelett zu finden, speziell in Lamellipodien (Spoerl *et al.*, 2002).

Major vault protein (MVP): *MVP* spielt eine Rolle in den sogenannten Vaults, die sich aus vielen Untereinheiten zusammensetzen und im Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma von Bedeutung sind. Die fassförmigen Vaults setzen sich aus dem *major vault* Protein (MVP), zwei *minor vault* Proteinen [*telomerase-associated protein 1 (TEP1)* und *vault poly-(ADP-ribose)-polymerase (VPARP)*] und kleinen nicht translatierten RNA-Molekülen zusammen. Es konnte ein Einfluss der Mikrotubuli auf die Effizienz der Vault-Formierung gezeigt werden (van Zon *et al.*, 2003).

3.2.3.2.2.2 Zu 4 h differentiell in FL

Gen Name	UniGene Nr.	Einzelspender										Pool	
		409		444		446		449		480		V	CV (%)
		V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)	V	CV (%)		
FLNA: filamin A, alpha (actin binding protein 280)	Hs.195464	0,51	12	0,55	9	<u>0,47</u>	7	<u>0,42</u>	8	<u>0,42</u>	12	0,55	20
CNN1: calponin 1, basic, smooth muscle	Hs.21223	<u>0,5</u>	12	0,6	1	0,64	0	<u>0,39</u>	0	<u>0,42</u>	8	1,12	27
Homo sapiens fetal thymus prothymosin alpha mRNA, complete cds	Hs.264317	0,54	17	<u>0,5</u>	3	0,53	10	<u>0,44</u>	17	<u>0,47</u>	10	1,3	21
COL6A2: collagen, type VI, alpha 2	Hs.420269	<u>0,34</u>	10	0,56	4	<u>0,46</u>	5	<u>0,39</u>	6	<u>0,36</u>	7	0,67	23
ATP5D: ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	Hs.89761	<u>0,5</u>	8	<u>0,48</u>	7	<u>0,48</u>	6	<u>0,35</u>	12	<u>0,3</u>	10	0,58	29
COL1A1: collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	0,52	5	0,56	2	0,56	10	<u>0,48</u>	10	<u>0,46</u>	12	<u>0,31</u>	23
HBB: hemoglobin, beta	Hs.155376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,41</u>	26
HIC1: hypermethylated in cancer 1	Hs.72956	-	-	0,53	7	-	-	-	-	-	-	<u>0,43</u>	27
HBA2: hemoglobin, alpha 2	Hs.398636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,48</u>	29

Tab. 3-21 Zum Zeitpunkt 4 h differentiell stärker exprimierte Transkripte im FL-System. Dargestellt sind die differentiell exprimierten Transkripte und die zugehörigen Quotienten inklusive der CV-Werte (CV in Prozent) für die Einzelspender-(409, 444, 446, 449 und 480) und Poolanalyse (Pool) mittels PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array. Statistisch signifikante Werte sind unterstrichen.

Filamin A, alpha (actin binding protein 280) (FLNA): *Filamin A* verankert Transmembranproteine mit dem *Aktin*-Zytoskelett und dient als Gerüst für eine Vielzahl von zytoplasmatischen Signalproteinen. Es spielt eine Rolle in der mechanischen Stabilität der Plasmamembran, der Zellform, der mechanischen Zellantwort und der Zelllokomotion (Yamazaki *et al.*, 2002). Bei großen Deformationen des Zytoskeletts werden die *F-Aktin*-Netzwerke bei einer geringen *Filamin*-Konzentration „weicher“ und bei einer hohen Konzentration dem entsprechend „härter“. Die physikalische Beschaffenheit des Zytoskeletts ist also von der Konzentration an gebundenem *FilaminA* abhängig (Tseng *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass mechanisch mit Kollagen-beschichteten magnetischen Beads über den Rezeptor *Integrin β1* stimulierte Fibroblasten eine erhöhte Expression von *Filamin A* zeigen (D'Addario *et al.*, 2002).

Calponin 1, basic, smooth muscle (CNN1): *Calponin* ist ein dünnes Filament-assoziiertes Protein, das in der Kontraktion von glatten Muskelzellen von Bedeutung ist. Es kann *Aktin*, *Calmodulin*, *Troponin C* und *Tropomyosin* binden (Gusev, 2001). Im Zusammenhang mit mechanischen Kräften scheint die Regulation von *Calponin* vom Phänotyp abhängig zu sein. In vaskulären glatten Muskelzellen hatte zyklischer

mechanischer Stress keinen Einfluss auf die *Calponin*-Expression (Birukov *et al.*, 1995). Bei Zellen hingegen, die *alpha-Aktin*, *Myosin*, *Calponin* und *Osteopontin* stark exprimieren, wurde eine signifikante Reaktion auf den Pulsdruck festgestellt (Cappadona *et al.*, 1999).

Homo sapiens fetal thymus prothymosin alpha: *Prothymosin alpha* scheint unter anderem Immunfunktionen zur Erhöhung der Resistenz der Zelle gegen opportunistische Infektionen zu vermitteln. Ebenfalls ist es in der Proliferation und im Zellwachstum von Bedeutung (Eschenfeldt und Berger, 1986). Neuere Studien zeigen, dass dem *Prothymosin alpha* ebenfalls eine Rolle in der Adhäsion und Migration während der Bildung von Metastasen zukommt (Hapke *et al.*, 2003).

ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit (ATP5D): *ATP5D* ist an der Synthese von ATP aus ADP mit Hilfe des Protonengradienten in Mitochondrien beteiligt (Jordan und Breen, 1992). Im Zusammenhang mit mechanischen Kräften konnte dieses Gen nicht identifiziert werden. Allerdings zeigten Adenokarzinome der Lunge eine erhöhte Expression, was einen Rückschluss auf eine Rolle beim oxidativen Stress zulässt (Chen *et al.*, 2002).

Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1) und Collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2): Die *Kollagene I* und *VI* sind maßgeblich an der Struktur der EZM beteiligt. Wie bereits beschrieben, induzieren veränderte mechanische Einwirkungen die Synthese von Komponenten oder Regulatoren der EZM. *Kollagen I*, das die Hauptkomponente der EZM in der Haut darstellt, ist mit *Kollagen VI* verbunden (Groma, 1998). *Kollagen VI* fungiert dabei als Brückenglied, da es die Formation von *Fibronektin* beeinflusst (Ognibene *et al.*, 1998). Auffällig ist, dass mit den beiden genannten Kollagenen im FL-System zu einem frühen Zeitpunkt zwei Transkripte identifiziert wurden, die später in mechanisch gestressten Systemen höher exprimiert sind (Lambert *et al.*, 1992).

Hemoglobin, beta (HBB): und Hemoglobin, alpha 2 (HBA2): *HBA2* dient in den Erythrozyten als kurzfristiger Sauerstoffspeicher. Dabei spielt *HBA2* eine Rolle im oxidativen Stress, allgemein bei Redoxreaktionen oder durch die Bindung von radikalen Zwischenprodukten. Ein Beispiel ist die Bindung von NO, das unter anderem beim sogenannten *Shear Stress* von glatten Muskelzellen produziert wird (Kavdia und Popel, 2003).

Hypermethylated in cancer 1 (HIC1): *HIC1* ist ein Transkriptionsfaktor der ubiquitär in Geweben exprimiert wird. In verschiedenen Tumorzellen ist *HIC1* allerdings stark supprimiert und hypermethyliert. Eine *p53*-Bindungsstelle lässt vermuten, dass *HIC1* ein Tumor-Supressor-Gen ist (Wales *et al.*, 1995).

3.2.4 Validierung der PIQOR™-Analysen mittels semiquantitativer PCR

Zur Validierung der PIQOR™-Analysen wurden die Ergebnisse an einzelnen Spendern mit ausgewählten Transkripten überprüft. Als Beispiel sind die Ergebnisse der semiquantitativen PCR von *Cyr61* graphisch dargestellt (Abb. 3-13 A und B). Der Vergleich der Ergebnisse von Q-PCR, den Array-Daten der Einzelspender (PIQOR SP) und der gepoolten Analyse (PIQOR Pool) bestätigen die Messwerte im Trend. Ausgehend von dem 1 h-Wert steigt die Expression von *Cyr61* im BL-System.

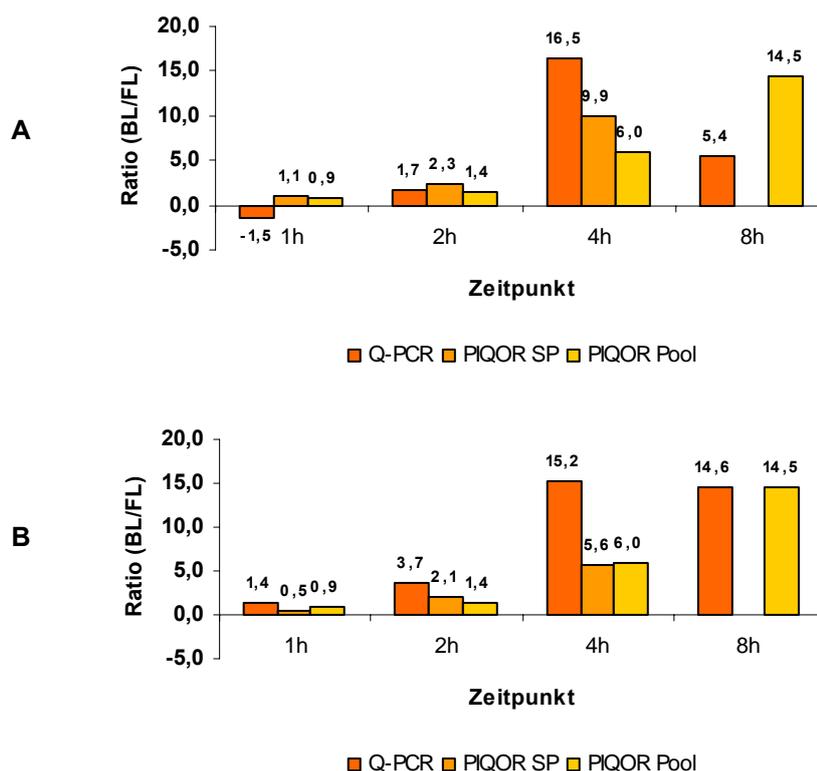


Abb. 3-13 (A und B). Validierung des PIQOR™ Skin 1.0 mittels Q-PCR – Beispiel *Cyr61*. An zwei Spendern wurde die relative differentielle Expression des Transkripts *Cyr61* zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h und 8h analysiert. Die Diagramme geben die gemessenen relativen Expressionsquotienten BL/FL wieder. **A** Spender 480; **B** Spender 409.

Zur weiteren Validierung wurden die Transkripte *gap junction protein alpha 1 43kDa (connexin 43)*, *connective tissue growth factor (CTGF)*, *cytoskeleton related vitamin A responsive protein (JWA)* und *ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein (ARL6IP)* zu einzelnen Zeitpunkten und bei verschiedenen zufällig ausgewählten Spendern analysiert (Tab. 3-22). Auch hier wurden die Ergebnisse des PIQOR™ der Einzelspenderanalyse bestätigt.

Gen	UniGene N.r	SP	1 h			2 h			4 h			8 h	
			Q-PCR	PSP	PP	Q-PCR	PSP	PP	Q-PCR	PSP	PP	Q-PCR	PP
GJA1: gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	Hs.74471	409							3,49	-	3,25		
		449							2,92	1,98	3,25		
		480	5,48	-	2,13	1,77	1,14	1,76	3,05	4,25	3,25	0,77	-1,21
CTGF: connective tissue growth factor	Hs.75511							3,66	3,03	2,51			
CYR61: cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Hs.8867	409	-	1,08	0,87	1,71	2,34	1,35	16,45	9,86	6,01	5,44	14,53
		449	1,41	1,03	0,87	3,78	1,79	1,35	15,14	8,29	6,01	-	14,53
		480	1,41	0,51	0,87	3,73	2,09	1,35	14,88	5,62	6,01	14,62	14,53
JWA: cytoskeleton related vitamin A responsive protein	Hs.301612	449				2,27	3,35	0,91	1,3	1,4	2,02		
ARL6IP: ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	Hs.21486	480							10,08	5,05	2,76	2,35	0,75

Tab. 3-22 Zusammenfassung der Ergebnisse der Validierung der PIQOR™-Analysen mittels Q-PCR. Die Transkripte *gap junction protein alpha 1 43kDa (connexin 43)*, *connective tissue growth factor (CTGF)*, *cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61)*, *cytoskeleton related vitamin A responsive protein (JWA)* und *ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein (ARL6IP)* wurden zu einzelnen Zeitpunkten mittels semiquantitativer PCR analysiert und mit den Daten der PIQOR™-Analysen der Einzelspender (**PSP**) und der gepoolten Spender (**PP**) verglichen.

4 Diskussion

4.1 Einfluss mechanischer Kräfte im BL- und im FL-System

Neben der Beschreibung der Funktionen der einzelnen Gene (s. 3.2.3) besteht die Möglichkeit, die Gene zu den einzelnen Zeitpunkten als Gruppe zu betrachten und aus den beschriebenen Funktionen einen Rückschluss auf die biologische Aktivität zu ziehen. Aus diesem Grund sind die identifizierten Transkripte nach den einzelnen Zeitpunkten geordnet und stichwortartig die Funktion bzw. der Funktionsbereich beschrieben worden (Tab. 4-1 bis 4-6). Zur besseren Übersicht wurden die Transkripte in die beiden Gruppen „zu einem Zeitpunkt differentiell“ und „zu mehreren Zeitpunkten differentiell“ aufgeteilt.

4.1.1 Zu mehreren Zeitpunkten differentiell

4.1.1.1 Ab 1 h differentiell

Gen Name	Funktionsbereich/Funktion	Induziert zu			
		1h	2h	4h	8h
CD59: CD59 antigen p18-20	Oberflächenzellrezeptor; Interaktion mit CD2 von T-Zellen; inflammatorisch	+	+		
CCT2: chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	Chaperon (für Aktin und Tubulin); Interaktion mit CyclinE	+	+		
DDR2: discoidin domain receptor family, member 2	Oberflächenzellrezeptor; Kollagen-bindend und regulierend	+			+
GJA1: gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	Gap junction; Zellkommunikation durch kleine Moleküle	+	+		
SDCBP: syndecan binding protein (syntenin)	Bindet Syndecane; vermittelt Kontakte zum Zytoskelett mittels FilaminA	+	+		
TRA1: tumor rejection antigen (gp96) 1	Chaperon	+			+
JWA: cytoskeleton related vitamin A responsive protein	Zytoskelett	+	+		
MAGP2: Microfibril-associated glycoprotein-2	EZM; Elastin-assoziiert	+	+		+
MAGED2: melanoma antigen, family D, 2	Hochreguliert in Metastasen	+	+		
IGFBP4: insulin-like growth factor binding protein 4	Wachstumsfaktor bindend; Inhibitor von IGFs; Einfluss auf Myoblastendifferenzierung	+			+
PTRF: polymerase I and transcript release factor	Transkriptionsfaktor; Suppressor von Kollagen I	+	+		
EF1D: (EEF1D or EF1D) elongation factor 1-delta (EF1-delta)	Elongationsfaktor; Proteinsynthese	+	+		

Tab. 4-1 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs der differentiell stärker exprimierten Transkripte im BL- und im FL-System ab 1 h. Die in den beiden Systemen BL und FL jeweils stärker exprimierten Transkripte sind stichwortartig hinsichtlich Funktion und Funktionsbereich beschrieben. Ein Plus (+) kennzeichnet das Transkript als zu dem entsprechenden Zeitpunkt differentiell exprimiert.

Bereits nach einer Stunde sind Transkripte über einen längeren Zeitraum im BL-System differentiell reguliert. Mit *DDR2* ist ein Oberflächenrezeptor stärker exprimiert, der über die externe Kommunikation mit der EZM Einfluss auf die Kollagen-Synthese, die Migration und die Proliferation nehmen kann (Olaso *et al.*, 2002; Leitinger, 2003). Ein wichtiger Aspekt ist, dass die intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität von *DDR2* langsam aktiviert und über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten wird (Vogel, 1999). Die externe Kommunikation wird des Weiteren mit der verstärkten Expression des *GJA1* gefördert, das den Austausch kleinerer Moleküle zwischen Zellen ermöglicht (Chotard-Ghodsniya *et al.*, 2003).

Mit *SDCBP* und *JWA* werden zwei Komponenten des Zytoskeletts differentiell stärker exprimiert, die Einfluss auf die Koordination und Regulation weiterer Komponenten des Zytoskeletts nehmen können. Aus früheren Versuchen ist bekannt, dass nach 20 h *Syndecan1*, das von *SDCBP* gebunden werden kann, im BL-System hochreguliert ist (Kessler, 2002). *JWA* kann mit dem nach 20 h in BL differentiell regulierten *Filamin A* interagieren.

Mit *CD59* tritt nach 1 h zu einem recht frühen Zeitpunkt ein Gen auf, das an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (Cole *et al.*, 2003). Dieses Gen wurde sowohl im SAGE als auch im PIQOR™ als differentiell exprimiert detektiert (Tab. 3-7). Eine spezielle Funktion von *CD59* in Fibroblasten wurde bisher nicht beschrieben. Die beiden Chaperone *CCT2* und *TRAI* belegen ebenfalls, dass die Stress-Situation im BL-System zu einem sehr frühen Zeitpunkt auch auf der Proteinebene zu einer Reaktion führt. *CCT2* vermittelt die kooperative Faltung von β -Aktin, einer Komponente zur Bildung der Stressfasern (Zimmerman *et al.*, 2004).

Im FL-System sind besonders die beiden Transkripte *PTRF* und *IGFBP4* von Interesse. *PTRF* kann die *Kollagen-I*-Synthese supprimieren. Dies entspricht Ergebnissen in mechanisch nicht gestressten Systemen, in denen *Kollagen I* herunterreguliert ist (Kessler, 2002). Für *IGFBP4* wurde hingegen ein Zusammenhang mit der Myoblastendifferenzierung beschrieben (Yamane *et al.*, 2002). Das Gen ist ein Hinweis darauf, dass die Myofibroblastendifferenzierung möglicherweise im BL-System nicht nur aktiviert, sondern im FL-System zusätzlich supprimiert wird.

4.1.1.2 Ab 4 h differentiell

Gen Name	Funktionsbereich/Funktion	Induziert zu			
		1h	2h	4h	8h
CTGF : connective tissue growth factor	Wachstumsfaktor; Zelladhäsion; Myoblastendifferenzierung			+	+
BL CYR61 : cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Wachstumsfaktor bindend; Zelladhäsion; Angiogenese; inflammatorisch			+	+
SERPINB2 : serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (PAI2)	EZM; Inhibitor der Matrixdegradation			+	+

Tab. 4-2 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs der differentiell stärker exprimierten Transkripte im BL-System ab 4 h. Die in BL stärker exprimierten Transkripte sind stichwortartig hinsichtlich Funktion und Funktionsbereich beschrieben. Ein Plus (+) kennzeichnet das Transkript als zu dem entsprechenden Zeitpunkt differentiell exprimiert.

Nach 4 h konnten nur im BL-System Transkripte über mehrere Zeitpunkte als differentiell exprimiert identifiziert werden. *CTGF* und *CYR61* wurden im Zusammenhang mit mechanischem Stress ausführlich beschrieben (Tamura *et al.*, 2001; Schild *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2004). Beide Transkripte sind ein Beleg dafür, dass das BL-System spätestens nach 4 h die mechanische Situation erkennt und durch die Expression von Wachstumsfaktoren eine autokrine und/oder parakrine Induktion aktiviert wird, die die Expression weiterer Gene fördert. Mit *SERPINB2* (*PAI2*) ist ein Gen höher exprimiert, das Einfluss auf die Matrixdegradation nehmen kann. Das Ergebnis wurde durch die Arbeit von Kessler bestätigt (Kessler, 2002).

4.1.2 Zu einem Zeitpunkt differentiell

4.1.2.1 Zum Zeitpunkt 1 h differentiell

Genname	Funktionsbereich/Funktion
LAPTM4A : lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha Homo sapiens BTF2p44 mRNA, partial cds.	Integrales Membranprotein; Transport DNA-Reparatur
CDC10 : CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae)	Zellteilung, Zytokinese und Exozytose
ITGB1 : integrin, beta 1	Oberflächenzellrezeptor; bindet an EZM
HMGB1 : high-mobility group box 1	DNA-bindendes Protein; fördert die Expression von HOX-Genen und die Bindung von Steroidrezeptoren
BL DCN : decorin	EZM (Kollagen bindend)
TP53BP2 : tumor protein p53 binding protein, 2	Apoptose; Zellzyklus; Zellwachstum
ARL6IP : ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	Protein- und Membran-Transport; Signaltransduktion; Hämatopoese
MDH1 : malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Stoffwechsel
DAD1 : defender against cell death 1	Anti-apoptotisch
STAT1 : signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Transkriptionsfaktor; Zelladhäsion; Migration
FKBP8 : FK506 binding protein 8, 38kDa	Onkogen; reguliert MMP 9 and Syndecan 1
COL6A1 : collagen, type VI, alpha 1	EZM
FOSL2 : FOS-like antigen 2	Signaltransduktion; Zelltransformation; Tumorsuppression; beteiligt in Myoblastendifferenzierung
FL JUNB : jun B proto-oncogene	Transkriptionsfaktor
TAGLN : transgelin	Zytoskelett; Aktin-bindend
PMX1 : paired mesoderm homeobox protein 1	Transkription (Regulation); DNA-bindend
CORO1B : coronin, actin binding protein, 1B	Zytoskelett; Aktin-bindend
MVP : major vault protein	Zellkern; Transport

Tab. 4-3 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs differentiell stärker exprimierter Transkripte in BL und FL nach 1 h. Grundlage für die Beschreibung waren Literaturangaben bzw. Beschreibungen und angegebene Referenzen laut SwissProt/Trembl (<http://us.expasy.org/sprot/>). Genutzt wurden die zu den jeweiligen UniGene-Clustern angegebenen SwissProt/Trembl-Nummern des Herstellers des cDNA-Array PIQOR™ Skin 1.0.

Im BL-System sind zu diesem frühen Zeitpunkt die beiden Faktoren *STAT1* und *HMGB1* höher exprimiert. *STAT1* spielt eine Rolle in der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und Migration durch die Interaktion mit der *focal adhesion kinase (FAK)* (Xie *et al.*, 2001).

Die Funktion von *HMGB1* ist bis heute nicht genau bekannt, allerdings fördert es die Transkription von Genen der HOX-Familie, die im Promoterbereich das sogenannte HOX-Element enthalten (Zappavigna *et al.*, 1996). Die für die Apoptose und Proliferation bedeutenden Transkripte *DAD1* und *TP53BP2* belegen eine frühe Einstellung der Zellen gegen die Apoptose hin zur Proliferation. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die mechanisch nicht belasteten Fibroblasten des FL-Systems in Apoptose gehen, während die Fibroblasten des BL-Systems proliferieren (Lambert *et al.*, 1992).

Mit dem Rezeptor *Integrin β 1* ist auf der extrazellulären Kommunikationsebene ein Element in der Regulation der Homöostase stärker exprimiert (Wang *et al.*, 1993; Eckes *et al.*, 1999; Eckes *et al.*, 2000). Eine erste Reaktion auf den mechanischen Stress in Form der Reorganisation der EZM ist *Decorin (DCN)*, das in mechanisch beanspruchten Zellen häufig exprimiert wird (Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu scheint das FL-System eher auf der Ebene des Zytoskeletts und der EZM mit den Transkripten *Transgelin*, *Coronin1B* und *Kollagen VI (a1)* zu reagieren. Aus dem Bereich der Signaltransduktion konnten zwei Transkripte zu diesem frühen Zeitpunkt identifiziert werden: *JunB* und *FOSL2*. Allerdings wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass mechanischer Stress die Expression von *JunB* induziert (Black *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 2004). In diesem Fall scheint aber nicht der mechanische Stress, sondern die Zelltransformation von entscheidender Bedeutung zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *JunB* als auch *FOSL2* in beide Richtungen Einfluss auf die Myoblasten-Differenzierung nehmen. Dies ist abhängig von der Expression weiterer Gene (Daury *et al.*, 2001).

4.1.2.2 Zum Zeitpunkt 2 h differentiell

Gen Name	Funktionsbereich/Funktion
BL EEF1A1 : Elongation Factor 1-Alpha 1	Elongationsfaktor; Proteinsynthese

Tab. 4-4 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs differentiell stärker exprimierter Transkripte in BL nach 2 h. Grundlage für die Beschreibung waren Literaturangaben bzw. Beschreibungen und angegebene Referenzen laut SwissProt/Trembl (<http://us.expasy.org/sprot/>). Genutzt wurden die zu den jeweiligen UniGene Clustern angegebenen SwissProt/Trembl-Nummern des Herstellers des cDNA-Array PIQOR™ Skin 1.0.

Zu diesem Zeitpunkt konnten nur im BL-System differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden. Der Elongationsfaktor *EEF1A1* weist auf eine notwendige Erhöhung der Proteinsynthese hin. In Bakterien kommt dem entsprechenden Homolog *EF-Tu* eine Bedeutung in biologisch relevanten Prozessen wie Wachstum und Zellteilung zu (Negrutskii und El'skaya, 1998).

4.1.2.3 Zum Zeitpunkt 4 h differentiell

Im BL-System setzt sich die bereits nach 1 h initiierte Antwort fort und mündet in der Expression der beiden Komponenten der EZM *Lumican* und *MMP1*. *IL6* scheint einen kurzfristigen Impuls zu setzen, da das Zytokin zu keinem weiteren Zeitpunkt innerhalb der ersten acht Stunden als differentiell exprimiert detektiert wurde. Allerdings konnte in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass *IL6* nach 20 h in FL stärker exprimiert wird (Kessler-Becker *et al.*, 2004), das Zytokin wird also in den beiden Kollagengel-Systemen biphasisch exprimiert. Mit den Transkripten *XBPI* und *HSPA1A* zeigt sich der mechanische Stress auch auf der intrazellulären Proteinebene durch die Expression der beiden Chaperone (Drabent *et al.*, 1986; Nozaki *et al.*, 2004).

Gen Name	Funktionsbereich/Funktion
XBP1: X-box binding protein 1	Transkriptionsfaktor; Endoplasmic Reticulum Stress Response (ERSR)
IL6: interleukin 6 (interferon, beta 2)	Zytokin
BL LUM: lumican	EZM; Laminin-bindend
MMP1: matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	EZM; Matrix-Metalloproteinase
HSPA1A: heat shock 70kDa protein 1A	Chaperon
FLNA: filamin A, alpha (actin binding protein 280)	Zytoskelett; Aktin-bindend
CNN1: calponin 1, basic, smooth muscle	Zytoskelett; Aktin-bindend
Homo sapiens fetal thymus prothymosin alpha mRNA, complete cds	Proliferation; Zellwachstum; Immunfunktionen
COL6A2: collagen, type VI, alpha 2	EZM
FL ATP5D: ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	ATP-Synthese; metabolisch
COL1A1: collagen, type I, alpha 1	EZM
HBB: hemoglobin, beta	Sauerstofftransport
HIC1: hypermethylated in cancer 1	Tumor-Suppressor
HBA2: hemoglobin, alpha 2	Sauerstofftransport

Tab. 4-5 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs differentiell stärker exprimierter Transkripte in BL und FL nach 4 h. Grundlage für die Beschreibung waren Literaturangaben bzw. Beschreibungen und angegebene Referenzen laut SwissProt/Trembl (<http://us.expasy.org/sprot/>). Genutzt wurden die zu den jeweiligen UniGene Clustern angegebenen SwissProt/Trembl-Nummern des Herstellers des cDNA-Array PIQOR™ Skin 1.0.

Im FL-System setzt sich der Prozess fort, die Kontraktion der Kollagengele durch die Expression von Komponenten des Zytoskeletts zu fördern (*Filamina* und *CNN1*). Zu diesem Zeitpunkt treten zusätzlich *Kollagen VI alpha 2* und *Kollagen I alpha 1* als Komponenten der EZM stärker exprimiert auf.

4.1.2.4 Zum Zeitpunkt 8 h differentiell

Gen Name	Funktionsbereich/Funktion
ENIGMA: enigma (LIM domain protein)	Fokalkontakt; Zytoskelett
PGF: placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	Wachstumsfaktor; Angiogenese
HSF1: heat shock transcription factor 1	Transkriptionsfaktor
BL SERPINE1: serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin), member 1 (PAI1)	EZM
BGN: biglycan	EZM
CCND1: cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	Zellzyklus
CREB3L1: cAMP responsive element binding protein 3-like 1	Transkriptionsfaktor; reguliert Proteoglykane

Tab. 4-6 Beschreibung der Funktion und/oder des Funktionsbereichs differentiell stärker exprimierter Transkripte in BL nach 8 h. Grundlage für die Beschreibung waren Literaturangaben bzw. Beschreibungen und angegebene Referenzen laut SwissProt/Trembl (<http://us.expasy.org/sprot/>). Genutzt wurden die zu den jeweiligen UniGene Clustern angegebenen SwissProt/Trembl-Nummern des Herstellers des cDNA-Array PIQOR™ Skin 1.0.

Zu diesem Zeitpunkt konnten nur im BL-System Transkripte als stärker exprimiert identifiziert werden. Die durch mechanischen Stress schon nach 20 h im BL identifizierten Transkripte *SERPINE1* (*PAII*) und *Biglycan* (Kessler *et al.*, 2001) fördern die weitere Reorganisation der EZM als Antwort auf den mechanischen Stress.

Mit *ENIGMA* ist ein von der Funktion her unbekanntes Transkript stärker exprimiert, das aber laut der in SwissProt publizierten Daten (Primary accession number: Q14250) mit dem Zytoskelett verbunden ist. Mit *PGF* wurde ein Wachstumsfaktor identifiziert, der großen Einfluss auf die Genexpression über verschiedene Signaltransduktionswege (*stress-activated protein kinase*-(SAPK)-Pathways, *c-Jun-N terminal kinase* (*JNK*) und *p38 kinase*) nehmen kann (Desai *et al.*, 1999; De Falco *et al.*, 2002, Autiero *et al.*, 2003; Selvaraj *et al.*, 2003). Bedeutend ist ebenfalls, dass *HSF1* grundlegend die Transkription diverser Gene im Zusammenhang mit mechanischem Stress beeinflussen kann (Pan *et al.*, 2003). *CREB3L1* ist von Interesse, da es die Expression von Proteoglykanen verändert und damit einen Einfluss auf die Zusammensetzung der EZM nimmt (Hikake *et al.*, 2003).

4.1.3 Funktionsbereiche im BL- und im FL-System

Neben der Betrachtung der einzelnen Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten (s. 4.1.1 und 4.1.2) bietet die Zusammenfassung und Einordnung der differentiell exprimierten Gene in Funktionsbereiche und funktionelle Gruppen ohne Berücksichtigung des Zeitpunktes die Möglichkeit, eine Übersicht über die unterschiedlichen biologischen Reaktionen in den beiden Kollagensystemen zu erhalten. Dazu wurden die Gene nach ihren in der Literatur und in SwissProt genannten Funktionen in insgesamt neun Bereiche eingeordnet (Tab. 4-7 und 4-8) und anschließend die einzelnen Bereiche verglichen.

Transkriptionsfaktor transkriptionelle Regulation	Apoptose	Zellzyklus Zellteilung	Zelladhäsion Zellkommunikation
<ul style="list-style-type: none"> • BTF2p44 mRNA • high-mobility group box 1 • signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa • Elongation Factor 1, Alpha 1 • X-box binding protein 1 • heat shock transcription factor 1 • cAMP responsive element binding protein 3-like 1 	<ul style="list-style-type: none"> • tumor protein p53 binding protein, 2 • defender against cell death 1 	<ul style="list-style-type: none"> • CDC10 cell division cycle 10 homolog • tumor protein p53 binding protein, 2 • cyclin D1 	<ul style="list-style-type: none"> • gap junction protein, alpha 1, 43kDa • syndecan binding protein • cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
Wachstumsfaktor Zytokin	Rezeptor Membranprotein	Signaltransduktion (intrazellulär)	Zytoskelett
<ul style="list-style-type: none"> • interleukin 6 • placental growth factor • connective tissue growth factor • cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 	<ul style="list-style-type: none"> • lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha • integrin, beta 1 • discoidin domain receptor family, member 2 • CD59 antigen p18-20 		<ul style="list-style-type: none"> • enigma • chaperonin containing TCP1, subunit 2 • cytoskeleton related vitamin A responsive protein • Microfibril-associated glycoprotein-2
EZM Protein/Protease/Inhibitor	Stoffwechsel	DNA-Reparatur	Proteintransport Membranverkehr Chaperon Elongationsfaktor
<ul style="list-style-type: none"> • Decorin • Lumican • matrix metalloproteinase 1 • PAI1 • biglycan • PAI2 	<ul style="list-style-type: none"> • malate dehydrogenase 1, NAD 	<ul style="list-style-type: none"> • BTF2p44 mRNA 	<ul style="list-style-type: none"> • lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha • ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein • heat shock 70kDa protein 1A • chaperonin containing TCP1, subunit 2 • tumor rejection antigen (gp96) 1

Tab. 4-7 Gesamtübersicht der differentiell stärker exprimierten Transkripte in BL nach Funktionen und Funktionsbereichen geordnet. Die differentiell stärker exprimierten Transkripte des BL-Systems wurden in dieser Darstellung ohne Berücksichtigung des Zeitpunktes nach den in der Tabelle genannten Funktionen und Funktionsbereichen geordnet. Der Fettdruck zeigt Gene an, die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimiert wurden. Gene, deren Funktionen unbekannt sind, werden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

Apoptose und Zellzyklus/Zellteilung: In BL wurden insgesamt fünf Transkripte identifiziert, die in die beiden vorgenannten Funktionsbereiche eingeordnet wurden, während in FL kein Transkript dieser Kategorie zugeordnet werden konnte. Es ist bekannt, dass die Fibroblasten im BL-System proliferieren

(Lambert *et al.*, 1992), während die Zellen im FL-System in Apoptose gehen (Fluck *et al.*, 1998). Die in BL identifizierten Gene weisen darauf hin, dass die Grundlagen hierfür schon innerhalb der ersten Stunden gelegt werden, während eine Expression relevanter Transkripte für Apoptose und Zellzyklus/Zellteilung erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt (20 h) stattfindet (Kessler, 2002).

Transkriptionsfaktor transkriptionelle Regulation	Apoptose	Zellzyklus Zellteilung	Zelladhäsion Zellkommunikation
<ul style="list-style-type: none"> FK506 binding protein 8, 38kDa jun B proto-oncogene paired mesoderm homeobox protein 1 hypermethylated in cancer 1 polymerase I and transcript release factor 			
Wachstumsfaktor Zytokin	Rezeptor Membranprotein	Signaltransduktion (intrazellulär)	Zytoskelett
<ul style="list-style-type: none"> insulin-like growth factor binding protein 4 		<ul style="list-style-type: none"> FOS-like antigen 2 fetal thymus prothymosin alpha mRNA melanoma antigen, family D, 2 	<ul style="list-style-type: none"> FK506 binding protein 8, 38kDa Transgelin coronin, actin binding protein, 1B filamin A, alpha (actin binding protein 280) calponin 1, basic, smooth muscle
EZM Protein/Protease/Inhibitor	Stoffwechsel	DNA-Reparatur	Proteintransport Membranverkehr Chaperon Elongationsfaktor
<ul style="list-style-type: none"> collagen, type VI, alpha 1 collagen, type VI, alpha 2 collagen, type I, alpha 1 	<ul style="list-style-type: none"> ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit hemoglobin, beta hemoglobin, alpha 2 		<ul style="list-style-type: none"> major vault protein Elongation Factor 1-delta

Tab. 4-8 Gesamtübersicht der differentiell stärker exprimierten Transkripte in FL nach Funktionen und Funktionsbereichen geordnet. Die differentiell stärker exprimierten Transkripte des FL-Systems wurden in dieser Darstellung ohne Berücksichtigung des Zeitpunktes nach den in der Tabelle genannten Funktionen und Funktionsbereichen geordnet. Der Fettdruck zeigt Gene an, die über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimiert waren. Gene, deren Funktionen unbekannt sind, werden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

Zelladhäsion/Zellkommunikation und Rezeptor/Membranprotein: Auch diesen beiden Funktionsbereichen konnten nur Gene, die im BL-System stärker exprimiert wurden, zugeordnet werden. Die hohe Anzahl an Rezeptoren und Membranproteinen sowie Faktoren der Zelladhäsion und Zellkommunikation weisen darauf hin, dass in den mechanisch gestressten Fibroblasten eine höhere und erweiterte Kommunikationsfähigkeit der Zellen notwendig ist, um auf die mechanischen Einflüsse angemessen reagieren zu können, während die Fibroblasten im FL-System mehr oder minder kontinuierlich den gleichen mechanischen Anforderungen ausgesetzt sind.

Proteintransport/Membranverkehr/Chaperon/Elongationsfaktor: Neben der geringeren Anzahl an Transkripten in FL ist besonders auffällig, dass die Gruppe der Chaperone im BL-System stärker vertreten

ist. Somit drückt sich der extrazelluläre mechanische Stress auch auf der intrazellulären Ebene durch die Expression von Stress-sensitiven Komponenten aus.

EZM/Protein/Protease/Inhibitor: In beiden Kollagengel-Systemen sind Komponenten der EZM differentiell exprimiert. Während in FL allerdings die beiden *Kollagene I* und *VI* kurzfristig höher exprimiert werden, sind in BL mit *Decorin*, *Lumican* und *Biglycan* Komponenten höher exprimiert, die eine Veränderung der EZM hinsichtlich der Kräfteverteilung und der notwendigen Neuorganisation zum Erhalt der Homöostase ermöglichen (Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Diese drei Gene treten häufig in mechanisch gestressten Systemen als differentiell stärker exprimiert auf.

Zytoskelett: In diesem Funktionsbereich sind jeweils fünf Gene differentiell exprimiert. In beiden Systemen ist also eine Neu- bzw. Reorganisation des Zytoskeletts notwendig, die den unterschiedlichen mechanischen Anforderungen gerecht wird.

Die Beschreibung und Kategorisierung der differentiell exprimierten Gene konnte größtenteils in Zusammenhang mit mechanischen Kräften gebracht werden. Transkripte, die keine eindeutige Funktion haben, lassen sich trotzdem in den biologischen Zusammenhang integrieren. Auffällig ist, dass bereits innerhalb der ersten Stunde Gene exprimiert werden, die verschiedenen Funktionsbereichen zugeordnet werden können. Transkriptionsfaktoren (*JUNB*), Komponenten des Zytoskeletts (*TAGLN*) und der EZM (*COL6A1*; *DCN*), apoptotische Faktoren (*DADI*) und Membranproteine (*LAPTM4A*) sind nach kurzer Zeit in den Systemen differentiell exprimiert. Die Fibroblasten erkennen nicht nur die mechanische Situation auf der Proteinebene nach 1 h, sondern reagieren komplex auf die biologische Situation durch Expression der verschiedensten Faktoren.

Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass die beiden Systeme BL und FL innerhalb der ersten 8 h entsprechend unterschiedlich auf die mechanischen Kräfte reagieren. Ein gutes Beispiel hierfür sind Komponenten des Zytoskeletts und der EZM sowie Faktoren, die in der externen Zellkommunikation eine Rolle spielen. Bestandteile der EZM und des Zytoskeletts werden in beiden Systemen entsprechend den mechanischen Anforderungen differentiell stärker exprimiert. *Decorin* und *Biglycan* sind häufig in mechanisch gestressten Systemen stärker exprimiert, um die EZM durch eine Reorganisation mechanisch zu entlasten (Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

Auffällig sind die in FL stärker exprimierten Transkripte *Kollagen I alpha 1* und *Kollagen VI alpha 1* sowie *alpha 2*. Eine Reaktion mechanisch gestresster Fibroblasten ist eine gesteigerte Produktion von Kollagenen (Lambert *et al.*, 1992). Dass zu den frühen Zeitpunkten eine erhöhte Expression der Kollagene in den mechanisch nicht belasteten Fibroblasten gemessen wurde, zeigt, dass die beiden Kollagengelsysteme nicht von Anfang an Gene exprimieren, die mit dem Phänotyp nach 20 h übereinstimmen. Diese biphasische Expression konnte auch schon an den Genen *IL1 β* und *COX-2* in dreidimensionalen Kollagengelen aufgezeigt werden. Beide Transkripte werden nach 4 h in BL und nach 20 h in FL stärker exprimiert (Kessler-Becker *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu stehen Faktoren, die Einfluss auf die externe Kommunikation haben. Hier scheint der Bedarf in BL größer zu sein. Die Expression von Genen, die bei Zelladhäsion und Zellkommunikation (*gap junction protein, alpha 1, 43kDa; syndecan binding protein; cysteine-rich, angiogenic inducer, 61*) bzw. bei der Expression von Zellrezeptoren und Membranproteinen (*lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha; integrin beta 1; discoidin domain receptor family, member 2; CD59 antigen p18-20*) beteiligt sind, wurden nur im BL-System identifiziert.

Im FL-System sind neben der geringeren Anzahl an stärker exprimierten Transkripten (Abb. 3-11) auch nicht so viele Funktionsbereiche besetzt (Tab. 4-8). Den Funktionsbereichen Apoptose, Zellzyklus/Zellteilung, Zelladhäsion/Zellkommunikation, Zellrezeptor/ Membranprotein und DNA-Reparatur konnte kein Transkript, das in FL stärker exprimiert war, zugeordnet werden. Im BL-System werden biologische Funktionen von der Apoptose bis zum Zellzyklus reguliert, während das FL-System im Wesentlichen durch die Reorganisation des Zytoskelett, der EZM und der Expression notwendiger Transkriptionsfaktoren reagiert.

Neben der Aktivierung einzelner Funktionen durch die Expression regulierender Transkripte scheint aber auch die Repression eine bedeutende Rolle zu spielen. Als Beispiele seien hier *PTRF*, *IGFBP4* und *FOSL2* angeführt. *PTRF* ist zu 1 h und 2 h in FL höher exprimiert. Zwar ist zu den frühen Zeitpunkten in dem FL-System das *Kollagen I* stärker exprimiert, allerdings kann *PTRF* einen reprimierenden Einfluss auf die Kollagensynthese ausüben (Hasegawa *et al.*, 2000). Dies entspricht den Beobachtungen aus früheren Untersuchungen, dass *Kollagen I* nach 20 h in BL höher exprimiert ist. Die höhere Expression im BL-System kann unter anderem durch die Repression der Kollagensynthese durch *PTRF* im FL-System erklärt werden. Die Transkripte *IGFBP4* und *FOSL2* stehen im Zusammenhang mit der Myoblastendifferenzierung (Daury *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2002). Beide Gene sind in dieser Arbeit zu recht frühen Zeitpunkten im FL-System identifiziert worden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die beiden Transkripte in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ebenfalls eine Rolle spielen und die Differenzierung nicht nur im BL-System aktiviert, sondern auch im FL-System reprimiert wird. Der Einfluss der beiden Gene ist stark abhängig von der Expression weiterer Faktoren, die die Differenzierung sowohl fördern als auch verhindern können (Daury *et al.*, 2001).

4.2 Das Drei-Phasen-Modell

Die Betrachtung der differentiell exprimierten Gene im Zeitexpressionsprofil verdeutlicht unter anderem die Problematik eines anderen Bereichs. Wann erkennt die Zelle den mechanischen Stress, wie wird er weiterverarbeitet und wann gerät die Expression der mechanisch gestressten Fibroblasten so weit außer Kontrolle, dass sie zu pathologischen Situationen, wie z. B. Fibrosen, führt? Die mechanisch veränderte Situation der Zelle über einen kürzeren Zeitraum wird kaum zu einem extremen Phänotyp führen, wie er in Fibrosen, Keloiden oder hypertrophen Narben beschrieben wird (Bonner, 2004; Chen *et al.*, 2004; Dasu *et al.*, 2004; Leask *et al.*, 2004; Mustoe, 2004).

Im Rahmen der Analyse von mechanischen Kräften auf Fibroblasten wurden bereits die Genexpressionsprofile der Kollagengelsysteme FL und BL zum Zeitpunkt des dynamischen Gleichgewichts (20 h) untersucht (Kessler, 2002). Das Ergebnis war hierbei unter anderem die Identifizierung differentiell exprimierter Gengruppen. Mechanisch belastete Fibroblasten zeigten eine erhöhte Transkription in Funktionsbereichen der Matrixsynthese, der Verstärkung des Zytoskeletts, der Inhibition der Matrixdegradation, der fibrogenen Mediatoren und der Proliferation. Auf der anderen Seite waren Gene innerhalb der Bereiche der Matrixdegradation und der Inhibition der Proliferation, der inflammatorischen Mediatoren sowie der Apoptose reprimiert (Kessler, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vom Beginn des mechanischen Stresses bis hin zum mechanischen Gleichgewicht nach 20 h die Fibroblasten durch eine kontinuierliche Veränderung der Gen- und Proteinexpression reagieren. Für die Transkripte *TGF β 1*, *TGF β 3*, *CTGF* und *Integrin β 1* konnte zu frühen Zeiten (4 h, 12 h und 20 h) eine unterschiedlich starke, differentielle Expression beschrieben werden (Kessler *et al.*, 2001). Für die Transkripte *COX-2* und *IL1 β* konnte sogar eine biphasische Expression in den beiden Kollagengelsystemen nachgewiesen werden. Während die Transkripte nach 4 h im BL-System exprimiert werden, ändert sich die Expression nach 20 h, und beide Transkripte werden im FL-System detektiert (Kessler-Becker *et al.*, 2004). Auch auf der Proteinebene konnte für das Protein *PAI2* durch „Whole-Mount-Färbung“ der BL-Gele zu verschiedenen Zeitpunkten (4h, 8 h, 12 h und 24 h) ein kontinuierlicher Anstieg gemessen werden. Nach 24 h zeigten ca. 75 % der Fibroblasten eine *PAI2*-Expression (Kessler, 2002). Die Kollagengelsysteme sind also dynamisch und zeigen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht nur eine veränderte, sondern sogar biphasische Expression einzelner Gene.

Die Ergebnisse der vier untersuchten Zeitpunkte (1 h, 2 h, 4 h und 8 h) in dieser Arbeit zeigen, dass über den gesamten Zeitraum die oben beschriebene Dynamik des Systems bestehen bleibt. Dies drückt sich unter anderem in der geringen Anzahl der über mehrere Zeitpunkte differentiell exprimierten Transkripte aus. Von den insgesamt 35 differentiell exprimierten Transkripten des BL-Systems waren nur elf über mehr als einen Zeitpunkt exprimiert (Abb. 3-12). Zusätzlich war keines der Transkripte vom ersten Zeitpunkt an über den gesamten Zeitraum differentiell. Innerhalb der ersten acht Stunden reagieren die Fibroblasten durch eine stetige Änderung der Genexpression und durch Anpassung an die unterschiedlichen mechanischen Bedingungen. Eine mögliche Interpretation der Ergebnisse ist die Einteilung der Reaktionen in drei Zeitabschnitte (Phasen):

Phase 1: Die Zelle erkennt die erhöhte mechanische Belastung und reagiert erstmalig durch eine kurzfristige Expression mechanisch entlastender Komponenten.

Phase 2: Die Zelle erkennt, dass die veränderte Expression zur Einstellung der Homöostase nicht ausreicht, und reagiert mittelfristig durch die Expression von Wachstumsfaktoren und der Induktion eines autokrinen und/oder parakrinen Loops.

Phase 3: Die Zelle erkennt, dass die externen Kräfte bestehen bleiben, und reagiert intensiv durch die langfristige Expression von Komponenten, die Einfluss auf die Homöostase nehmen können und zur Entstehung des pathologischen bzw. „aktivierten“ Phänotyps führen.

Phase 1 ist gekennzeichnet durch eine erste Reaktion der Fibroblasten auf den mechanischen Stress. Beispiele hierfür sind *Decorin*, *STAT1* und die beiden Rezeptoren *DDR2* und *Integrin β 1*. *Decorin* ist ein kleines Proteoglykan in der EZM, das Einfluss auf die Morphologie der Zelle hat. Durch *Decorin* können die beiden Rho-GTPasen *RhoA* und *Rac1* aktiviert werden, die für Veränderungen des Zytoskeletts verantwortlich sind (Tufvesson *et al.*, 2003) und häufig bei mechanischem Stress beteiligt sind (Gardel *et al.*, 2004; Noria *et al.*, 2004; Polte *et al.*, 2004).

Durch die beiden Rezeptoren *DDR2* und *Integrin β 1* kann die Zelle verstärkt mit der Umgebung kommunizieren. *DDR2* zeichnet sich besonders durch die Fähigkeit der Regulation der *Kollagen-I*-Synthese aus (Olaso *et al.*, 2002). Durch mechanische Stimulation von *ITGB1* können mehrere biologische Prozesse initiiert werden. Die Bildung von Stressfasern, die Exozytose spezieller Proteine (*actin*, *annexin II* und *VI*) und Rezeptoren (Lee *et al.*, 1993), und die Signaltransduktion über Proteine der Signalkaskaden (z. B. *p38*) oder über Transkriptionsfaktoren (z. B. *SPI*) sind die bedeutendsten Prozesse (D'Addario *et al.*, 2002). Beide Rezeptoren ermöglichen es, die Synthese von Komponenten der EZM zu beeinflussen.

Der Link zwischen extra- und intrazellulärer Umgebung ist hierbei *STAT1*. Es ist an der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und Migration beteiligt. Bindeglied im Zellinneren ist die *focal adhesion kinase (FAK)* (Xie *et al.*, 2001). Innerhalb der ersten Stunde werden bereits Faktoren exprimiert, die maßgeblichen Einfluss auf die Morphologie der Zelle haben und dem entstehenden mechanischem Stress entgegenwirken können.

Phase 2 zeichnet sich durch die Expression übergeordneter Faktoren wie *CTGF* und *Cyr61* aus. Da die kurzfristige Änderung der Genexpression die EZM mechanisch nicht entlastet, schaltet die Zelle auf ein erweitertes Programm um. *CTGF* ist in der Anwesenheit von mechanischem Stress zusammen mit *TGF β 1* zur Kontraktion der Kollagenmatrix notwendig (Schild *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2004). *Cyr61* hingegen fördert die Expression einer Vielzahl von Transkripten (z. B. *VEGA-A*, *VEGA-C*, *MMP1*, *MMP3*, *TIMP1*, *uPA*, *PAI-1* und die *Integrine alpha-3* und *alpha-5*). *CTGF* und *Cyr61* bilden zusammen die Basis für eine Erweiterung des Expressionsprofils zur Reorganisation der EZM. Dies drückt sich auch durch die Expression beider Faktoren über den gesamten Zeitraum bis hin zum 20 h-Wert aus (Kessler, 2002).

Ergänzt wird das Profil durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, z. B. *XBPI*. *XBPI* bindet an das sogenannte ER-Stress-Response-Element im Promoterbereich diverser Gene und ist während der Endoplasmic Reticulum Stress Response (ERSR) (Yoshida *et al.*, 2001) sowohl auf RNA- als auch auf

Proteinebene höher exprimiert (Nozaki *et al.*, 2004). Die ERSR führt unter anderem zur erhöhten Expression von Chaperonen wie dem *Endoplasmic Protein* (*TRAI*), das auch im BL-System als stärker exprimiert identifiziert wurde (Tab. 3-13).

Phase 3 ist durch die zusätzliche Erweiterung der Expression und die Entstehung des „aktivierten Phänotyps“ der Fibroblasten gekennzeichnet (Kessler *et al.*, 2001). Problematisch sind die genaue Bestimmung des Zeitpunktes und die Benennung von Kandidatengen. Das Zeitfenster zwischen dem letzten analysierten Zeitpunkt 8 h mittels PIQOR™ und dem 20 h-Wert ist groß. Eine erweiterte Analyse der Expressionsprofile auch in diesem Zwischenzeitraum könnte zu einer genaueren Charakterisierung des Systems führen.

Als Beispiel für die Auswirkungen der mechanischen Kräfte innerhalb der dritten Phase dienen *PGF* und die beiden Transkriptionsfaktoren *HSF1* und *CREB3L1*. *PGF* ist potentiell für die Aktivierung des *stress-activated protein kinase-* (SAPK-) Pathways verantwortlich. Die Aktivierung des SAPK-Pathways schützt unter anderem vor Apoptose (Desai *et al.*, 1999). Zu diesem Zeitpunkt scheint der Schutz der gestressten Zellen vor der Apoptose ein wesentlicher Aspekt zu sein, denn auch die Expression von *HSF1* schützt davor. *HSF1* reguliert die Expression von *HSP70* (ebenfalls im BL-System identifiziert) in gestressten Zellen (Dai *et al.*, 2003). In embryonalen Sehnenzellen von Hühnern konnte eine Beziehung zwischen dem Chaperon *Hsp47*, *Prokollagen Type I* und *HSF1* unter Stressbedingungen wie erhöhter Temperatur und mechanischem Stress gezeigt werden (Pan *et al.*, 2003). *Hsp47* ist ein Stressprotein, das als Kollagen-spezifisches Chaperon während der Biosynthese und Sekretion von Prokollagen fungiert. Die Induktion der Proteinexpression von *Hsp47* durch Hitzeschock, mechanischen Stress und *TGFβ1* wird von der Aktivierung und Translokation von *HSF1* in den Nukleus begleitet (Pan *et al.*, 2003). *HSF1* könnte als Shuttle-Protein ein wesentlicher Faktor sein, der für die Überexpression von *Kollagen-I* im Zusammenhang mit mechanischem Stress verantwortlich ist.

Das Drei-Phasen-Modell wird auch durch die schematische Darstellung der Gene unterstützt, die funktionell in einen Zusammenhang gebracht werden können (Abb. 4-1). Zu frühen Zeitpunkten werden in Phase 1 zuerst Mechanosensoren stärker exprimiert. Die beiden Zellrezeptoren *Integrinβ1* und *DDR2* ermöglichen eine verstärkte Signaltransduktion der extrazellulären mechanischen Signale ins Zellinnere. *Connexin43* als Bestandteil von Gap Junctions weist auf eine mögliche Kommunikation zwischen den Zellen hin. In kontrahierenden Kollagengelen, in denen Fibroblasten und Mastzellen kokultiviert wurden, konnte eine stark reduzierte Kontraktion der Gele beobachtet werden, wenn der Informationsaustausch durch gap junctions zwischen den Zellen inhibiert wurde (Moyer *et al.*, 2004). Die stärkere Expression von *Connexin43* zu frühen Zeitpunkten in dem BL-System kann ein Hinweis auf eine notwendige intensivere Kommunikation mit der extrazellulären Umgebung sein. In der ersten Phase werden als Folge auch Komponenten des Zytoskeletts differentiell stärker exprimiert, wie *Syntenin* und *JWA*. Zentrales Element scheint dabei *Aktin* zu sein. Auf der Ebene der intrazellulären Signaltransduktion wird *STAT1* stärker exprimiert.

Eine Folge des Inside-Outside-Signalings in Phase 2 ist die Übersetzung der mechanisch induzierten Signale in Form eines autokrinen und/oder parakrinen Loops durch die stärkere Expression von *CTGF*, *Cyr61* und

IL6. Die Expression der Wachstumsfaktoren sorgt als Folge in Phase 3 für die Induktion Stress-relevanter Gene wie den Transkriptionsfaktor *HSF1*, dem Heat Shock Protein *HSP70* sowie *PAI1* und *PAI2*.

Auffällig ist, dass einige Gene, die in der Analyse des 20 h-Wertes als differentiell exprimiert identifiziert wurden, bereits nach 4 h im BL System detektiert werden konnten. Beispiele sind die Gene *CTGF*, *Cyr61* und *PAI2*. Die Identifikation dieser Gene stellt eine Verbindung zwischen den Zeitpunkten 1 bis 8 h und dem untersuchten 20 h-Wert dar. *CTGF* wurde bereits im Zusammenhang mit mechanischen Kräften identifiziert (Schild *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2004). Die frühe differentielle Expression von *CTGF* nach 4 h belegt, dass die mechanisch gestressten Fibroblasten bereits zu diesem Zeitpunkt die differentielle Expression auf das Expressionsprofil mechanisch gestresster Fibroblasten umstellen. Ein weiterer Beleg dafür ist *Cyr61*. Die Expression von Transkripten, die bei der Angiogenese, inflammatorischen Prozessen und dem Matrix-Remodeling beteiligt sind, können von *Cyr61* reguliert werden (Chen *et al.*, 2001). Ein wesentlicher Aspekt ist, dass *Cyr61* in Zusammenarbeit mit *TGF β 1* die Expression spezifischer Gene antagonistisch, additiv oder synergistisch beeinflussen kann (Chen *et al.*, 2002). Die Expression von *CTGF* und *Cyr61* bietet also eine Art Plateau, von dem aus flexibel die Reaktion der Fibroblasten auf den mechanischen Stress reguliert werden kann.

Ein weiteres Ergebnis der Analyse der frühen Zeitpunkte ist, dass bis auf *STAT1* keines der bekannten Gene im Zusammenhang mit mechanischem Stress innerhalb der intrazellulären Signaltransduktion (s. 1.5.2) differentiell reguliert ist. Allerdings können einige der identifizierten Transkripte auf der Proteinebene Einfluss auf Elemente der intrazellulären Signaltransduktion nehmen (Abb. 4-1). *PGF* kann *SAPK*, *JNK* und die *p38 Kinase* regulieren (Desai *et al.*, 1999). *JWA* kann Einfluss auf den *MAPK-ERK1/2*-Pathway nehmen (Matsuda *et al.*, 2003). Die Expression von *Cyr61* wird unter anderem von der *Proteinkinase C (PKC)* reguliert (Tamura *et al.*, 2001). Die klassischen Signaltransduktionswege werden also nicht durch eine erhöhte Expression der einzelnen Gene auf der mRNA-Ebene, sondern durch Interaktionen der mechanisch induzierten Transkripte auf der Proteinebene reguliert. Dies führt auch zu dem Rückschluss, dass es innerhalb der Regulation von mechanischem Stress kein Master-Gen gibt. Erstens wurde kein Gen identifiziert, das ab einem sehr frühen Zeitpunkt über den gesamten untersuchten Zeitraum exprimiert wurde. Zweitens ist die Anzahl der nur zu einem Zeitpunkt differentiell exprimierten Transkripte sehr hoch. Die Dynamik des Systems benötigt eine kontinuierliche Anpassung und Messung der sich ständig verändernden Bedingungen. Das System wird nicht grundsätzlich durch die Expression eines Master-Gens auf mechanischen Stress eingestellt, sondern bleibt flexibel.

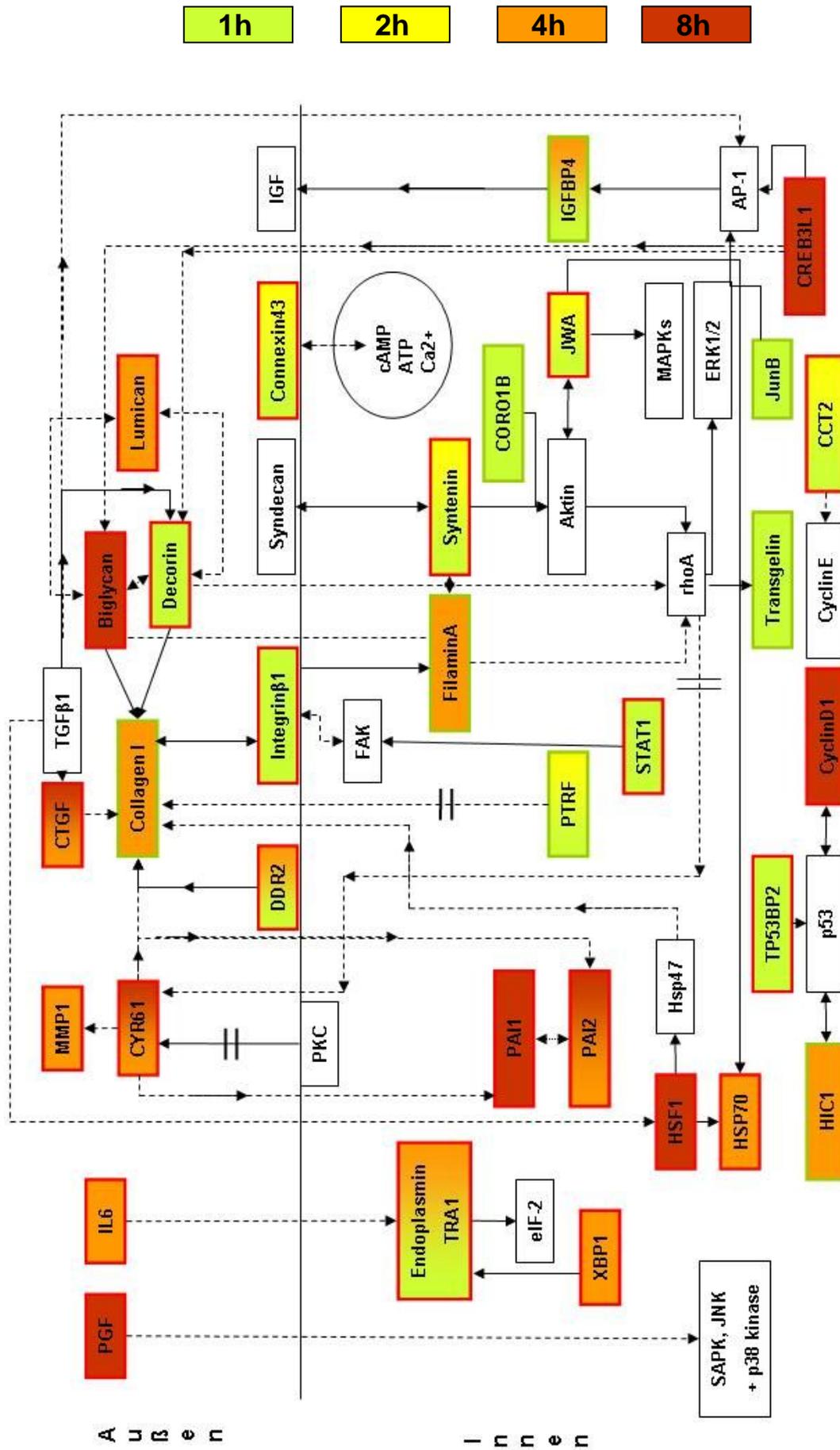


Abb. 4-1 Schematische Darstellung der Interaktionen der differentiell exprimierten Gene (Proteine) in 3D-Kollagenen. Die Abbildung zeigt die durch Literaturrecherche ermittelten Beziehungen zwischen den im PIQOR™ identifizierten Genen. Zu erkennen ist die frühe Expression der Gene der Phase 1 (intrazellulär und Zelloberflächenrezeptoren), der Phase 2 (Zytokine und Wachstumsfaktoren) und der Phase 3 (z. B. PAI1 und PAI2). Es wird zwischen Zellinnen- und -außenraum unterschieden. Rot umrandete Gene sind im Bound Lattice, grün umrandete Gene im Free Lattice System höher exprimiert. Gene, die schwarz umrandet sind, wurden nicht mittels PIQOR als differentiell exprimiert identifiziert, sind aber laut Literatur von Bedeutung. Linien die durch = unterbrochen sind, weisen auf eine Repression des entsprechenden Gens hin. Linien zwischen zwei Genen, die unterbrochen dargestellt sind (---), weisen auf eine indirekte Verknüpfung der Gene hin. Die Funktionen der Gene sind im Ergebnisteil beschrieben.

1. In BL differentiell stärker exprimierte Gene:

STAT1: signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1 h	BL
Integrinβ1: Integrin beta 1	1 h	BL
Decorin (DCN)	1 h	BL
TP53BP2: tumor protein p53 binding protein, 2	1 h	BL
CCT2: chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	1 h, 2 h	BL
JWA: cytoskeleton related vitamin A responsive protein	1 h, 2 h	BL
Syntenin (SDCBP): syndecan binding protein (syntenin)	1 h, 2 h	BL
Connexin 43 (GJA1): gap junction protein, alpha 1, 43kDa	1 h, 2 h	BL
TRA1: tumor rejection antigen (gp96) 1	1 h, 4 h	BL
DDR2: discoidin domain receptor family, member 2	1 h, 4 h	BL
IL6: interleukin 6 (interferon, beta 2)	4 h	BL
XBP1: X-box binding protein 1	4 h	BL
MMP1: matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	4 h	BL
HSP70 (HSPA1A): heat shock 70kDa protein 1A	4 h	BL
Lumican (LUM):	4 h	BL
PAI2 (SERPINB2): serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	4 h, 8 h	BL
CYR61: cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	4 h, 8 h	BL
CTGF: connective tissue growth factor	4 h, 8 h	BL
PGF: placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	8 h	BL
HSF1: heat shock transcription factor 1	8 h	BL
PAI1 (SERPINE1): serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin), member 1	8 h	BL
CyclinD1 (CCND1): cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	8 h	BL
CREB3L1: cAMP responsive element binding protein 3-like 1	8 h	BL
Biglycan (BGN)	8 h	BL

2. In FL differentiell stärker exprimierte Gene:

CORO1B: coronin, actin binding protein, 1B	1 h	FL
JUNB: jun B proto-oncogene	1 h	FL
TAGLN (Transgelin)	1 h	FL
PTRF: polymerase I and transcript release factor	1 h, 2 h	FL
IGFBP4: insulin-like growth factor binding protein 4	1 h, 4 h	FL
HIC1: hypermethylated in cancer 1	4 h	FL
FLNA: filamin A, alpha (actin binding protein 280)	4 h	FL
Collagen I (COL1A1): collagen, type I, alpha 1	4 h	FL

3. Nicht als differentiell exprimierte detektierte Gene

TGFβ1: Transforming Growth Factor beta 1
IGF: Insulin-like growth factor
PKC: Protein kinase C
FAK: focal adhesion kinase
eIF-2: eukaryotic translation initiation factor 2
Hsp47: heat shock protein 47
MAPK: mitogen activated protein kinase
ERK1/2: extracellular signal regulated kinase 1/2
AP-1: activator protein 1
SAPK: stress-activated protein kinase
JNK: c-Jun-N terminal kinase

Tab. 4-9 Legende zu Tab. 4-1. In der Tabelle sind die in Abb. 4-1 verwendeten Abkürzungen der entsprechenden Gene (Proteine) aufgeführt. Die Gene sind in drei Bereiche aufgeteilt: 1. BL, 2. FL und 3. nicht differentiell exprimiert.

4.3 Vergleich der Ergebnisse SAGE, PIQOR™, Northernblot und Q-PCR

4.3.1 Ergebnisse der SAGE

Innerhalb der SAGE wurden insgesamt 54.459 Tags sequenziert, 22.069 Tags für FL, 22.058 Tags für BL und 10.332 Tags für ML (Abb. 3-6). Um einen Einblick in das Expressionsverhalten von hPDFs zu erhalten und die Funktionalität der SAGE zu belegen, wurde zuerst das Expressionsprofil von ML genauer analysiert (s. 3.1.3).

Die 100 am stärksten exprimierten und eindeutig einem Gen zuzuordnenden Tags im ML belegten, dass im Wesentlichen Fibroblasten-typische Gene identifiziert wurden (Smolenski *et al.*, 2004). Die Einteilung in Funktionsbereiche (Tab. 3-2) zeigte auf, dass die Gruppe der EZM mit 17 Transkripten (z. B. *collagen type I alpha 1* und *matrix metalloproteinase 2*) und ca. 36 % die prozentual am stärksten exprimierte Gengruppe bildete, gefolgt von Komponenten des Zytoskeletts (z.B. *actin gamma 1* und *transgelin*) mit ca. 6,8 %.

Neben Genen mit bekannter Funktion konnten schon in den ersten 100 am stärksten exprimierten Tags insgesamt sechs Transkripte identifiziert werden, die keine eindeutige Funktion besitzen. Die starke Expression der sechs nicht einzuordnenden Transkripte lässt vermuten, dass sie für Fibroblasten eine hohe Relevanz haben.

Der Vergleich der SAGE-Datenbanken BL und FL zeigte insgesamt 65 Kandidatengene als differentiell exprimiert. Durch die Verifizierung von fünf Spendern im Pool zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h und 8 h) mittels PIQOR™ konnten insgesamt 8 Kandidatengene identifiziert werden, die zu mindest zu einem der untersuchten Zeitpunkte differentiell exprimiert waren. Vier Gene stimmten in der Tendenz mit den SAGE-Ergebnissen überein. Keins der Gene war zu 2 h eindeutig differentiell exprimiert (Tab. 3-6).

Die Verifizierung der fünf Einzelspender mittels PIQOR™ identifizierte fünf Transkripte, die differentiell exprimiert waren. Mindestens zwei Spender reagierten für das jeweilige Transkript zu dem 2 h-Wert und den Ergebnissen der SAGE entsprechend (Tab. 3-7). Insgesamt fünf der per SAGE identifizierten Transkripte wurden an jeweils einem zufällig ausgesuchten Einzelspender mittels Northernblot-Analyse verifiziert (Abb. 3-9). Auffällig bei der Verifizierung der SAGE-Analyse mittels PIQOR™ und Northernblot war, dass die Ergebnisse nur an den einzelnen Spendern validiert werden konnten und dass die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte ausgehend von den 65 Kandidatengenen gering scheint. Folgende Faktoren können Ursache dafür sein:

1. Einzelspender gegenüber Pool

Grundsätzlich stellt sich in der Konzeption eines Experiments zur Analyse von Genexpressionsprofilen die Frage, ob Spenderanalysen in gepoolter Form oder als Einzelspenderanalysen durchgeführt werden. Der Vorteil in der gepoolten Analyse liegt im Ausgleich spenderabhängiger Differenzen und der Bildung eines experimentellen Mittelwertes für jedes Transkript. Allerdings ergibt sich gleichzeitig das Problem, dass geringe differentielle Expressionen von starken Expressionen einzelner Spender überlagert werden. Als Beispiel dient die Northernblot-Analyse für *MMP1* nach 12 h (Abb. 3-10 A). Bei insgesamt drei der fünf Spender (409, 446 und 480) wurde eine differentielle Expression festgestellt. Die starke nicht differentielle

Expression der *MMP1* der beiden anderen Spender (444 und 449) würde aber wahrscheinlich die differentielle Expression der drei Spender in einer Pool-Analyse überlagern. Aus diesem Grund wurde ein Spender für die SAGE ausgewählt, der durch Voruntersuchungen bereits charakterisiert war. In diesem Fall birgt die Einzelspenderanalyse die Gefahr, spenderspezifische Transkripte zu identifizieren. Die Verifizierung der Ergebnisse mittels PIQOR™ zu weiteren Zeitpunkten und mit weiteren Spendern verringert jedoch das Risiko.

2. Anzahl der sequenzierten Tags

Der Versuchsansatz der SAGE der beiden Kollagensysteme BL und FL sah die Sequenzierung von 20.000 Tags pro Datenbank vor. Die Erhöhung der Anzahl der sequenzierten Tags, kann die Anzahl der statistisch signifikanten Transkripte erhöhen. Allerdings steht der finanzielle Aufwand nicht im Verhältnis zu den zu erwartenden Ergebnissen. Eine Verdopplung der Tagzahl hätte zwar die statistische Relevanz der Ergebnisse verbessert, durch die anschließende Analyse von 65 Kandidatengen (Tab. 3-3 bis 3-5) mittels PIQOR™ wurde aber dem Verlust der Identifizierung potentieller Kandidaten entgegengewirkt.

3. 2 h-Wert der SAGE

Durch die Analyse des 2 h-Wertes der beiden Kollagensysteme FL und BL mittels SAGE und der anschließenden Verifizierung mittels PIQOR™ wurden insgesamt elf unterschiedliche Transkripte identifiziert. Davon waren sechs in FL und fünf in BL stärker exprimiert (Tab. 3-6 und 3-7). Wird die Analyse der beiden Kollagen-Systeme FL und BL mittels des PIQOR™ Skin 1.0 mit einbezogen, stellt der 2 h-Wert im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten den dynamisch schwächsten Zeitpunkt dar. Zum Zeitpunkt 1 h wurden 31 und nach 4 h insgesamt 21 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert (Abb. 3-13). Die Analyse des 2 h-Wertes per SAGE fand also zu einem Zeitpunkt statt, in dem allgemein wenige Transkripte differentiell exprimiert waren.

4. Niedriger differentieller Expressionsquotient und geringe Expression der Tags

Die Ergebnisse der PIQOR™-Analyse zeigten, dass der relative differentielle Expressionsquotient bis auf wenige Ausnahmen um den Wert 2 lag. In den beiden Systemen FL und BL scheint der größte Teil der differentiell regulierten Gene nur eine gering höhere Expression zur Regulation der mechanischen Kräfte zu benötigen. Einen differentiellen Wert >2 mittels SAGE zu identifizieren, erwies sich als problematisch. Der größte Teil der Gene wurde mit weniger als 15 Tags pro Datenbank identifiziert. Statistische Schwankungen innerhalb der Tag-Sequenzierungen führen bei dieser geringen Taganzahl schnell zu fehlerhaften Ergebnissen. Im Vergleich dazu werden in der PIQOR™-Analyse wesentlich mehr Moleküle pro Gen analysiert, was gleichzeitig zu einer höheren Signifikanz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt. Zusätzlich sind viele der identifizierten Tags im Vergleich zu der Gesamtanzahl an sequenzierten Tags nur schwach exprimiert. Dies kann ebenfalls durch statistische Schwankungen zu Fehlern bei der Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte führen.

5. Größe der isolierten Tags

Ein weiterer Faktor, der die Qualität der SAGE beeinflussen kann, ist die Größe eines Tags. Mit zunehmender Taggröße steigt die Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung zu dem entsprechenden Gen eines Tags. Im Gegensatz zu dem ursprünglich durchgeführten SAGE-Protokoll (Velculesu *et al.*, 1995), wurde in dieser Arbeit die Taggröße von 9 auf 11 Basen erhöht (Pennartz *et al.*, 2004), was eine sicherere Identifikation des entsprechenden Gens gewährleistet. Die Arbeitsgruppe um Velculesu publizierte mittlerweile die LongSAGE-Variante, in der die Taggröße auf 15 Basen erhöht wurde (Saha *et al.*, 2002). Ob eine Erhöhung der Taglänge zu einer Verbesserung der Ergebnisse geführt hätte, ist allerdings fraglich, da die Überprüfung der identifizierten Transkripte (s. 2.2.3.15) zu einer eindeutigen Annotation des Tags zum entsprechenden UniGene-Cluster führte.

4.3.2 Ergebnisse des PIQOR™ Skin 1.0

Im Rahmen der Analyse der beiden Kollagengel-Systeme BL und FL mittels des PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Arrays wurden insgesamt 1376 verschiedene Transkripte analysiert. Die ausgewählten Transkripte sind von Bedeutung in der humanen Haut bzw. weisen grundlegende Funktionen auf, unter anderem im Bereich der Signaltransduktion und der Transkriptionsfaktoren. Von diesen Transkripten wurden je Array zwischen 309 und 334 als exprimiert und insgesamt 56 Transkripte zu verschiedenen Zeitpunkten als differentiell exprimiert detektiert. Werden die 56 differentiell exprimierten Transkripte genauer betrachtet, fallen vor allem drei Sachverhalte auf:

- Die Zahl der differentiell exprimierten Transkripte ist in BL mit 35 Genen höher als in FL mit 21 Genen.
- Die Zahl der differentiell exprimierten Transkripte zu einem Zeitpunkt ist mit 41 Genen wesentlich höher als mit 15 Genen zu mehreren Zeitpunkten.
- Der relative differentielle Expressionsquotient ist bis auf wenige Ausnahmen gering (zweifach).

Grundsätzlich stellen sich für die Fibroblasten in den beiden Kollagengel-Systemen zwei unterschiedliche Situationen dar. Nach der Kultivierung der Fibroblasten als Monolayer simulieren die *Kollagen-I*-Gele die EZM. Im FL-System ist eine Anpassung der Zellform und eine Synthese der entsprechenden Komponenten, die eine Reorganisation der EZM ermöglichen, zu erwarten. Die mechanisch gestressten Zellen im BL-System hingegen müssen neben dieser Reorganisation der Matrix zusätzlich auf die erhöhten externen mechanischen Kräfte reagieren. Die in den nicht gestressten Fibroblasten stärker regulierten Gene spiegeln also eher ein Wiedereinstellen auf die normale Umgebung wider, während die im BL-System höher exprimierten Gene eine Reaktion auf den mechanischen Stress darstellen. Auf Grund der zusätzlichen Aufgabe der gestressten Zellen ist auch eine größere Anzahl an differentiell stärker exprimierten Transkripten in diesem System zu erwarten.

Diese Annahme wird durch die Funktionen der als differentiell detektierten Gene unterstützt. In der Gesamtübersicht der beiden Systeme (Tab. 4-7 und 4-8) fällt auf, dass in den Bereichen EZM, Zytoskelett und Zelladhäsion/Zellkommunikation elementare Unterschiede bestehen. Während die nicht gestressten Fibroblasten durch die Expression elementarer Komponenten der EZM (*Kollagen I* und *VI*) und des Zytoskeletts (*Filamin A* und *Coronin1B*) die native Situation wieder herstellen, exprimieren die Fibroblasten im BL-System Komponenten höher, die in der Literatur häufig im Zusammenhang mit mechanischen Kräften (wie z. B. *Decorin*, *Lumican* usw.) beschrieben werden (Tufvesson *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

Charakteristisch für die beiden Kollagengel-Systeme BL und FL ist auch die geringe differentielle Expression der jeweiligen Transkripte. Abgesehen von einigen Genen wie *CTGF* und *Cyr61* werden die Transkripte nur um einen zweifachen Wert stärker differentiell exprimiert. Die Einstellung der Homöostase im mechanisch gestressten System ist also von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, deren Expression nur leicht verändert werden muss. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die differentielle Expression nur

mittels der PIQOR™ ermittelt wurde. Die Validierungen durch Q-PCR und Northernblot zeigten für einige Transkripte eine stärkere differentielle Expression im Vergleich zum PIQOR™ auf.

4.3.3 Validierung der Ergebnisse mittels Q-PCR und Northernblot

Zur weiteren Analyse wurden ausgewählte Kandidaten mittels Q-PCR und Northernblot validiert. Dabei ist auffällig, dass die Ergebnisse der Validierung in der Regel eine höhere Ratio für das analysierte Transkript ergaben als die Ratio, die mittels PIQOR™ ermittelt wurde. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse von Q-PCR, PIQOR™-Analyse der RNA der Einzelspender und PIQOR™-Analyse der gepoolten RNA (Tab. 3-22) zeigt deutlich, dass die differentielle Expression durch eine alternative Methode bestätigt werden kann, die Ratio aber häufig abweicht. In der Regel war die Ratio der Validierung durch Q-PCR höher als die der PIQOR™-Analyse. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Validierung der PIQOR™-Analyse mittels Northernblot (Abb. 3-9). Auch hier konnte die differentielle Expression mit einer in der Regel höheren Ratio verifiziert werden.

4.4 Analyse der Spendervariabilität

Neben der Identifikation differentiell regulierter Transkripte bietet die Einzelspender-Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Möglichkeit, das genregulative Verhalten hinsichtlich der Variabilität und des untersuchten Zeitraums näher zu betrachten. Dabei stellen sich zwei grundlegende Fragen:

1. Wird ein Gen im Vergleich der Spender allgemein differentiell exprimiert?
2. Wird ein Gen zu unterschiedlichen Zeitpunkten differentiell exprimiert?

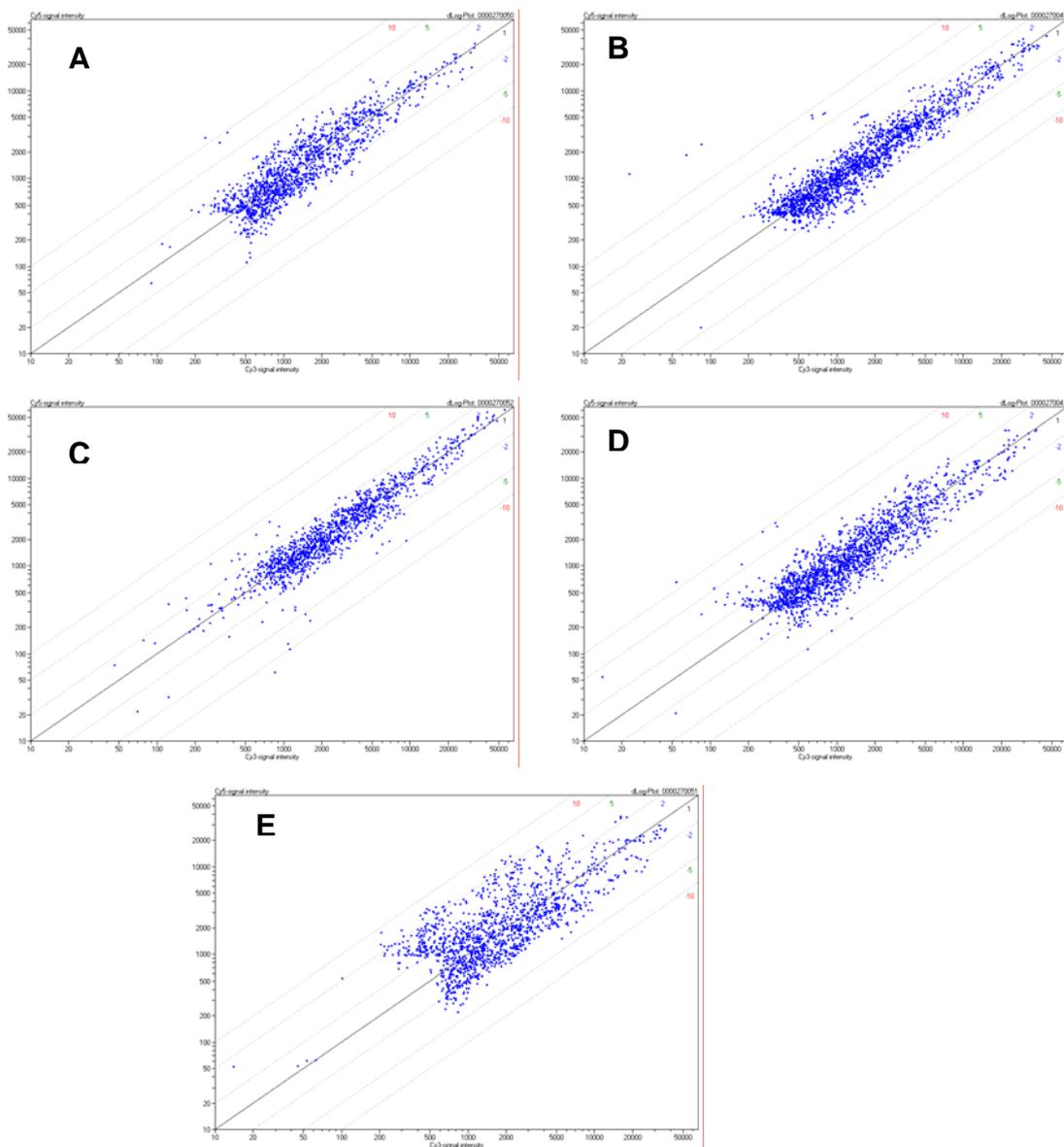


Abb. 4-2 Graphische Darstellung der Cy3- und Cy5-Signalintensitäten der Einzelspenderanalyse des 4 h-Wertes mittels PIQOR™ in der Scatter Plot-Darstellung. Verwendet wurden die Daten der 2SS-Analyse der PIQOR™-Messungen (Spender: A 409; B 444; C 446; D 449; E 480).

Anhand von Beispielen wird gezeigt, dass die Spender zwar gleich bzw. ähnlich auf die jeweilige biologische Situation der Kollagensysteme reagieren, einzelne Transkripte aber sowohl in der Expression als auch in dem Zeitpunkt der Expression deutliche Unterschiede aufweisen.

Eine Möglichkeit der Darstellung der differentiellen Expression sind die sogenannten *Scatter Plots*. Hier werden die einzelnen gemessenen Signalintensitäten des Cy3- und des Cy5-Kanals der PIQOR™-Analyse logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Punkte, die von der idealen Geraden (keine differentielle Expression) nach links oder rechts abweichen, weisen eine dem Quotienten aus X- und Y-Wert entsprechende differentielle Expression auf. Zwar ist die Aussagekraft dieser Darstellungsform nur begrenzt, sie bietet aber die Möglichkeit, einen Überblick über den Grad der Streuung der einzelnen Expressionen zu erhalten.

Abb. 4-2 zeigt die *Scatter Plots* des 4 h-Messwertes der fünf Einzelspender. Neben einzelnen Unterschieden im Bereich der geringer exprimierten Transkripte, fällt vor allen Dingen Spender 480 durch eine wesentlich breitere Streuung auf, was sich einerseits in der Anzahl der gemessenen differentiell exprimierten Transkripte, andererseits in einem stärkeren Grad der Expression in Form des Quotienten (BL/FL) ausdrückt. Für die *Scatter Plots* der einzelnen Spender zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h ergab sich ein ähnliches Bild (s. Appendix 6.4.1 und 6.4.2).

Neben der Betrachtung des gesamten Expressionsprofils in Form des *Scatter Plots* zeigt die Darstellung der Messwerte eines Transkripts der einzelnen Spender zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ebenfalls die Dynamik und die Unterschiede innerhalb des Expressionsgrades. Dabei sind drei verschiedene Reaktionen von Interesse:

1. Unterschiede in der Intensität der Expression (relativer Expressionsquotient): Die einzelnen Spender zeigen für ein Transkript eine differentielle Expression, die sich durch die Größe des relativen Expressionsquotienten unterscheidet.
2. Unterschiede im Expressionszeitpunkt: Die einzelnen Spender zeigen für ein Transkript eine differentielle Expression, allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten.
3. Unterschiedliche Expression: Die einzelnen Spender zeigen für ein Transkript eine differentielle Expression, die aber spenderabhängig ist.

Als Beispiel für Unterschiede in der Intensität der Expression seien die Transkripte *CYR61*, *JWA* und *IGFBP4* genannt. *CYR61* (Abb. 4-3 A) ist ein Beispiel für ein tendenziell exponentiell steigendes Transkript hinsichtlich des relativen Expressionsquotienten. Die mechanisch gestressten Spender reagierten über den analysierten Zeitraum mit einer permanenten Steigerung des relativen Expressionsquotienten. Während zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h nur eine leichte Steigerung gemessen wurde, ist die Erhöhung nach 4 h wesentlich größer. Werden die Spender einzeln betrachtet, fällt auf, dass der relative Expressionsquotient mit Werten zwischen ca. 2,5 und 10 einen recht großen Unterschied aufweist. Der Trend der Steigerung ist aber bei allen Spendern vorhanden und wird laut den gemessenen 8 h-Pool-Werten weiter ansteigen.

JWA (Abb. 4-3 B) und *IGFBP4* (Abb. 4-3 C) sind zwei weitere Beispiele. Beide Transkripte zeigen nach einer anfänglichen differentiellen Expression den Trend zur nicht differentiellen Expression. *JWA* ist ein Beispiel für ein im BL-System höher exprimiertes Transkript, während *IGFBP4* exemplarisch für ein im FL-System höher exprimiertes Transkript steht. *JWA* zeigt zusätzlich beispielhaft den schon bei der Darstellung der *Scatter Plots* erwähnten Unterschied in der Intensität und dem Zeitpunkt der differentiellen Expression

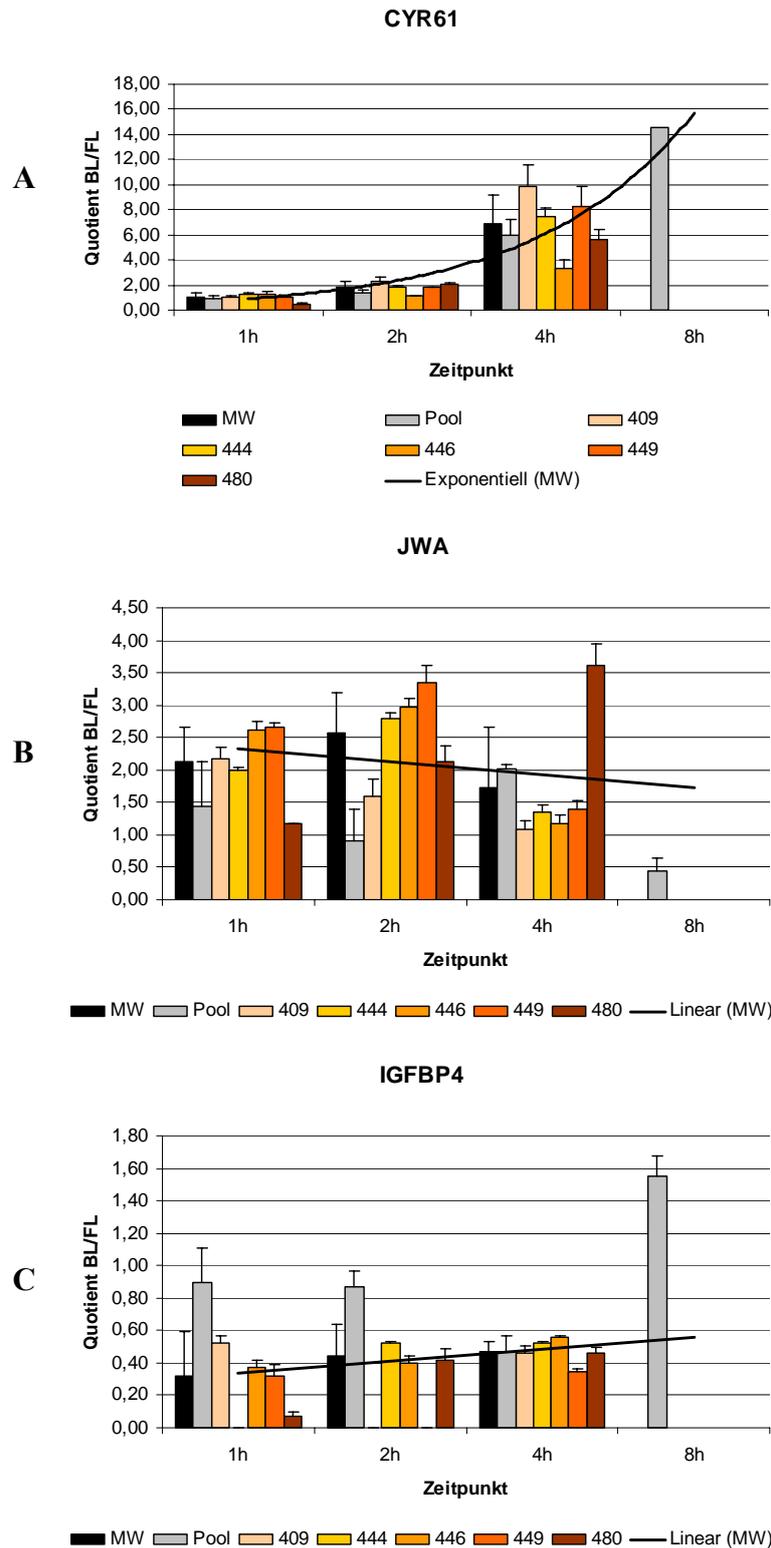


Abb. 4-3 (A – C) Differentielle Expression von CYR61, JWA und IGFBP4 der fünf einzelnen Spender zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Dargestellt sind die Quotienten der PIQOR™ Skin 1.0 cDNA-Array-Daten der fünf Spender (409, 444, 446, 449 und 480) in der Einzelanalyse (1 h, 2 h und 4 h) und der gepoolten Analyse der fünf Spender zu den entsprechenden Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h und 8 h). Die dargestellten Abweichungen der Werte der Einzelspender- und der Poolanalyse entsprechen den angegebenen CV-Werten des PIQOR™ Skin 1.0. Der angegebene Mittelwert (MW) setzt sich aus der Grundgesamtheit der Werte der Einzelspenderanalyse zusammen. Die Standardabweichung wurde entsprechend berechnet. Die CV-Werte wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die dargestellte Trendlinie berücksichtigt nur den gebildeten Mittelwert der Einzelspenderanalyse zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 4 h.

für Spender 480. Während der Grad der relativen differentiellen Expression für die vier übrigen Spender nach 4 h abnimmt, zeigt Spender 480 eine Zunahme. Dieser Trend konnte für diesen Spender bei mehreren Transkripten beobachtet werden (Tab. 4-11 B).

Neben der unterschiedlichen Intensität des relativen Expressionsgrades drückt sich die Spendervariabilität auch durch den Reaktionszeitpunkt aus, an dem die differentielle Expression gemessen wurde. Zwei Beispiele dafür sind *JWA* und *GJAI* (Tab. 4-10). Beide Transkripte zeigten bereits nach einer Stunde einen differentiellen Expressionsquotienten bei mindestens drei Spendern. In beiden Fällen zeigt Spender 409 nur zum 1 h-Zeitpunkt eine differentielle Expression. Die drei Spender 444, 446 und 449 reagieren ähnlich und weisen eine differentielle Expression nach 1 h und 2 h auf, die nach 4 h abnimmt und sich einer ausgeglichenen Expression annähert. Spender 480 reagiert in beiden Fällen frühestens nach 2 h und zeigt bei dem Transkript *JWA* nach 4 h noch eine Steigerung der differentiellen Expression.

	409	CV	444	CV	446	CV	449	CV	480	CV
Zeit	V	(%)								
GJAI										
1 h	3,7	6	-	-	2,00	14	3,38	7	-	-
2 h	1,56	23	5,84	-	2,64	27	2,66	10	1,24	6
4 h	1,29	10	1,08	9	1,7	7	1,98	17	4,25	7
JWA										
1 h	2,18	8	2,00	2	2,62	5	2,65	3	1,17	-
2 h	1,6	16	2,79	3	2,96	5	3,35	8	2,13	11
4 h	1,09	12	1,35	9	1,17	11	1,4	9	3,61	9

Tab. 4-10 Darstellung der unterschiedlichen Reaktionszeitpunkte der fünf Einzelspender zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 4 h für die Gene *GJAI* und *JWA*. In der tabellarischen Zusammenstellung sind die Quotienten der Analyse der Einzelspender zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 4 h mit den zugehörigen CV-Werten angegeben. Der Fettdruck kennzeichnet differentiiell exprimierte Transkripte zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Beide Transkripte zeigten eine höhere relative differentielle Expression im BL-System und sind bedeutend für die Reaktion von dermalen Fibroblasten auf mechanischen Stress. Allerdings zeigt sich hier deutlich, dass der Zeitpunkt der differentiellen Expression bei den einzelnen Spendern unterschiedlich war.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass dieser Trend auch für weitere Gene gilt. Spender 409 reagierte relativ früh, Spender 444, 446 und 449 meist identisch zu den jeweiligen Zeitpunkten, während Spender 480 eine spätere differentielle Expression aufweist.

Für eine Vielzahl an Transkripten konnte sogar nur bei Spender 480 eine differentielle Expression gemessen werden (Tab 4-11 A und B). Dabei war auffällig, dass bei Spender 480 nach 1 h in der Regel eine höhere Expression im FL-System und nach 4 h im BL-System zu beobachten war. Der 2 h-Wert zeigte sich relativ ausgeglichen.

A	Genname	UniGene Nr	Spender									
			409	CV	444	CV	446	CV	449	CV	480	CV
	TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1A	Hs.159	0,9	6	0,8	41	0,8	18	1,0	13	0,3	14
	ITGA5: Integrin Alpha 5	Hs.149609	1,5	11	1,3	8	1,2	-	1,6	0	0,3	16
	TIMP1: Metalloproteinase Inhibitor 1	Hs.5831	1,9	14	1,5	18	1,6	4	1,2	19	2,2	13
	SPARC: SPARC	Hs.111779	1,3	5	1,8	4	1,0	10	1,4	14	0,5	13

B	Genname	UniGene Nr	Spender									
			409	CV	444	CV	446	CV	449	CV	480	CV
	CASP6: Caspase-6	Hs.3280	1,0	12	1,3	4	0,9	2	1,1	13	2,3	11
	PSMA6: Proteasome Iota Chain	Hs.410276	1,6	14	1,5	15	1,2	4	1,4	2	2,3	6
	FZD4: Wnt Receptor Frizzled-4	Hs.19545	0,9	7	1,0	15	1,9	60	1,3	10	2,2	11
	HSPCA: Heat Shock Protein HSP 90 Alpha	Hs.356531	1,6	9	0,7	12	1,1	0	1,5	10	5,0	7

Tab. 4-11 (A und B) Differenziell exprimierte Transkripte von Spender 480. Bei einigen Transkripten zeigte im Vergleich zu den übrigen vier Spendern nur Spender 480 eine differentielle Expression. **A** Differenziell exprimierte Transkripte nach 1 h. **B** Differenziell exprimierte Transkripte nach 4 h.

Die Analyse von Genexpressionsprofilen und die Identifikation potentieller Kandidatengene wird besonders durch den genetischen Background und die Spendervariabilität beeinflusst (Pugliese *et al.*, 1997; Kosarova *et al.*, 1999; Sershen *et al.*, 2002). Dabei sind zwei Faktoren zu berücksichtigen:

1. die genetische Variabilität
2. die Variabilität innerhalb der experimentellen Durchführung

Im Rahmen der Analyse des FL- und BL-Systems wurden insgesamt 56 Kandidaten identifiziert. Auffällig war, dass der größte Teil der Gene nicht von allen fünf Spendern einheitlich differentiiell exprimiert wurde. Es gab sowohl Unterschiede in der allgemeinen Expression (Abb. 4-2) als auch im relativen Expressionsquotienten (Abb. 4-3) und im zeitlichen Expressionsprofil (Tab. 4-10). Ob dabei die genetische Variabilität oder die experimentelle Durchführung Ursache für diese Unterschiede ist, kann nicht eindeutig bestimmt werden. Da die Experimente und die PIQOR™-Analysen für jeden Spender nur einmal durchgeführt worden sind, können die Unterschiede sowohl auf den Genotyp als auch auf die variablen Bedingungen der Zellkulturexperimente zurückgeführt werden.

4.5 Expressionsprofile von kultivierten, transfizierten und Vorhautfibroblasten

Die Vorteile der SAGE konnten ebenfalls im Vergleich von hPDFs gegenüber im Internet publizierten SAGE-Datenbanken von Vorhautfibroblasten und transfizierten Fibroblasten gezeigt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>). In beiden Fällen ergaben sich unterschiedliche Expressionsprofile Fibroblasten-relevanter Gene.

Im Vergleich exprimierten hPDFs Komponenten der EZM stärker (Tab. 3-9 A und 3-10 A). Vorhautfibroblasten hingegen zeigten gegenüber hPDFs ein nicht einheitliches Bild. Besonders auffällig war, dass einige Transkripte stärker exprimiert waren, deren Funktion bisher nicht genau beschrieben und die teilweise in hPDFs nicht detektiert wurden (Tab. 3-10 B). In den transfizierten Fibroblasten waren im Wesentlichen Transkripte aus den Bereichen Metabolismus und Histone stärker exprimiert (Tab. 3-9 B).

Bei dieser Form des bioinformatischen Vergleichs verschiedener SAGE-Datenbanken müssen jedoch mehrere Faktoren, die starken Einfluss auf die Ergebnisse haben, beachtet werden:

1. Anzahl der sequenzierten Tags pro Bank
2. Spendervariabilität
3. Zellkultur- und experimentelle Bedingungen

Die Anzahl der sequenzierten Tags ist für die Qualität der SAGE und die Signifikanz der einzelnen Werte maßgeblich. Je mehr Tags für ein Transkript identifiziert werden, desto höher ist die statistische Relevanz (Audic und Claverie, 1997). Zwar setzt sich die selbsterstellte SAGE-Datenbank *FibroSum* aus über 50.000 Tags zusammen, doch eine größere Anzahl an Transkripten könnte die Signifikanz erhöhen.

Die Spendervariabilität ist mit einer der wichtigsten Aspekte innerhalb der Analyse von Genexpressionsprofilen. Der genetische Background hat starken Einfluss auf die Expression und den Phänotyp (Pugliese *et al.*, 1997; Kosarova *et al.*, 1999; Sershen *et al.*, 2002). Somit können Unterschiede innerhalb der Expressionsprofile auch auf den unterschiedlichen Genotyp zurückgeführt werden. Für den bioinformatischen Vergleich der SAGE-Datenbanken der verschiedenen Fibroblasten ist deshalb eine Validierung mit alternativen Methoden (Northernblot, Q-PCR oder *in situ*-Hybridisierung) und weiteren Spendern notwendig.

Ein weiterer Aspekt liegt in der mangelnden Transparenz der Zellkultur- und experimentellen Bedingungen. Selbst eine publizierte SAGE-Datenbank, in der die Methoden und experimentellen Bedingungen beschrieben wurden, ist nicht ausreichend, weil Abweichungen oder Unterschiede in der Handhabung der Zellen Auswirkungen auf die Ergebnisse haben können. Ein Beispiel ist die verwendete Passagenzahl, die Einfluss auf das Expressionsverhalten von Zellen hat (Khorramizadeh *et al.*, 1999; Mawal-Dewan *et al.*, 2002). Unterschiedliche Passagenzahlen führen zu unterschiedlichen Expressionsprofilen, die sich nicht durch die unterschiedliche lokale Herkunft der Zellen begründen lassen.

4.6 Zusammenfassung der Diskussion

Die Analyse der Expressionsprofile der beiden Modellsysteme FL und BL führte zur Identifizierung stress-relevanter Gene. In weiterführenden Experimenten kann nun die Relevanz dieser Gene weiter untersucht werden. Im BL-System sind insgesamt acht Gene bedeutend, da sie durch ihre Funktion maßgeblichen Einfluss auf die Signaltransduktion, die Expression und das Verhalten der Zelle haben. Diese Gene teilen sich in vier Gruppen auf:

1. Zellrezeptoren
2. Wachstumsfaktoren
3. Signaltransduktion
4. Transkriptionsfaktoren

Aus der Gruppe der Zellrezeptoren ist *DDR2* (*Discoidin domain receptor family, member 2*) besonders erwähnenswert. Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor für fibrilläres Kollagen ist in Fibroblasten bei den Prozessen der Migration und Proliferation beteiligt (Leitinger, 2003). Eine Besonderheit des Rezeptors ist die langsame Autophosphorylierung in einem Zeitraum von 16 bis 24 h (Vogel, 1999), die eine längerfristige Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat. Gerade diese langfristige Aktivierung des Rezeptors zu frühen Zeitpunkten (1 bis 4 h) bietet einen guten Ansatz für ein Gen, das maßgeblich die biologischen Reaktionen der Fibroblasten auf mechanischen Stress einleitet. In pathologischen Situationen wie der PBC (primary biliary cirrhosis) (Mao *et al.*, 2002) und der rheumatoiden Arthritis (Wang *et al.*, 2002) konnte eine Überexpression von *DDR2* gemessen werden.

Bei den Wachstumsfaktoren sind *CTGF* (*Connective tissue growth factor*) und *Cyr61* (*Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61*) zu erwähnen. Beide Gene spielen eine wichtige Rolle bei mechanischem Stress und in pathologischen Situationen, die durch mechanischen Stress gekennzeichnet sind. Bedeutend ist, dass beide Gene zu frühen Zeitpunkten im mechanisch gestressten BL-System stärker exprimiert sind und auch nach 20 h eine höhere Expression nachgewiesen werden kann (Kessler *et al.*, 2001). Zusätzlich wird die Expression beider Gene durch *TGF β 1* beeinflusst. In der Anwesenheit von mechanischem Stress sind *CTGF* und *TGF β 1* zur Myofibroblastendifferenzierung und für die Kontraktion der Kollagenmatrix notwendig (Schild *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2004). *Cyr61* reguliert die Expression der α 1- und α 2-Untereinheit des *Kollagen I* und die Expression von Transkripten, die bei der Angiogenese, bei inflammatorischen Prozessen und im Matrix-Remodeling beteiligt sind [z. B. *VEGA-A*, *VEGA-C*, *MMPI*, *MMP3*, *TIMP1*, *uPA*, *PAI-1* (ebenfalls in BL identifiziert; Tab. 3-18), die *Integrine alpha-3* und *alpha-5*] (Chen *et al.*, 2001). Interessanterweise kann *Cyr61* in Zusammenarbeit mit *TGF β 1* die Expression spezifischer Gene antagonistisch, additiv oder synergistisch beeinflussen (Chen *et al.*, 2001).

Die Transkriptionsfaktoren *HMGB1* (*High-mobility group box 1*), *XBPI* (*X-box binding protein 1*) und *HSF1* (*Heat shock transcription factor 1*) könnten ebenfalls bedeutend in mechanischem Stress sein. Die beiden Gene *HMGB1* und *XBPI* sind von Interesse, da sie an spezifische Promoterelemente binden können und die Transkription weiterer Gen induzieren (Zappavigna *et al.*, 1996; Nozaki *et al.*, 2004). Durch die

Expressionsprofilanalysen konnte kein Gen direkt identifiziert werden, das durch einen der Transkriptionsfaktoren induziert wurde.

HSF1 spielt eine besondere Rolle, da es als Shuttle-Protein fungieren kann. Die Induktion der Proteinexpression von *Hsp47* durch Hitzeschock, mechanischem Stress und *TGF β 1* wird von der Aktivierung und Translokation von *HSF1* in den Zellkern begleitet (Pan *et al.*, 2003).

STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa*) ist an der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und Migration beteiligt. Es stellt ein Bindeglied zwischen der Übertragung von äußeren Kräften ins Zellinnere und der Signalweiterleitung auf der Transkriptionsebene dar. Partner im Zellinneren ist die *focal adhesion kinase (FAK)* (Xie *et al.*, 2001). Diesem Gen kommt eine wichtige Rolle zu, da es das einzige Transkript aus der Gruppe der Signaltransduktion ist, das auf RNA-Ebene identifiziert werden konnte.

Neben den im BL-System identifizierten Transkripten sind auch im FL-System Gene identifiziert worden, deren weiterführende Analyse dabei hilft, die Auswirkungen mechanischer Kräfte auf Hautfibroblasten besser zu verstehen. Auffällig ist, dass einige Transkripte des Zytoskeletts im FL-System stärker exprimiert sind. *Transgelin*, *Coronin*, *FilaminA* und *Calponin* sind Proteine, die mit dem Zytoskelett der Zelle interagieren und Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen können. Das Fehlen äußerer Zugkräfte führt also zu einer aktiven Reorganisation des Zytoskeletts.

Ein weiterer Aspekt ist die höhere Expression der *Kollagene I(α 1)*, *VI (α 1)* und *VI (α 2)* im FL-System. Die drei Transkripte werden in der Regel unter mechanischen Stress-Bedingungen als stärker exprimiert identifiziert (Lambert *et al.*, 1992). Die weiterführende Analyse dieser Gene kann klären, warum zu frühen Zeitpunkten die Transkripte im FL-System höher exprimiert sind.

Die beiden Transkripte *JunB* (*Jun B proto-oncogene*) und *IGFBP4* (*Insulin-like growth factor binding protein 4*), die im FL-System höher exprimiert sind, sollten ebenfalls genauer analysiert werden. Beide Transkripte spielen eine Rolle in der Myoblastendifferenzierung. Die Transdifferenzierung eines Myoblasten zu einem Osteoblasten regelt unter anderem das *bone morphogenetic protein 2 (BMP2) signaling protein*. Maßgeblich ist dabei die Inhibierung der Endozytose von exogenem *BMP2*. Experimentell konnte belegt werden, dass die chemische und mechanische Inhibierung der Endozytose von *BMP2* über die *smad1*-abhängige Expression des *JunB*-Gens, der erste Schritt in der Myoblasten-Dedifferenzierung auf der Transkriptionsebene, zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von *JunB* führte (Rauch *et al.*, 2002).

IGFI ist ebenfalls in der Myoblasten-Differenzierung relevant. Es induziert die Expression von endogenem *IGFBP4*, 5 und 6. Die Konzentration an freien *IGF*, abhängig von *IGFBP4*, scheint die Differenzierung der Myoblasten zu regulieren (Yamane *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen an den Kollagengel-Systemen könnten zeigen, ob die genannten Gene auch in der Myofibroblastendifferenzierung und der Initiation des „aktivierten Phänotyps“ im BL-System bzw. durch Inhibierung der Differenzierung im FL-System eine Rolle spielen.

Neben der Analyse der beschriebenen Gene in den beiden Modellsystemen FL und BL ist auch die Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf komplexe biologische Prozesse bzw. pathologische

Situationen von Bedeutung. Die Analyse der Wundheilung und Narbenbildung zu frühen Zeitpunkten mit den mittels SAGE und PIQOR™ identifizierten Genen könnte zur Entdeckung neuer relevanter Gene führen. Auch die Analyse dieser Gene in Keloiden, hypertrophen Narben und Fibrosen könnte helfen, die Pathologie besser zu verstehen.

4.7 Zusammenfassung

Mechanischer Stress spielt in der Haut bei biologischen Prozessen wie der Wundheilung und Narbenbildung, sowie in pathologischen Situationen wie Keloiden, hypertrophen Narben und Fibrosen eine bedeutende Rolle. Zur Untersuchung des Einflusses von mechanischem Stress auf Hautfibroblasten wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Zellkulturmodellssysteme verwendet, die als Bound Lattice (BL) und Free Lattice (FL) bezeichnet werden. Während im FL-System primäre Hautfibroblasten eine *Kollagen-I*-Matrix frei kontrahieren können, wird im BL-System durch Anlegen eines Nylonrings an die Peripherie der Zellkulturschale die Kontraktion verhindert und folglich mechanischer Stress induziert.

Im Rahmen der Untersuchung der beiden Kollagensysteme BL und FL wurden Analysen der Genexpressionsprofile zu frühen Zeitpunkten im Zeitraum von 1 bis 8 h mit den beiden Methoden SAGE und PIQOR™ durchgeführt. Dabei wurden mehr als 50 Transkripte aus den Bereichen Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Signaltransduktion, Komponenten des Zytoskeletts und der EZM sowie Rezeptoren identifiziert, die in den Systemen differentiell exprimiert waren. Zusätzlich wurden durch Northernblot-Technik und mittels Q-PCR ausgewählte Kandidaten validiert.

Zusätzlich konnten funktionelle Beziehungen zwischen den identifizierten Transkripten dargestellt werden. Dabei reagieren die mechanisch belasteten Fibroblasten zeitabhängig in mehreren Phasen durch die Expression geeigneter Transkripte. In der ersten Phase werden Mechanosensoren an der Oberfläche der Zelle stärker exprimiert, die eine bessere Übertragung der mechanischen Signale ins Zellinnere ermöglichen. Anschließend werden Komponenten des Zytoskeletts differentiell exprimiert, die über Signaltransduktionswege die Expression von Wachstumsfaktoren initiieren. Der dadurch gestartete autokrine und/oder parakrine Loop führt dann zu der Expression weiterer Transkripte, die den nach 20 h entstehenden „aktivierten Fibroblasten“ initiieren.

Die im SAGE erstellten Expressionsprofile wurden des Weiteren dazu genutzt, charakteristische Transkripte für primäre Hautfibroblasten, Vorhautfibroblasten und transfizierte Fibroblasten zu identifizieren. Die bioinformatische Analyse dieser Fibroblastentypen führte zu der Identifizierung zahlreicher differentiell exprimierter Gene. Es konnte aufgezeigt werden, dass Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs unterschiedliche Expressionsprofile besitzen. Des Weiteren konnten durch die Auswertung der im NCBI publizierten SAGE-Datenbanken potentielle Fibroblastenmarker identifiziert werden.

5 Referenzen

- Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Astri-Roques, S., Elabd, C., Ailhaud, G., Amri, E.Z. (2004). Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp Cell Res.*;293(2):219-28.
- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., and et al. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-6
- Anderson, S., DiCesare, L., Tan, I., Leung, T., SundarRaj, N. (2004). Rho-mediated assembly of stress fibers is differentially regulated in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Exp Cell Res.* 2004 Aug 15;298(2):574-83.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7, 2256–2266
- Asano, S., Mishima, M., Nishida, E. (2001). Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery. *Genes Cells.*;6(3):225-35.
- Audic, S., Claverie, J.M. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* ;7(10):986-95.
- Aumailley, M., und T. Krieg. 1994. Structure and function of the cutaneous extracellular matrix. *Eur J Dermatol.* 4:271-280.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S., Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U., Dewerchin, M., Dombrowski, S., Stanimirovic, D., Van Hummelen, P., Dehio, C., Hicklin, D.J., Persico, G., Herbert, J.M., Communi, D., Shibuya, M., Collen, D., Conway, E.M. (2003), Carmeliet P. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* ;9(7):936-43.
- Bakker, A.D., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. (2003). Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. *Biochem Biophys Res Commun.* ;305(3):677-83.
- Ball, D.K., Rachfal, A.W., Kemper, S.A., Brigstock, D.R. (2003). The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *J Endocrinol.* ;176(2):R1-7.
- Baris, O., Savagner, F., Nasser, V., Loriod, B., Granjeaud, S., Guyetant, S., Franc, B., Rodien, P., Rohmer, V., Bertucci, F., Birnbaum, D., Malthiery, Y., Reynier, P., Houlgatte, R. (2004). Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab.*;89(2):994-1005.
- Bell, E., B. Ivarsson, und C. Merrill. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1274-1278.
- Bennett, N.T., Schultz, G.S. (1993). Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.*;165(6):728-37.
- Birukov, K.G., Shirinsky, V.P., Stepanova, O.V., Tkachuk, V.A., Hahn, A.W., Resink, T.J., Smirnov, V.N. (1995). Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem.*;144(2):131-9.
- Black, F.M., Packer, S.E., Parker, T.G., Michael, L.H., Roberts, R., Schwartz, R.J., Schneider, M.D. (1991). The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J Clin Invest.*;88(5):1581-8.
- Bonner, J.C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* ;15(4):255-73.
- Bono, P., Rubin, K., Higgins, J. M. and Hynes, R. O. (2001). Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol. Biol. Cell* 12, 891-900.
- Boonyaratanakornkit, V., Melvin, V., Prendergast, P., Altmann, M., Ronfani, L., Bianchi, M.E., Taraseviciene, L., Nordeen, S.K., Allegretto, E.A., Edwards, D.P. (1998). High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* ;18(8):4471-87.
- Borowsky, M. L. and Hynes, R. O. (1998). Laylin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with c-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J. Cell Biol.* 143, 429-442.
- Brenneisen, P., Briviba, K., Wlaschek, M., Wenk, J., Scharffetter-Kochanek, K. (1997). Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* ;22(3):515-24.
- Brown, N.S., Jones, A., Fujiyama, C., Harris, A.L., Bicknell, R. (2000). Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res.* ;60(22):6298-302.
- Brown, R.A., Prajapati, R., McGrouther, D.A., Yannas, I.V., Eastwood, M. (1998). Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *J Cell Physiol.* ;175(3):323-32.
- Brown, R.A., Sethi, K.K., Gwanmesia, I., Raemdonck, D., Eastwood, M., Mudera, V. (2002). Enhanced fibroblast contraction of 3D collagen lattices and integrin expression by TGF-beta1 and -beta3: mechanoregulatory growth factors? *Exp Cell Res.* ;274(2):310-22.
- Cappadona, C., Redmond, E.M., Theodorakis, N.G., McKillop, I.H., Hendrickson, R., Chhabra, A., Sitzmann, J.V., Cahill, P.A. (1999). Phenotype dictates the growth response of vascular smooth muscle cells to pulse pressure in vitro. *Exp Cell Res.*;250(1):174-86.

- Carlson, S.G., Fawcett, T.W., Bartlett, J.D., Bernier, M., Holbrook, N.J. (1993). Regulation of the C/EBP-related gene *gadd153* by glucose deprivation. *Mol Cell Biol.*;13(8):4736-44.
- Carter, T.A., Bonnemann, C.G., Wang, C.H., Obici, S., Parano, E., De Fatima Bonaldo, M., Ross, B.M., Penchaszadeh, G.K., Mackenzie, A., Soares, M.B., Kunkel, L.M., Gilliam, T.C. (1997). A multicopy transcription-repair gene, *BTF2p44*, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet.* ;6(2):229-36.
- Chaquor, B., Howard, P.S., Richards, C.F. and Macarak, E.J. (1999). Mechanical stress induces platelet-activating factor receptor gene expression through the NF-kappaB transcription factor. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1345-1355.
- Chen, C.C., Mo, F.E., Lau, L.F. (2001). The angiogenic factor *Cyr61* activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* ;276(50):47329-37. Epub 2001 Oct 02.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Thomas, D.G., Shedden, K.A., Taylor, J.M., Kardia, S.L., Misek, D.E., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., Beer, D.G. (2002). Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res.*;8(7):2298-305.
- Chen, J., Yan, W., Setton, L.A. (2004). Static compression induces zonal-specific changes in gene expression for extracellular matrix and cytoskeletal proteins in intervertebral disc cells in vitro. *Matrix Biol.*;22(7):573-83.
- Chen, S., Kulik, M., Lechleider, R.J. (2003). Smad proteins regulate transcriptional induction of the *SM22alpha* gene by TGF-beta. *Nucleic Acids Res.*;31(4):1302-10.
- Chen, W., Fu, X.B., Ge, S.L., Sun, X.Q., Zhou, G., Zhao, Z.L., Sheng, Z.Y. (2004). Development of gene microarray in screening differently expressed genes in keloid and normal-control skin. *Chin Med J (Engl).* ;117(6):877-81.
- Chen, Y., Liu, W., Naumovski, L., Neve, R.L. (2003). *ASPP2* inhibits APP-BP1-mediated NEDD8 conjugation to cullin-1 and decreases APP-BP1-induced cell proliferation and neuronal apoptosis. *J Neurochem.*;85(3):801-9.
- Chicurel, M., Chen, C. S., and Ingber, D. E. (1998) Cellular control lies in the balance of forces. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10,232–239
- Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Fluck M. (2003).How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* 22(1):73-80
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.*;15(3):532-4, 536-7.
- Chotard-Ghodsnia, R., Drochon, A., Faucheux, N., Nagel, M.D., Grebe, R. (2003). Cyclic AMP-dependent cell shape changes induced by mechanical forces. *Biorheology.* ;40(1-3):355-60.
- Clark, E. A., King W. G., Brugge, J. S., Symons, M. and Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* 142, 573-586
- Clark, R.A.F. (1996). Wound repair: overview and general considerations. In: Clark, R.A.F. (Ed.). The molecular and cellular basis of wound repair. Plenum Press, New York, S. 3-50.
- Cogan, J.G., Subramanian, S.V., Polikandriotis, J.A., Kelm, R.J. Jr., Strauch, A.R. (2002). Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription during myofibroblast differentiation requires Sp1/3 protein binding proximal to the MCAT enhancer. *J Biol Chem.* ;277(39):36433-42.
- Cole, D.S., Morgan, B.P. (2003). Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci (Lond).* ;104(5):455-66.
- Colinge, J., Feger, G. (2001). Detecting the impact of sequencing errors on SAGE data. *Bioinformatics.*;17(9):840-2.
- Costa, A.M.; Peyro, I S.; Porto, L.C.; Comparin, J.P.; Foyatier, J.L.; Desmouliere, A. (1999). Mechanical forces induce scar remodeling. Study in non-pressure-treated versus pressure-treated hypertrophic scars. *Am J Pathol* ;155(5):1671-9
- Cowan, D.B., Lye, S.J., Langille, B.L. (1998). Regulation of vascular connexin43 gene expression by mechanical loads. *Circ Res.* 20;82(7):786-93.
- Cserjesi, P., Lilly, B., Hinkley, C., Perry, M., Olson, E.N. (1994). Homeodomain protein *MHox* and MADS protein myocyte enhancer-binding factor-2 converge on a common element in the muscle creatine kinase enhancer. *J Biol Chem.*;269(24):16740-5.
- D'Addario, M., Arora, P.D., Ellen, R.P., McCulloch, C.A. (2002). Interaction of p38 and Sp1 in a mechanical force-induced, beta 1 integrin-mediated transcriptional circuit that regulates the actin-binding protein filamin-A. *J Biol Chem.* ;277(49):47541-50.
- Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R.A., Godfrey, V., Li, H.H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D., Patterson, C. (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J.* ;22(20):5446-58.
- Danciu, T.E., Adam, R.M., Naruse, K., Freeman, M.R., Hauschka, P.V. (2003). Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett.* ;536(1-3):193-7.
- Dasu, M.R., Hawkins, H.K., Barrow, R.E., Xue, H., Herndon, D.N. (2004). Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J Pathol.* ;202(4):476-85.

- Daury, L., Busson, M., Tourkine, N., Casas, F., Cassar-Malek, I., Wrutniak-Cabello, C., Castellazzi, M., Cabello, G. (2001). Opposing functions of ATF2 and Fos-like transcription factors in c-Jun-mediated myogenin expression and terminal differentiation of avian myoblasts. *Oncogene*;20(55):7998-8008.
- Davies, P. F. (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* **75**, 519–60
- De Falco, S., Gigante, B., Persico, M.G. (2002). Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med.* ;12(6):241-6.
- DeKeulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W., Griendling, K.K. (1998). Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state. *Circ. Res.* **82**, 1094-1101.
- Desai, J., Holt-Shore, V., Torry, R.J., Caudle, M.R., Torry, D.S. (1999). Signal transduction and biological function of placenta growth factor in primary human trophoblast. *Biol Reprod.*;60(4):887-92.
- Dethlefsen, S. 1998. Molekulare Analyse des Einflusses mechanischer Kräfte auf den Stoffwechsel primärer Hautfibroblasten. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover
- Drabent, B., Genthe, A., Benecke, B.J. (1986). In vitro transcription of a human hsp 70 heat shock gene by extracts prepared from heat-shocked and non-heat-shocked human cells. *Nucleic Acids Res.*;14(22):8933-48.
- Eckes, B.; Kessler, D.; Aumailley, M.; Krieg, T. (1999). Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. Springer *Semin Immunopathol*;21(4):415-29
- Eckes, B.; Zigrino, P.; Kessler, D.; Holtkotter, O.; Shephard, P.; Mauch, C.; Krieg, T. (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*;19(4):325-32
- Elliott, D. (2003). Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenet Genome Res.* ;103(3-4):210-6.
- Enz, R., Croci, C. (2003). Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes. *Biochem J.* ;372(Pt 1):183-91.
- Eschenfeldt, W.H., Berger, S.L. (1986). The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;83(24):9403-7.
- Fields, C., Adams, M. D., White, O., and Venter, J. C. (1994). How many genes in the human genome? *Nat Genet* **7**, 345-6.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signalling, *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 566-571.
- Finkel, T. (2001). Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life*.52(1-2):3-6.
- Fluck, J., Querfeld, C., Cremer, A., Niland, S., Krieg, T., Sollberg, S. (1998). Normal human primary fibroblasts undergo apoptosis in three-dimensional contractile collagen gels. *J Invest Dermatol.* ;110(2):153-7.
- Flück. M., Tunc-Civelec, V., Chiquet, M. (2000). Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **113**, 3583-3591.
- Fong, S., Mounkes, L., Liu, Y., Maibaum, M., Alonzo, E., Desprez, P.Y., Thor, A.D., Kashani-Sabet, M., Debs, R.J. (2003). Functional identification of distinct sets of antitumor activities mediated by the FKBP gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(24):14253-8.
- Freshney, R.I. (Hrsg.) 1992. *Animal Cell Culture*. 2. Auflage. Oxford University Press, New York
- Fritsch, C., Simon-Assmann, P., Keding, M., Evans, G.S. (1997). Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology*;112(3):826-38.
- Fritsch, P. (1998). *Dermatologie und Venerologie – Lehrbuch und Atlas*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.. Seiten 40-43.
- Gailit, J., Clark, R.A. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* ;6(5):717-25.
- Galbraith, C.G. and Sheetz, M.P. (1998) Forces on adhesive contacts affect cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 566-571.
- Game, J.C., Birrell, G.W., Brown, J.A., Shibata, T., Baccari, C., Chu, A.M., Williamson, M.S., Brown, J.M. (2003). Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2003 Jul;160(1):14-24.
- Gardel, M.L., Shin, J.H., MacKintosh, F.C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., Weitz, D.A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science* ;304(5675):1301-5.
- Garrett, Q., Khaw, P.T., Blalock, T.D., Schultz, G.S., Grotendorst, G.R., Daniels, J.T. (2004). Involvement of CTGF in TGF-beta1-Stimulation of Myofibroblast Differentiation and Collagen Matrix Contraction in the Presence of Mechanical Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* ;45(4):1109-16.
- Gibson, M.A., Finnis, M.L., Kumaratilake, J.S., Cleary, E.G. (1998). Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fibrillin-containing microfibrils but exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. *J Histochem Cytochem.*;46(8):871-86.

- Gloe, T., Sohn, H.Y., Meininger, G.A., Pohl, U. (2002). Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3. *J Biol Chem.* ;277(26):23453-8.
- Grinnell, F., 1994. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J. Cell Biol.* 124, 401-404.
- Groma, V. (1998). Demonstration of collagen type VI and alpha-smooth muscle actin in renal fibrotic injury in man. *Nephrol Dial Transplant.*;13(2):305-12.
- Gusev, N.B. (2001). Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc).*;66(10):1112-21.
- Hakenjos, L., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (2000). TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol.*;76(4):503-9.
- Hapke, S., Kessler, H., Luber, B., Benge, A., Hutzler, P., Hofler, H., Schmitt, M., Reuning, U. (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem.*;384(7):1073-83.
- Haralson, M.A. und J.R. Hassell (Hrsg.). 1995. Extracellular matrix: a practical approach. Oxford University Press, New York
- Hasegawa, T., Takeuchi, A., Miyaishi, O., Xiao, H., Mao, J., Isobe, K. (2000). PTRF (polymerase I and transcript-release factor) is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 (binding factor of a type-I collagen promoter) zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type-I collagen gene promoters. *Biochem J.*;347 Pt 1:55-9.
- Hautmann, M.B., Thompson, M.M., Swartz, E.A., Olson, E.N., Owens, G.K. (1997). Angiotensin II-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin expression by serum response factor and the homeodomain transcription factor MHOX. *Circ Res.*;81(4):600-10.
- Haverty, A.A., Harme, J.H., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J. (1997). Interleukin-6 upregulates GP96 expression in breast cancer. *J Surg Res.* ;69(1):145-9.
- Heinrich, R., Livne, E., Ben-Izhak, O., Aronheim, A. (2004). The c-Jun dimerization protein 2 inhibits cell transformation and acts as a tumor suppressor gene. *J Biol Chem.*;279(7):5708-15.
- Hikake, T., Mori, T., Iseki, K., Hagino, S., Zhang, Y., Takagi, H., Yokoya, S., Wanaka, A. (2003). Comparison of expression patterns between CREB family transcription factor OASIS and proteoglycan core protein genes during murine tooth development. *Anat Embryol (Berl).*;206(5):373-80. Epub 2003 Mar 21.
- Hishikawa, K., Oemar, B.S., Yang, Z., Luscher, T.F. (1997). Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ. Res.* 81, 797-803.
- Hogue, D.L., Kerby, L., Ling, V. (1999). A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* ;274(18):12877-82.
- Hsieh, H.J., Cheng, C.C., Wu, S.T., Chiu, J.J., Wung, B.S., Wang, D.L. (1998). Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J. Cell Physiol.* 175, 156-162.
- Hu, Y., Bock, G., Wick, G., Xu, Q. (1998). Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J.* 12, 1135-1142.
- Huang, S., Chen, C.S., Ingber, D.E. (1998). Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell.*;9(11):3179-93.
- Humbert, S., van Vuuren, H.A., Lutz, Y., Hoeijmakers, J.H.J., Egly, J.-M., Moncollin, V. (1994). p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J.* 13:2393-2398.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-87
- Iborra, A., Mayorga, M., Llobet, N., Martinez, P. (2003). Expression of complement regulatory proteins [membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59)] in endometrial stressed cells. *Cell Immunol.* ;223(1):46-51.
- Im, Y.J., Park, S.H., Rho, S.H., Lee, J.H., Kang, G.B., Sheng, M., Kim, E., Eom, S.H. (2003). Crystal structure of GRIP1 PDZ6-peptide complex reveals the structural basis for class II PDZ target recognition and PDZ domain-mediated multimerization. *J Biol Chem.* ;278(10):8501-7.
- Ingber, D. E. (1991) Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 841-848
- Ingber, D. E. (1997) Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 575-599
- Ingber, D. E. (1999). How cells (might) sense microgravity. *FASEB J* 13 Suppl:S3-15
- Ingber, D.E. (1997). Integrins, tensegrity, and mechanotransduction. *Gravit Space Biol Bull.* ;10(2):49-55.
- Ingber, D.E. (2003) A. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci.* 116(Pt 7):1157-73.
- Ingber, D.E. (2003) B. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci.* 116(Pt 8):1397-408.
- Ishida, T., Takahashi, M., Corson, M.A. and Berk, B.C. (1997). Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological response? *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 811, 12-23.

- Jansa, P., Burek, C., Sander, E.E., Grummt, I. (2001). The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.*;29(2):423-9.
- Jiang, Y.; Kohara, K.; Hiwada, K. (2000). Association between risk factors for atherosclerosis and mechanical forces in carotid artery. *Stroke* ;31(10):2319-24
- Jo, H., Sipos, K., Go, Y.M., Law, R., Rong, J., McDonald, J.M. (1997). Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1395-1401.
- Jordan, E.M., Breen, G.A. (1992). Molecular cloning of an import precursor of the delta-subunit of the human mitochondrial ATP synthase complex. *Biochim Biophys Acta.* ;1130(1):123-6.
- Kang, B.S., Cooper, D.R., Jelen, F., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Otlewski, J., Derewenda, Z.S. (2003). PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure (Camb).* ;11(4):459-68.
- Karin, M., Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.
- Kavdia, M., Popel, A.S. (2003). Wall shear stress differentially affects NO level in arterioles for volume expanders and Hb-based O2 carriers. *Microvasc Res.*;66(1):49-58.
- Kessler, D. 2002. Charakterisierung der Genexpression mechanisch stimulierter Fibroblasten. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Köln.
- Kessler, D.; Dethlefsen, S.; Haase, I.; Plomann, M.; Hirche, F.; Krieg, T. and Eckes, B. (2001). Fibroblasts in Mechanically Stressed Collagen Lattices Assume a "Synthetic" Phenotype` *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 39, 36575-36585
- Kessler-Becker, D., Krieg, T., Eckes, B. (2004). Expression of pro-inflammatory markers by human dermal fibroblasts in a three-dimensional culture model is mediated by an autocrine interleukin-1 loop. *Biochem J.* ;379(Pt 2):351-8.
- Khachigian, L.M., Resnick, N., Gimbrone Jr., M.A., Tucker, C. (1995). Nuclear factor-kappaB interacts functionally with platelet-derived growth factor-B chain shear stress response element in vascular endothelial cells exposed to shear stress. *J. Clin. Invest.* 96, 1169-1175.
- Kherrouche, Z., De Launoit, Y., Monte, D. (2004). Human E2F6 is alternatively spliced to generate multiple protein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* ;317(3):749-60.
- Khorrarnazadeh, M.R., Tredget, E.E., Telasky, C., Shen, Q., Ghahary, A. (1999). Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* ;194(1-2):99-108.
- Kielty, C.M., Wess, T.J., Haston, L., Ashworth, J.L., Sherratt, M.J., Shuttleworth, C.A. (2002). Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J Muscle Res Cell Motil.* ;23(5-6):581-96.
- Kosarova, M., Havelkova, H., Krulova, M., Demant, P., Lipoldova, M. (1999). The production of two Th2 cytokines, interleukin-4 and interleukin-10, is controlled independently by locus Cypr1 and by loci Cypr2 and Cypr3, respectively. *Immunogenetics.* ;49(2):134-41.
- Kraemer, S.M., Gupta, L., Smith, J.D. (2003). New tools to identify var sequence tags and clone full-length genes using type-specific primers to Duffy binding-like domains. *Mol Biochem Parasitol.* ;129(1):91-102.
- Kruithof, E.K., Baker, M.S., Bunn, C.L. (1995). Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood.*;86(11):4007-24.
- Kuiper, R.P., Schepens, M., Thijssen, J., Schoenmakers, E.F., van Kessel, A.G. (2004). Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res.* ;32(8):2315-22.
- Kwak, B.R., Pepper, M.S., Gros, D.B., Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell.* ;12(4):831-45
- Lambert, C.A., Colige, A.C., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V. (2001) Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* ;80(7):479-85.
- Lambert, C.A., E.P. Soudant, B.V. Nusgens, und C.M. Lapiere. (1992). Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab Invest.* 66:444-451.
- Lambert, C.A., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V. (1998). An interleukin-1 loop is induced in human skin fibroblasts upon stress relaxation in a three-dimensional collagen gel but is not involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase 1. *J Biol Chem.*;273(36):23143-9.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson,

- D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., Szustakowski, J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J. (2001); International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. Erratum in: *Nature*; 412(6846):565. *Nature* 2001 Jun 7;411(6838):720. Szustakowski J [corrected to Szustakowski J].
- Langholz, O., D. Rockel, C. Mauch, E. Kozłowska, I. Bank, T. Krieg, und B. Eckes. (1995). Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 131:1903-1915.
- Leask, A., Denton, C.P., Abraham, D.J. (2004). Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol.* ;122(1):1-6. Review.
- Lee, E., Vaughan, D.E., Parikh, S.H., Grodzinsky, A.J., Libby, P., Lark, M.W., Lee, R.T. (1996). Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.*;78(1):44-9.
- Lee, R.T., Schoen, F.J., Loree, H.M., Lark, M.W., Libby, P. (1996). Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;16(8):1070-3.
- Lee, R.T., Yamamoto, C., Feng, Y., Potter-Perigo, S., Briggs, W.H., Landschulz, K.T., Turi, T.G., Thompson, J.F., Libby, P., Wight, T.N. (2001). Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*;276(17):13847-51. Epub 2001 Jan 29.
- Lee, T.L., Lin, Y.C., Mochitate, K., Grinnell, F. (1993). Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. *J Cell Sci.* ;105 (Pt 1):167-77.
- Leitinger, B. (2003). Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *J Biol Chem.* ;278(19):16761-9.
- Lethias, C., Aubert-Foucher, E., Dublet, B., Eichenberger, D., Font, B., Goldschmidt, D., Labourdette, L., Mazzorana, M., van der Rest, M. (1994). Structure, molecular assembly and tissue distribution of FACIT collagen molecules. *Contrib Nephrol.* ;107:57-63.
- Leung, D.Y.M., Glagov, S., Mathews, M.B., 1976. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* 191, 475-477.
- Li, M., Lin, Y.M., Hasegawa, S., Shimokawa, T., Murata, K., Kameyama, M., Ishikawa, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Furukawa, Y. (2004). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol.*;24(2):305-12.
- Liang, F., Gardner, D.G. (1999). Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 104, 1603-1612.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1998). Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* 10, 261-7.
- Liang, P., Bauer, D., Averboukh, L., Warthoe, P., Rohrwild, M., Muller, H., Strauss, M., and Pardee, A. B. (1995). Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol* 254, 304-21.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., and Pardee, A. B. (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* 22, 5763-4.
- Lippincott, J., Li, R. (1998). Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J Cell Biol.* ;143(7):1947-60.
- Liu, J., Schrank, B., Waterson, R.H. (1996). Interaction between a putative mechanosensory membrane channel and a collagen. *Science* 273, 361-364.
- Lucas, S., Brasseur, F., Boon, T. (1999). A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res.*;59(16):4100-3.

- MacKenna, D.A., Dolfi, F., Vuori, K., Ruoslahti, E., 1998. Extracellular signal-regulated kinase and c-jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix specific in rat cardiac fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101, 301-310.
- Mai, B., Breeden, L. (1997). Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol.*;17(11):6491-501.
- Man, M.Z., Wang, X., Wang, Y. (2000). POWER_SAGE: comparing statistical tests for SAGE experiments. *Bioinformatics.*;16(11):953-9.
- Mao, T.K., Kimura, Y., Kenny, T.P., Branchi, A., Gishi, R.G., Van de Water, J., Kung, H.J., Friedman, S.L., Gershwin, M.E. (2002). Elevated expression of tyrosine kinase DDR2 in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity.* ;35(8):521-9.
- Mao, W.G., Li, A.P., Ye, J., Huang, S., Li, A.Q., Zhou, J.W. (2004). Expressions of JWA protein and heat stress protein 70 induced by cell differentiation inducers combined with heat stress in K562 cells. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* ;22(1):60-3.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene.* ;22(21):3307-18.
- Mauch, C., B. Adelman-Grill, A. Hatamochi, und T. Krieg. 1989. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three- dimensional contact with collagen. *FEBS Lett.* 250:301-305.
- McCormack, E.A., Rohman, M.J., Willison, K.R. (2001). Mutational screen identifies critical amino acid residues of beta-actin mediating interaction between its folding intermediates and eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *J Struct Biol.* ;135(2):185-97.
- Mercurio, M., Manning, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 226-232.
- Metzler, B., Abia, R., Ahmad, M., Wernig, F., Pachinger, O., Hu, Y., Xu, Q. (2003). Activation of heat shock transcription factor 1 in atherosclerosis. *Am J Pathol.*;162(5):1669-76.
- Mitchell, J.A., Shynlova, O., Langille, B.L., Lye, S.J. (2004). Mechanical Stretch and Progesterone Differentially Regulate Activator Protein-1 Transcription Factors in Primary Rat Myometrial Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 May 4 [Epub ahead of print]
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.* 131, 791-805.
- Moser, D.R., Lowe, W.L. Jr., Dake, B.L., Booth, B.A., Boes, M., Clemmons, D.R., Bar, R.S. (1992). Endothelial cells express insulin-like growth factor-binding proteins 2 to 6. *Mol Endocrinol.*;6(11):1805-14.
- Moyer, K.E., Siggers, G.C., Ehrlich, H.P. (2004). Mast cells promote fibroblast populated collagen lattice contraction through gap junction intercellular communication. *Wound Repair Regen.* ;12(3):269-75.
- Mudera, V.C., Pleass, R., Eastwood, M., Tarnuzzer, R., Schultz, G., Khaw, P., McGrouther, D.A., Brown, R.A (2000). Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. *Cell Motil Cytoskeleton.* 45(1):1-9.
- Mustoe, T.A. (2004). *Scars and keloids.* *BMJ.* ;328(7452):1329-30.
- Nadruz, W. Jr, Kobarg, C.B., Constancio, S.S., Corat, P.D., Franchini, K.G. (2003). Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. *Circ Res.* ;92(2):243-51.
- Naumovski, L., Cleary, M.L. (1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bc12 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol.*;16(7):3884-92.
- Negrutskii, B.S., El'skaya, A.V. (1998). Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* ;60:47-78.
- Nikaïdo, T., Yokoya, S., Mori, T., Hagino, S., Iseki, K., Zhang, Y., Takeuchi, M., Takaki, H., Kikuchi, S., Wanaka, A. (2001). Expression of the novel transcription factor OASIS, which belongs to the CREB/ATF family, in mouse embryo with special reference to bone development. *Histochem Cell Biol.*;116(2):141-8.
- Nishii, K., Tsuzuki, T., Kumai, M., Takeda, N., Koga, H., Aizawa, S., Nishimoto, T., Shibata, Y. (1999). Abnormalities of developmental cell death in Dad1-deficient mice. *Genes Cells.* ;4(4):243-52.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nomura, S.; Takano-Yamamoto, T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* 19(2):91-6
- Noria, S., Xu, F., McCue, S., Jones, M., Gotlieb, Al., Langille, B.L. (2004). Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Pathol.* ;164(4):1211-23.
- Nozaki, J., Kubota, H., Yoshida, H., Naitoh, M., Goji, J., Yoshinaga, T., Mori, K., Koizumi, A., Nagata, K. (2004). The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells.*;9(3):261-70.

- O'Callaghan, C. J. and Williams, B. (2000). Mechanical Strain-Induced Extracellular Matrix Production by Human Vascular Smooth Muscle Cells - Role of TGF- β_1 . *Hypertension*. 2000;36:319. 319-324
- Olaso, E., Labrador, J.P., Wang, L., Ikeda, K., Eng, F.J., Klein, R., Lovett, D.H., Lin, H.C., Friedman, S.L. (2002). Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem.* ;277(5):3606-13. Epub 2001 Nov 26.
- Ott, C., Iwanciw, D., Graness, A., Giehl, K., Goppelt-Struebe, M. (2003). Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem.* ;278(45):44305-11. Epub 2003 Sep 01.
- Pan, H., Halper, J. (2003). Regulation of heat shock protein 47 and type I procollagen expression in avian tendon cells. *Cell Tissue Res.*;311(3):373-82.
- Pan, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., Ogawa, S. (1999). Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 84, 1127-1136.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.*;269(41):25646-54.
- Pennartz, S., Belvindrah, R., Tomiuk, S., Zimmer, C., Hofmann, K., Conradt, M., Bosio, A., Cremer, H. (2004). Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. *Mol Cell Neurosci.* ;25(4):692-706.
- Petermann, A.T., Hiromura, K., Blonski, M., Pippin, J., Monkawa, T., Durvasula, R., Couser, W.G., Shankland, S.J. (2002). Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney Int.*;61(1):40-50.
- Peters, D.G., Zhang, X.C., Benos, P.V., Heidrich-O'Hare, E., Ferrell, R.E (2002). Genomic analysis of immediate/early response to shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Physiol Genomics*;12(1):25-33.
- Pettersson, M., Bessonova, M., Gu, H.F., Groop, L.C., Jonsson, J.I. (2000). Characterization, chromosomal localization, and expression during hematopoietic differentiation of the gene encoding Arl6ip, ADP-ribosylation-like factor-6 interacting protein (ARL6). *Genomics.* ;68(3):351-4.
- Pitsillides, A.A., Rawlinson, S.C., Suswillo, R.F., Bourrin, S., Zaman, G., Lanyon, L.E. (1995). Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* 9, 1614-1622.
- Pociot, F., Karlsen, A.E. (2002). Combined genome and proteome approach to identify new susceptibility genes. *Am J Med Genet.* ;115(1):55-60. Review.
- Polte, T.R., Eichler, G.S., Wang, N., Ingber, D.E. (2004). Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol.* ;286(3):C518-28.
- Pugliese, G., Pricci, F., Mene, P., Romeo, G., Nofroni, I., Giannini, S., Cresci, B., Galli, G., Rotella, C.M., Di Mario, U., Pugliese, F. (1997). High glucose level unmasks a genetic predisposition to enhanced extracellular matrix production in mesangial cells from the Milan normotensive strain. *J Am Soc Nephrol.* ;8(3):406-14.
- Rannou, F., Richette, P., Benallaoua, M., Francois, M., Genries, V., Korwin-Zmijowska, C., Revel, M., Corvol, M., Poiraudou, S. (2003). Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide. *J Cell Biochem.*;90(1):148-57.
- Rauch, C., Brunet, A.C., Deleule, J., Farge, E. (2002). C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol.*;283(1):C235-43.
- Redlich, M., Roos, H., Reichenberg, E., Zaks, B., Grosskop, A., Bar Kana, I., Pitaru, S., Palmon, A. (2004). The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.*;39(1):27-32.
- Regan, M.C., Kirk, S.J., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1991). The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J Surg Res.*;50(5):442-8.
- Riera, M., Roher, N., Miro, F., Gil, C., Trujillo, R., Aguilera, J., Plana, M., Itarte, E. (1999). Association of protein kinase CK2 with eukaryotic translation initiation factor eIF-2 and with grp94/endoplasmic. *Mol Cell Biochem.* ;191(1-2):97-104.
- Riser, B.L., Denichilo, M., Cortes, P., Baker, C., Grondin, J.M., Yee, J., Narins, R.G. (2000). Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* ;11(1):25-38.
- Robbins, J.R., Evanko, S.P., Vogel, K.G. (1997). Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys.*;342(2):203-11.
- Rosales, O.R., Isales, C.M., Barrett, P.Q., Brophy, C., Sumpio, B.E. (1997). Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca²⁺ concentration through mobilization of intracellular and extracellular pools. *Biochem. J.* 326, 385-392.
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9, 640-648.
- Ruoslahti, E., und M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-497.

- Ruwhof, C. and van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 47(1):23-37.
- Sachs, F. (1993). Ion channels as mechanical transducers. In: Cell Shape Determinants: Regulation and Regulatory Role. (Stein, W.D., Bronner, F., Eds). Pp 63-92. Academic press, San Diego.
- Sadoshima, J. and Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 551-557.
- Saha, S., Sparks, A.B., Rago, C., Akmaev, V., Wang, C.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E. (2002). Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol.*;20(5):508-12.
- Saitta, B., Stokes, D.G., Vissing, H., Timpl, R., Chu, M.L. (1990). Alternative splicing of the human alpha 2(VI) collagen gene generates multiple mRNA transcripts which predict three protein variants with distinct carboxyl termini. *J Biol Chem.* ;265(11):6473-80.
- Saitta, B., Timpl, R., Chu, M.L. (1992). Human alpha 2(VI) collagen gene. Heterogeneity at the 5'-untranslated region generated by an alternate exon. *J Biol Chem.* ;267(9):6188-96.
- Sanger, F., Brownlee, G.G., Barrell, B.G. (1965). A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *J Mol Biol.* ;13(2):373-98.
- Santella, L., Carafoli, E. (1997). Calcium signalling in the cell nucleus. *FASEB J.* 11, 1091-1109.
- Sayah, D.N., Soo, C., Shaw, W.W., Watson, J., Messadi, D., Longaker, M.T., Zhang, X., Ting, K. (1999). Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res.*;87(2):209-16.
- Scaffidi, A.K., Moodley, Y.P., Weichselbaum, M., Thompson, P.J., Knight, D.A. (2001). Regulation of human lung fibroblast phenotype and function by vitronectin and vitronectin integrins. *J Cell Sci.*;114(Pt 19):3507-16.
- Schelling, J.R., Sinha, S., Konieczkowski, M., Sedor, J.R. (2002). Myofibroblast differentiation: plasma membrane microdomains and cell phenotype. *Exp Nephrol* 10(5-6):313-9
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.
- Schild, C., Trueb, B. (2002). Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res.* ;274(1):83-91.
- Schleuning, W. D., Medcalf, R. L., Hession, C., Rothenbuhler, R., Shaw, A., and Kruihof, E. K. (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7, 4564-4567
- Selvaraj, S.K., Giri, R.K., Perelman, N., Johnson, C., Malik, P., Kalra, V.K. (2003). Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* ;102(4):1515-24.
- Sershen, H., Hashim, A., Vadasz, C. (2002). Strain and sex differences in repeated ethanol treatment-induced motor activity in quasi-congenic mice. *Genes Brain Behav.* ;1(3):156-65.
- Sheffield, P.J., Oliver, C.J., Kremer, B.E., Sheng, S., Shao, Z., Macara, I.G. (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J Biol Chem.* ;278(5):3483-8. Epub 2002 Nov 21.
- Shen, Q., Singh, P. (2004). Identification of a novel SP3 binding site in the promoter of human IGFBP4 gene: role of SP3 and AP-1 in regulating promoter activity in CaCo2 cells. *Oncogene.* 2004 Feb 9 [Epub ahead of print]
- Shephard, P., Martin, G., Smola-Hess, S., Brunner, G., Krieg, T., Smola, H. (2004). Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol.* ;164(6):2055-66.
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, und G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell.* 1:25-34
- Shyy, J.Y.-J., Chien, S. (1997). Role of integrins in cellular response to mechanical stress and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 707-713.
- Skutek, M., van Griensven, M., Zeichen, J., Brauer, N., Bosch, U. (2001). Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*;9(5):322-6.
- Smolenski, A., Schultess, J., Danielewski, O., Garcia Arguinzonis, M.I., Thalheimer, P., Kneitz, S., Walter, U., Lohmann, S.M. (2004). Quantitative analysis of the cardiac fibroblast transcriptome-implications for NO/cGMP signaling. *Genomics.* ;83(4):577-87.
- Sottile, J., Hocking, D.C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.*;13(10):3546-59.
- Spoerl, Z., Stumpf, M., Noegel, A.A., Hasse, A. (2002). Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus. *J Biol Chem.*;277(50):48858-67.
- Stern, M.D., Anisimov, S.V., Boheler, K.R. (2003). Can transcriptome size be estimated from SAGE catalogs? *Bioinformatics.*;19(4):443-8.

- Sterpetti, A.V., Cucina, A., Morena, A.R., Di Donna, S., D'Angelo, L.S., Cavalirro, A. (1993). Stipa Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery*;114(5):911-4.
- Stokes, D.G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., Jimenez, S.A. (2001). Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J* ;360(Pt 2):461-70.
- Stollberg, J., Urschitz, J., Urban, Z., Boyd, C.D. (2000). A quantitative evaluation of SAGE. *Genome Res*.;10(8):1241-8.
- Stopak, D., Harris, A.K., 1982. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. *Dev. Biol.* 90, 383-398.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C., Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* .;277(12):10482-8.
- Sundaramoorthy, M., Meiyappan, M., Todd, P., Hudson, B.G. (2002). Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem* .;277(34):31142-53.
- Takada, Y., and Hemler, M. E. (1989). *J. Cell Biol.* **109**, 397–407
- Tamura, I., Rosenbloom, J., Macarak, E., Chaqour, B. (2001). Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* .;281(5):C1524-32.
- Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., Thomas, P.E. (2003). Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278(14):12384-9
- Thoumine, O., Cardoso, O., Meister, J.J. (1999). Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading: a micromanipulation study. *Eur Biophys J* .;28(3):222-34.
- Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J., Henke, C. (2002). beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* .;277(27):24667-75.
- Trächslin, J., Koch, M., Chiquet, M. (1999). Rapid and reversible regulation of collagen XII expressed by mechanical stress. *Exp. Cell Res.* 247, 320-328.
- Tseng, Y., An, K.M., Esue, O., Wirtz, D. (2004). The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks. *J Biol Chem* .;279(3):1819-26.
- Tsuruda, T., Costello-Boerrigter, L.C., Burnett, J.C. Jr. (2004). Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* .;9(1):53-61.
- Tufvesson, E., Westergren-Thorsson, G. (2003). Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J Cell Sci* .;116(Pt 23):4857-64.
- van Damme, H.T., Amons, R., Karssies, R., Timmers, C.J., Janssen, G.M., Moller, W. (1990). Elongation factor 1 beta of artemia: localization of functional sites and homology to elongation factor 1 delta. *Biochim Biophys Acta*.;1050(1-3):241-7.
- van der Vlies, D., Pap, E.H., Post, J.A., Celis, J.E., Wirtz, K.W. (2002). Endoplasmic reticulum resident proteins of normal human dermal fibroblasts are the major targets for oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochem J* .;366(Pt 3):825-30.
- van Zon, A., Mossink, M.H., Schoester, M., Houtsmuller, A.B., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Sonneveld, P., Wiemer, E.A, (2003). The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. *J Cell Sci*.;116(Pt 21):4391-400.
- Vandenburgh, H. H. (1992) Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro. *Am. J. Physiol.* 262, R350–R355
- Varedi, M., Ghahary, A., Scott, P.G., Tredget, E.E. (1997). Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* .;172(2):192-9.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-7.
- Vincent, S., Marty, L., Fort, P. (1993). S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. *Nucleic Acids Res* .;21(6):1498.
- Vogel, W (1999). Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* .;13 Suppl:S77-82.
- Vogel, W. (1999). Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* .;13 Suppl:S77-82.
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, und T. Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*. 1:13-23.
- Wales, M.M., Biel, M.A., el Deiry, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*.;1(6):570-7.
- Wang, J., Lu, H., Liu, X., Deng, Y., Sun, T., Li, F., Ji, S., Nie, X., Yao, L. (2002). Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* .;19(3):161-8.

- Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*. ;260(5111):1124-7.
- Wang, Y.N., Sanders, J.E. (2003). How does skin adapt to repetitive mechanical stress to become load tolerant? *Med Hypotheses*.;61(1):29-35.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D., Scharffetter-Kochanek, K. (1999). Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J Biol Chem*. ;274(36):25869-76.
- Wernig, F. and Xu, Q. (2002). Mechanical stress-induced apoptosis in the cardiovascular system. *Prog Biophys Mol Bio*. ;78(2-3):105-37
- Westermarck, J., Holmstrom, T., Ahonen, M., Eriksson, J.E., Kahari, V.M. (1998). Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biol*. ;17(8-9):547-57.
- Wheeler, D.L., Church, D.M., Edgar, R., Federhen, S., Helmberg, W., Madden, T.L., Pontius, J.U., Schuler, G.D., Schriml, L.M., Sequeira, E., Suzek, T.O., Tatusova, T.A., Wagner, L. (2004). Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update. *Nucleic Acids Res*. ;32 Database issue:D35-40.
- Won, K.A., Schumacher, R.J., Farr, G.W., Horwich, A.L., Reed, S.I. (1998). Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol*. ;18(12):7584-9.
- Woods, A. and Couchmann, J. R. (1994). Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol. Biol. Cell* 5, 183-192.
- Woods, A. and Couchmann, J. R. (1998). Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol* 8, 189-192.
- Woods, A., Longley, R. L., Tumova, S. and Couchmann, J. R. (2000). Syndecan 4 binding to high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys*. 374, 66-72.
- Wu, R.Y., Gill, G.N. (1994). LIM domain recognition of a tyrosine-containing tight turn. *J Biol Chem*.;269(40):25085-90.
- Wung, B.S., Cheng, J.J., Chao, Y.J., Hsieh, H.J., Wang, D.L. (1999). Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells. *Circ. Res*. 84, 804-812.
- Xie, B., Zhao, J., Kitagawa, M., Durbin, J., Madri, J.A., Guan, J.L., Fu, X.Y. (2001). Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem*.;276(22):19512-23. Epub 2001 Feb 21.
- Xu, J., Clark, R.A. (1996). Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol*. ;132(1-2):239-49.
- Yamada, K.M. (1991). Fibronectin and other structural proteins. In E. Hay (Hrsg.) *Biology of the extracellular matrix*. 2. Auflage., Plenum Press, New York.
- Yamane, A., Urushiyama, T., Diekwisch, T.G. (2002). Roles of insulin-like growth factors and their binding proteins in the differentiation of mouse tongue myoblasts. *Int J Dev Biol*.;46(6):807-16.
- Yamazaki, M., Furuike, S., Ito, T. (2002). Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton. *J Muscle Res Cell Motil*.;23(5-6):525-34.
- Yang, J.P., Hori, M., Takahashi, N., Kawabe, T., Kato, H., Okamoto, T. (1999). NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene*. ;18(37):5177-86.
- Yazaki, Y., Komuro, I., Yamazaki, T., Tobe, K., Maemura, K., Kadowaki, T., Nagai, R. (1993). Role of protein kinase system in the signal transduction of stretch-mediated protooncogene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Mol. Cell Biochem*. 119, 11-16-
- Yeh, L.H., Park, Y.J., Hansalia, R.J., Ahmed, I.S., Deshpande, S.S., Goldschmidt-Clermont, P.J., Irani, K., Alevriadou, B.R. (1999). Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am. J. Physiol*. 276, C838-847.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*.;107(7):881-91.
- Yoshida, M., Sagawa, N., Itoh, H., Yura, S., Takemura, M., Wada, Y., Sato, T., Ito, A., Fujii, S. (2002). Prostaglandin F(2alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod*.;8(7):681-7.
- Yoshizumi M, Abe J, Tsuchiya K, Berk BC, Tamaki T (2003). Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Sci* 91(3):172-6
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 114(Pt 20):3583-90.
- Zangani, D., Darcy, K.M., Masso-Welch, P.A., Bellamy, E.S., Desole, M.S., Ip, M.M. (1999). Multiple differentiation pathways of rat mammary stromal cells in vitro: acquisition of a fibroblast, adipocyte or endothelial phenotype is dependent on hormonal and extracellular matrix stimulation. *Differentiation*.;64(2):91-101.

- Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F., Bianchi, M.E. (1996). HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J.* ;15(18):4981-91.
- Zazzi, H., Nikoshkov, A., Hall, K., Luthman, H. (1998). Structure and transcription regulation of the human insulin-like growth factor binding protein 4 gene (IGFBP4). *Genomics.*;49(3):401-10.
- Zebda, N., Bailly, M., Brown, S., Dore, J.F., Berthier-Vergnes, O. (1994). Expression of PNA-binding sites on specific glycoproteins by human melanoma cells is associated with a high metastatic potential. *J Cell Biochem.*;54(2):161-73.
- Zeidan, A., Nordstrom, I., Albinsson, S., Malmqvist, U., Sward, K., Hellstrand, P. (2003). Stretch-induced contractile differentiation of vascular smooth muscle: sensitivity to actin polymerization inhibitors. *Am J Physiol Cell Physiol.*;284(6):C1387-96. Epub 2003 Jan 29.
- Zeidan, A., Sward, K., Nordstrom, I., Ekblad, E., Zhang, J.C., Parmacek, M.S., Hellstrand, P. (2004). Ablation of SM22alpha decreases contractility and actin contents of mouse vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* ;562(1-3):141-6.
- Zhang, C., Meng, X., Zhu, Z., Yang, X., Deng, A. (2004). Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci.* ;75(3):367-79.
- Zigrino, P., Kamiguti, A.S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J.W., Mauch, C. (2002). The reprotysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* ;277(43):40528-35.
- Zimmerman, B., Volberg, T., Geiger, B. (2004). Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton.* ;58(3):143-59.
- Zimmermann, P. and David, G. (1999). The syndecans, tuners of transmembrane signalling. *FASEB J.* 13 Suppl., S91-S100.
- Zimmermann, P., Tomatis, D., Rosas, M., Grootjans, J., Leenaerts, I., Degeest, G., Reekmans, G., Coomans, C., David, G. (2001). Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol Biol Cell.* ;12(2):339-50.
- Zoppi, N., Gardella, R., De Paepe, A., Barlati, S., Colombi, M. (2004). Human fibroblasts with mutations in COL5A1 and COL3A1 genes do not organize collagens and fibronectin in the extracellular matrix, down-regulate alpha2beta1 integrin, and recruit alphavbeta3 Instead of alpha5beta1 integrin. *J Biol Chem.* ;279(18):18157-68.

6 Appendix

6.1 Verwendete SAGE-Datenbanken für Fibroblastenmarker-Analyse

6.1.1 Liste der SAGE-Datenbanken für die „Zelllinienanalyse“ (NCBI)

1. **SAGE_293-CTRL**: Cell line, kidney, embryonic cell line 293, uninduced cells
2. **SAGE_293-IND**: CGAP Lib id: 569, Kidney, embryonic cell line 293, induced cells, expressing beta-catenin
3. **SAGE_Duke_H247_Hypoxia**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line, H247, grown under 1,5% oxygen conditions for 24 hours prior to harvesting
4. **SAGE_Duke_H247_normal**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line, H247, Grown under normal atmospheric conditions
5. **SAGE_Duke_H341**: Cell line, brain, c-myc positive medulloblastoma cell line H341
6. **SAGE_Duke_H392**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line derived from a 65 yo female, Cells harvested at passage 32
7. **SAGE_Duke_H54_EGFRvIII**: Brain, glioblastoma multiforme cell line H54, that has been stably transfected with epidermal growth factor receptor vIII mutant
8. **SAGE_Duke_H54_lacZ**: Brain, glioblastoma multiforme cell line H54, that has been stably transfected with lacZ
9. **SAGE_Duke_HMVEC**: Cell line, human microvascular endothelial cells(HMVEC) harvested at passage 5
10. **SAGE_Duke_HMVEC+VEGF**: Cell line, human microvascular endothelial cells (HMVEC) treated with Vascular endothelial growth factor (VEGF) from Clonetics harvested at passage 5
11. **SAGE_Duke_leukocyte**: normal adult leukocyte from pooled females. Library constructed in the laboratory of G. Riggins
12. **SAGE_Duke_mhh-1**: Brain, c-myc negative medulloblastoma cell line mhh-1
13. **SAGE_ES2-1**: Cell line, ovarian Clear cell carcinoma cell line
14. **SAGE_H408**: brain astrocytoma grade II
15. **SAGE_HCT116**: Cell line, colon, cell line derived from colorectal carcinoma, ATCC: CCL-247, Mutation in the Ras gene, codon 13, Wild type p53, RER+
16. **SAGE_HMEC-B41**: Cell line, cell culture HMEC-B41 of normal human mammary epithelial cells derived from normal mammaplasty specimen
17. **SAGE_HOSE_4**: Cell line, ovary, normal surface epithelium
18. **SAGE_HX**: Normal pancreatic duct epithelium cell line
19. **SAGE_Hemangioma_146**: skin benign hyperplasia juvenile hemangioma tumor
20. **SAGE_IOSE29-11**: Cell line, ovary, surface epithelium line
21. **SAGE_LNCaP**: Cell line, prostate, cell line, Androgen dependent, inactivating mutation in PTEN gene
22. **SAGE_MDA453**: Cell line, cell line MDA-MB-453 of human breast carcinoma, malignant effusion, estrogen receptor negative, from patient treated with radiation and chemotherapy
23. **SAGE_ML10-10**: Cell line, ovary, cystadenoma line ML10
24. **SAGE_NHA5th**: Cell line, brain, normal human astrocyte cells harvested at passage 5
25. **SAGE_OV1063-3**: Cell line, ovary, carcinoma cell line OV1063
26. **SAGE_OVCA432-2**: Cell line, ovary, carcinoma cell line OVCA432
27. **SAGE_PTEN**: Human breast cancer cell line MDA-MB-468 that is PTEN^{-/-}. Cells were infected with an adenovirus expressing the PTEN tumor suppressor
28. **SAGE_Panc1**: Pancreas, cancer cell line
29. **SAGE_RKO**: Cell line, colon, cancer cell line, Wild type p53, RER+
30. **SAGE_SKBR3**: Cell line, aTCC cell line SK-BR-3, Human breast adenocarcinoma from a malignant pleural effusion, Estrogen receptor negative, Patient treated with radiation, steroids cytoxan and 5-fluorouracil
31. **SAGE_SW837**: Cell line, colon, cancer cell line, Mismatch proficient(RER-) with a mutant p53(248arg -> trp) and a mutant APC
32. **SAGE_TSU**: Cell line, prostate, cell line
33. **SAGE_Tu102**: Bulk tissue, colon, primary tumor
34. **SAGE_lacZ**: Breast, cancer cell line, PTEN null. Control for SAGE_PTEN. Cells were infected with an adenovirus expressing lacZ

6.1.2 Liste der SAGE-Datenbanken für „Gesamtbankanalyse“ (NCBI)

1. **SAGE_293-CTRL**: Cell line, kidney, embryonic cell line 293, uninduced cells
2. **SAGE_293-IND**: CGAP Lib id: 569, Kidney, embryonic cell line 293, induced cells, expressing beta-catenin
3. **SAGE_95-259**: mammary gland ductal carcinoma breast CGAP non-normalized SAGE library method bulk
4. **SAGE_95-260**: metastasis mammary gland carcinoma breast CGAP non-normalized SAGE library method bulk
5. **SAGE_95-347**: mammary gland ductal carcinoma breast CGAP non-normalized SAGE library method bulk
6. **SAGE_95-348**: metastasis mammary gland carcinoma breast CGAP non-normalized SAGE library method bulk
7. **SAGE_A+**: Cell line, prostate, cancer cell line, Induced with synthetic androgen (R1881)
8. **SAGE_A2780-9**: Cell line, ovary, ovarian cancer cell line A2780
9. **SAGE_BB542_whitematter**: Bulk tissue, brain, normal, greater than 95% white matter, Post-mortem delay of 3:15, 82 year old male
10. **SAGE_Br_N**: Bulk tissue, breast, normal luminal mammary epithelium, BerEp4 purified cells
11. **SAGE_CAPAN1**: pancreas adenocarcinoma cell line CGAP non-normalized SAGE library method cell line
12. **SAGE_CAPAN2**: Pancreas, cancer cell line
13. **SAGE_CPDR_LNCaP-C**: Cell line, prostate, carcinoma
14. **SAGE_CPDR_LNCaP-T**: Cell line, prostate, carcinoma
15. **SAGE_Caco_2**: Cell line, colon, colorectal carcinoma cell line (RER-), ATCC: HTB-37, 72 year old male
16. **SAGE_Chen_LNCaP**: Cell line, prostate, carcinoma
17. **SAGE_Chen_LNCaP_no-DHT**: Cell line, prostate, carcinoma
18. **SAGE_Chen_Normal_Pr**: Bulk tissue, prostate, normal
19. **SAGE_Chen_Tumor_Pr**: Bulk tissue, prostate, carcinoma
20. **SAGE_DCIS**: Bulk tissue, breast, macroscopically dissected (>90% pure) high grade, comedo DCIS (ductal carcinoma in situ) of the breast obtained from a 67 year old female patient undergoing partial mastectomy, The tumor cells are estrogen and progesteron receptor positive
21. **SAGE_DCIS-3**: Breast, ductal carcinoma in situ, high-grade, comedo, Ber-EP4 purified cells
22. **SAGE_DCIS-4**: Breast, ductal carcinoma in situ, high-grade, comedo
23. **SAGE_DCIS-5**: Breast, ductal carcinoma in situ, high-grade, comedo
24. **SAGE_DCIS_2**: Breast, DCIS, BerEp4 purified cells
25. **SAGE_Duke-H988**: Bulk tissue, brain, well differentiated oligodendroglioma
26. **SAGE_Duke_1273**: Bulk tissue, brain, medulloblastoma
27. **SAGE_Duke_40N**: Bulk tissue, breast, Isolated normal epithelial organoids, Derived from a reduction mammoplasty
28. **SAGE_Duke_48N**: Bulk tissue, breast, isolated normal epithelial organoids, Derived from a reduction mammoplasty
29. **SAGE_Duke_757**: Bulk tissue, brain, medulloblastoma tumor from an 11 yo white female, The tumor was a 4th ventricular mass, of which we received a portion, and the c-myc status of this tumor is not known yet
30. **SAGE_Duke_96-349**: Bulk tissue, breast, infiltrating ductal carcinoma of the breast, Stage II, Node negative, Estrogen and progesterone receptor positive
31. **SAGE_Duke_BB542_normal_cerebellum**: Bulk tissue, brain, BB542-normal cerebellum, post-mortem sample (delay of 3hr15min)
32. **SAGE_Duke_GBM_H1110**: Bulk tissue, brain, Duke glioblastoma multiforme primary tumor derived from a 51 yo male
33. **SAGE_Duke_H1020**: Bulk tissue, brain, anaplastic astrocytoma, primary tumor
34. **SAGE_Duke_H1043**: Bulk tissue, brain, grade one(1) pilocytic astrocytoma
35. **SAGE_Duke_H1126**: well-differentiated fibrillary astrocytoma derived from 50-yr old female
36. **SAGE_Duke_H247_Hypoxia**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line, H247, grown under 1,5% oxygen conditions for 24 hours prior to harvesting
37. **SAGE_Duke_H247_normal**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line, H247, Grown under normal atmospheric conditions
38. **SAGE_Duke_H341**: Cell line, brain, c-myc positive medulloblastoma cell line H341
39. **SAGE_Duke_H392**: Cell line, brain, Duke glioblastoma multiforme cell line derived from a 65 yo female, Cells harvested at passage 32
40. **SAGE_Duke_H54_EGFRvIII**: Brain, glioblastoma multiforme cell line H54, that has been stably transfected with epidermal growth factor receptor vIII mutant
41. **SAGE_Duke_H54_lacZ**: Brain, glioblastoma multiforme cell line H54, that has been stably transfected with lacZ
42. **SAGE_Duke_HMVEC**: Cell line, human microvascular endothelial cells(HMVEC) harvested at passage 5
43. **SAGE_Duke_HMVEC+VEGF**: Cell line, human microvascular endothelial cells (HMVEC) treated with Vascular endothelial growth factor (VEGF) from Clonetics harvested at passage 5
44. **SAGE_Duke_Kidney**: Normal kidney from female, age 53, cause of death IC brain hemorrhage
45. **SAGE_Duke_leukocyte**: normal adult leukocyte from pooled females. Library constructed in the laboratory of G. Riggins
46. **SAGE_Duke_mhh-1**: Brain, c-myc negative medulloblastoma cell line mhh-1

47. **SAGE_Duke_thalamus**: Bulk tissue, brain, normal thalamus, Post-mortem delay of 3:15
48. **SAGE_ES2-1**: Cell line, ovarian Clear cell carcinoma cell line
49. **SAGE_H1126**: Bulk tissue, brain, primary tumor, well-differentiated, fibrillary astrocytoma
50. **SAGE_H126**: Pancreas, normal duct epithelial cells, short term culture
51. **SAGE_H127**: Brain, astrocytoma tumor
52. **SAGE_H408**: brain astrocytoma grade II
53. **SAGE_HCT116**: Cell line, colon, cell line derived from colorectal carcinoma, ATCC: CCL-247, Mutation in the Ras gene, codon 13, Wild type p53, RER+
54. **SAGE_HMEC-B41**: Cell line, cell culture HMEC-B41 of normal human mammary epithelial cells derived from normal mammaplasty specimen
55. **SAGE_HOSE_4**: Cell line, ovary, normal surface epithelium
56. **SAGE_HS766T**: Pancreas, cancer cell line
57. **SAGE_HX**: Normal pancreatic duct epithelium cell line
58. **SAGE_Hemangioma_146**: skin benign hyperplasia juvenile hemangioma tumor
59. **SAGE_IDC-3**: Breast, invasive ductal carcinoma with some in situ component, low-grade, ERpos, erbB2neg, lymph node neg. , p53 neg.
60. **SAGE_IDC-4**: Breast, invasive ductal carcinoma, high-grade, ERneg, erbB2neg., lymph node neg., p53pos.
61. **SAGE_IDC-5**: Breast, invasive ductal carcinoma, low-grade, ERpos, erbB2neg., lymph node neg., p53neg.
62. **SAGE_IOSE29-11**: Cell line, ovary, surface epithelium line
63. **SAGE_LN-1**: Prostate, advanced tumor
64. **SAGE_LNCaP**: Cell line, prostate, cell line, Androgen dependent, inactivating mutation in PTEN gene
65. **SAGE_MDA453**: Cell line, cell line MDA-MB-453 of human breast carcinoma, malignant effusion, estrogen receptor negative, from patient treated with radiation and chemotherapy
66. **SAGE_ML10-10**: Cell line, ovary, cystadenoma line ML10
67. **SAGE_Meso-12**: primary mesothelioma (pure epithelial)
68. **SAGE_NC1**: Bulk tissue, normal colonic epithelium
69. **SAGE_NC2**: Bulk tissue, normal colonic epithelium
70. **SAGE_NHA5th**: Cell line, brain, normal human astrocyte cells harvested at passage 5
71. **SAGE_OC14**: Ovarian Carcinoma, Epithelia
72. **SAGE_OV1063-3**: Cell line, ovary, carcinoma cell line OV1063
73. **SAGE_OVCA432-2**: Cell line, ovary, carcinoma cell line OVCA432
74. **SAGE_OVP-5**: Cell line, ovary, pooled cancer cell lines
75. **SAGE_OVT-6**: Bulk tissue, ovary, primary ovarian tumour, serous adenocarcinoma
76. **SAGE_OVT-7**: Bulk tissue, ovary, primary tumor, Serous adenocarcinoma
77. **SAGE_OVT-8**: Bulk tissue, ovary, primary ovarian tumour, Serous adenocarcinoma
78. **SAGE_PERITO-13**: normal peritoneum, mesothelial cells (90%)
79. **SAGE_PR317_normal_prostate**: Normal prostate tissue obtained by manual microdissection of frozen tissue
80. **SAGE_PR317_prostate_tumor**: Prostate tumor tissue obtained by manual microdissection of frozen tissue
81. **SAGE_PTEN**: Human breast cancer cell line MDA-MB-468 that is PTEN^{-/-}. Cells were infected with an adenovirus expressing the PTEN tumor suppressor
82. **SAGE_Panc1**: Pancreas, cancer cell line
83. **SAGE_Panc_91-16113**: Bulk tissue, pancreas, neoplasia
84. **SAGE_Panc_96-6252**: Bulk tissue, pancreas, neoplasia
85. **SAGE_Ped_GBM1062**: Tumor type: GBM (WHO grade IV). Patient age 4 months
86. **SAGE_PrCA-1**: Prostate, primary tumor
87. **SAGE_RKO**: Cell line, colon, cancer cell line, Wild type p53, RER+
88. **SAGE_SKBR3**: Cell line, aTCC cell line SK-BR-3, Human breast adenocarcinoma from a malignant pleural effusion, Estrogen receptor negative, Patient treated with radiation, steroids cytoxan and 5-fluorouracil
89. **SAGE_SW837**: Cell line, colon, cancer cell line, Mismatch proficient(RER⁻) with a mutant p53(248arg -> trp) and a mutant APC
90. **SAGE_SciencePark_MCF7_Control_0h**: Breast Carcinoma - Pleural effusion, Aldaz Laboratory Estrogen receptor positive MCF7 cells were grown in conditions devoid of estrogen for 48h (i.e. IMEM media supplemented with 10% Charcoal Stripped Serum). This SAGE library represents the 0h time point (i.e. baseline, untreated cells) of an estrogen exposure time course experiment.
91. **SAGE_SciencePark_MCF7_control_3h**: Breast Carcinoma - Pleural effusion MCF7 cells were grown in conditions devoid of estrogen for 48h - (IMEM media supplemented w/ 10% Charcoal Stripped Serum) at time 0h cells were treated with 10⁻⁸ M estradiol (E2) or vehicle - This SAGE library represents the 3h time-point of vehicle treatment
92. **SAGE_SciencePark_MCF7_estradiol_10h**: Breast Carcinoma - Pleural effusion, Aldaz Laboratory. MCF7 cells were grown in conditions devoid of estrogen for 48h - (IMEM media supplemented w/ 10% Charcoal Stripped Serum) at time 0h cells were treated with 10⁻⁸ M estradiol (E2) - This SAGE library represents the 10h time-point of E2 treatment

93. **SAGE_SciencePark_MCF7_estradiol_3h**: Breast Carcinoma - Pleural effusion. Aldaz Laboratory. MCF7 cells were grown in conditions devoid of estrogen for 48h - (IMEM media supplemented w/ Charcoal Stripped Serum) at time 0h cells were treated with 10⁻⁸ M estradiol (E2) - This SAGE library represents the 3h time-point of E2 treatment
94. **SAGE_TSU**: Cell line, prostate, cell line
95. **SAGE_Tu102**: Bulk tissue, colon, primary tumor
96. **SAGE_Tu98**: Bulk tissue, colon, primary tumor
97. **SAGE_astrocytoma_H154**: Brain, astrocytoma tumor
98. **SAGE_astrocytoma_H388**: Brain, astrocytoma tumor
99. **SAGE_breast_hyperplasia**: normal mammary epithelium (gestational hyperplasia) from a 31 year old breast cancer patient (20 weeks pregnant)
100. **SAGE_breast_myoepithelial**: normal mammary myoepithelial cells from breast reduction tissue of a 27 year old female.
101. **SAGE_ependyblastoma_819**: ependyblastoma primary tumor (brain), WHO grade IV, from 9 month old female.
102. **SAGE_ependymoma239**: Bulk ependymoma tissue (brain) from 34 year old female.
103. **SAGE_ependymoma_1394**: Ependymoma, recurrent brain tumor, from 6.3 year old female.
104. **SAGE_ependymoma_353**: Brain, ependymoma tumor
105. **SAGE_ependymoma_455**: Brain, ependymoma tumor
106. **SAGE_ependymoma_582**: Brain, ependymoma tumor
107. **SAGE_gastric_cancer-G189**: Stomach, Human primary gastric cancer tissue
108. **SAGE_gastric_cancer-G234**: Stomach, human primary gastric cancer. gastroesophageal junction adenocarcinoma, T4N0M0, moderately differentiated
109. **SAGE_gastric_cancer_xenograft_X101**: Human primary gastric cancer tissue propagated through nude mice (Xenograft). Tissue Description: 57 yrs male, Gastroesophageal junction adenocarcinoma, T4N0M0, moderately differentiated, obtained by surgery.
110. **SAGE_glioma_1150**: Glioma, primary tumor, from 4 year old female.
111. **SAGE_lacZ**: Breast, cancer cell line, PTEN null. Control for SAGE_PTEN. Cells were infected with an adenovirus expressing lacZ
112. **SAGE_mammary_epithelium**: Bulk tissue, normal human luminal mammary epithelial cells purified with Epithelial Enrich (BER-EP4 antibody conjugated to magnetic beads) tissue obtained from a 43 year old female patient undergoing reduction mammoplasty
113. **SAGE_normal_cerebellum**: Bulk tissue, brain, autopsy sample of cerebellum from a 28 yo white female with diabetes mellitus who died from heart failure
114. **SAGE_normal_gastric_body_epithelial**: normal gastric epithelial tissues (4 pooled) dissected from the body of the stomach, obtained by surgery.
115. **SAGE_normal_heart**: Normal heart, from 56 year old male, cytomegalovirus positive. Total RNA purchased from Ambion, catalog #7966, lot #051P43C. Library constructed using the microSAGE technique
116. **SAGE_normal_liver**: Normal liver from 37 year old male. (Ambion)
117. **SAGE_normal_lung**: normal adult lung from 20 year old male, cytomegalovirus positive. (Ambion)
118. **SAGE_normal_pediatric_cortex_H1571**: Normal frontal cortex, bulk tissue, from 15 month male seizure patient (partial lobectomy).
119. **SAGE_normal_pool6th**: Bulk tissue, brain, normal, pooled, TB-1017 derived from a 51 yo male and TB-1060 derived from a 17 yo male
120. **SAGE_normal_prostate**: normal bulk tissue
121. **SAGE_normal_spinal_cord**: Neural, normal spinal chord. Catalog #6573-1, LOT #0031205. Tissue supplier: Clontech
122. **SAGE_pooled_GBM**: Bulk tissue, brain, 5 pooled Duke glioblastoma multiforme primary tumors

6.2 Datenbanken des Vergleichs Vorhaut-, transfizierte und Haurfibroblasten

6.2.1 SAGE-Datenbank “Vorhautfibroblasten”

Title Foreskin Fibroblasts
 Type sage
 Anchor Nlalll
 Organism [Homo sapiens](#)
 Target source mRNA of untreated foreskin fibroblasts
 Tag count 9759
 Description Primary human foreskin fibroblasts at passages 15-18, cultured in Eagles Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with penicillin and 10% fetal calf serum (FCS).
 Confluent cells serum starved for 3 days with MEM containing 1% FCS. 85% of cells in G0/G1 phase of cell cycle.
 mRNA was isolated using a direct mRNA extraction kit.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM1>

6.2.2 SAGE-Datenbank „transfizierte Fibroblasten“

Title SAGE_Duke_precrisis_fibroblasts
 Type sage
 Anchor Nlalll
 Organism [Homo sapiens](#)
 Target source skin
 Tag count 8851
 Description This library represents a Cancer Genome Anatomy Project library, which was either produced through CGAP funding, or donated to CGAP.
 The Cancer Genome Anatomy Project (CGAP: <http://cgap.nci.nih.gov>) is an interdisciplinary program established and administered by the National Cancer Institute (NCI: <http://www.nci.nih.gov>) to generate the information and technological tools needed to decipher the molecular anatomy of the cancer cell.
 Large T antigen transformed human fibroblasts clones, harvested from skin tissue, that have not reached the cell crisis state. These cells were grown in MEM (Minimum Essential Media) with 10% FBS, 5% CO2 and harvested at passages 4-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM712>

6.3 SAGE Expressionsprofil ML Top - 100

NR	UNIGENENAME	UNIGENENR	TAG	TAG (n)	Kategorie Funktion
1	collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	ACCAAAAACCA	210	EZM
2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD)				
2	gelatinase, 72kD type IV collagenase)	Hs.111301	GGAAATGTCAA	140	EZM, Protease
3	ferritin, heavy polypeptide 1	Hs.62954	TTGGGGTTTCC	117	Metabolisch
4	collagen, type I, alpha 1	Hs.172928	TGAAATGACC	100	EZM
5	collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	TTTGGTTTCC	94	EZM
6	collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	GATGAGGAGAC	87	EZM
	secreted protein, acidic, cysteine-rich				EZM; reguliert Interaktionen zwischen Cytokinen und
7	(osteonectin)	Hs.111779	ATGTGAAGAGT	70	EZM
8	fibronectin 1	Hs.287820	ATCTTGTTACT	64	EZM; Zelladhäsion
9	ferritin, light polypeptide	Hs.111334	CCCTGGGTCT	63	Metabolisch
10	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Hs.181165	TGTGTTGAGAG	61	Elongation Faktor
11	beta-2-microglobulin	Hs.75415	GTTGTGGTTAA	60	MHC; Zelloberfläche Apoptose; Zelldifferenzierung
12	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.227751	GCCCCAATAA	43	(potentiell)
13	ribosomal protein S4, X-linked	Hs.108124	TTGGTCCTCTG	41	Ribosomal
14	collagen, type VI, alpha 1	Hs.108885	TTGCTGACTTT	36	EZM
	Homo sapiens, thymosin, beta 4, X chromosome, clone MGC:22726 IMAGE:4095465, mRNA, complete cds	Hs.356629	TTGGTGAAGGA	34	Interferon induzierbar; unbekannt
16	ribosomal protein S19	Hs.298262	CTGGGTTAATA	30	Ribosomal
	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Hs.77385	GTGCTGAATGG	30	Zytoskelett
18	hypothetical protein FLJ20032	Hs.367639	TGCAGTCACTG	30	unbekannt
19	ribosomal protein L27a	Hs.76064	GAGGGAGTTTC	29	Ribosomal
20	transforming growth factor, beta-induced, 68kD	Hs.118787	GTGTGTTTGTA	29	Wachstumsfaktor
21	actin, gamma 1	Hs.14376	CTAGCCTCACG	28	Zytoskelett
22	thymosin, beta 10	Hs.76293	GGGGAAATCGC	28	Zytoskelett
23	ribosomal protein L32	Hs.169793	TGCACGTTTTTC	27	Ribosomal
24	thrombospondin 1	Hs.87409	AGGTCCTCAAT	26	EZM; Zelladhäsion
25	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	Hs.119571	GATCAGGCCAG	26	EZM
26	transgelin	Hs.75777	ACAGGCTACGG	25	Zytoskelett
27	connective tissue growth factor	Hs.75511	TTTGACCTTT	25	Wachstumsfaktor reguliert Aktivität von Wachstumsfaktoren; Zell Differenzierung und
28	folliculin-like 1	Hs.296267	CCGTGACTCTG	24	Proliferation
29	growth arrest-specific 6	Hs.78501	CTGAGAGCTGG	24	Proliferation und Wachstum
30	osteoblast specific factor 2 (fasciilin I-like)	Hs.136348	GGAAGCTAAGT	24	Zelladhäsion
31	ribosomal protein S17	Hs.5174	GGCCGCGTTCC	23	Ribosomal
32	ribosomal protein L29	Hs.350068	GGGCTGGGGTC	22	Ribosomal Proteinsynthes; Tumor Invasion (beschrieben als überexprimiert)
33	cathepsin B	Hs.297939	TGGGTGAGCCA	22	
34	ribosomal protein S27 (metaloponstimulin 1)	Hs.195453	CACAAACGGTA	21	Ribosomal
35	ribosomal protein L4	Hs.286	CGCCGGAACAC	21	Ribosomal
36	collagen, type VI, alpha 2	Hs.159263	GTGCTAAGCGG	21	EZM
37	actin, beta	Hs.288061	GCTTTATTTGT	20	Zytoskelett
	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Hs.287797	TGAAGTTATAC	20	Integrin; Zellrezeptor; Zelladhäsion
39	ribosomal protein S12	Hs.339696	GCCGAGGAAGG	19	Ribosomal
40	collagen, type I, alpha 2	Hs.179573	GTTCCACAGAA	19	EZM
41	tumor protein, translationally-controlled 1	Hs.279860	TAGGTTGTCTA	19	Unbekannt
42	ribosomal protein L3	Hs.119598	GGACCACTGAA	18	Ribosomal
43	ribosomal protein L18a	Hs.163593	AAGGTGGAGGA	17	Ribosomal
44	eukaryotic translation elongation factor 2	Hs.75309	AGCACCTCCAG	17	Elongationsfaktor
45	ribosomal protein L36	Hs.343443	AGGAAAGCTGC	17	Ribosomal
46	ribosomal protein L13a	Hs.119122	AGGCTACGGAA	17	Ribosomal
47	ribosomal protein L10	Hs.29797	AGGGCTTCCAA	17	Ribosomal

48	ribosomal protein S29	Hs.539	ATAATTCCTTTG	17	Ribosomal
49	ribosomal protein L13	Hs.180842	CCCGTCCGGAA	17	Ribosomal
50	profilin 1	Hs.75721	GGCTGGGGGCC	17	Zytoskelett
51	pyruvate kinase, muscle prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	Hs.198281	TGGCCCCACCC	17	Metabolisch
52	glucose phosphate isomerase	Hs.78575	AAGTTGCTATT	16	Signalinduktion
53	ribosomal protein S6	Hs.279789	ACGCAGGGAGA	16	Metabolisch
54	ribosomal protein S6	Hs.350166	GCCGTGTCCGC	16	Ribosomal
55	Acidic ribosomal phosphoprotein P2	Hs.251247	GGATTTGGCCT	16	Ribosomal Wachstumsfaktor
56	insulin-like growth factor binding protein 3	Hs.77326	ACTGAGGAAAG	15	(regulierend durch Bindung)
57	ribosomal protein L10a	Hs.334895	GGCAAGCCCCA	15	Ribosomal
58	ribosomal protein S18	Hs.275865	TGGTGTGAGG	15	Ribosomal
59	ribosomal protein L17	Hs.356495	AGCTCTCCCTG	14	Ribosomal
60	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Hs.342389	CCTAGCTGGAT	14	Proteinfaltung
61	ribosomal protein L35	Hs.182825	CGCCGCCGGCT	14	Ribosomal
62	metallothionein 2A	Hs.118786	GATCCCAACTG	14	Bindet Schwermetalle
63	ribosomal protein L28	Hs.4437	GCAGCCATCCG	14	Ribosomal
64	ribosomal protein S4, X-linked	Hs.108124	TCAGATCTTTG	14	Ribosomal
65	collagen, type VI, alpha 3	Hs.80988	ACTTTAGATGG	13	EZM
66	ribosomal protein L37	Hs.337445	CAATAAATGTT	13	Ribosomal
67	ribosomal protein, large, P1	Hs.177592	TTCAATAAAAA	13	Ribosomal
68	ribosomal protein L37a	Hs.296290	AAGACAGTGGC	12	Ribosomal
69	ribosomal protein L31 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 2	Hs.184014	AAGGAGATGGG	12	Ribosomal EZM; bindet spezifisch
70	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	Hs.9930	AGCCTTTGTTG	12	Kollagen
71	annexin A2	Hs.119571	CCACAGGGGAT	12	EZM
72	ribosomal protein L19	Hs.355908	CTTCCAGCTAA	12	RNA-bindend; unbekannt
73	ribosomal protein S26	Hs.252723	GAACACATCCA	12	Ribosomal
74	ribosomal protein S26	Hs.299465	TAAGGAGCTGA	12	Ribosomal
75	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs.169476	TACCATCAATA	12	Metabolisch
76	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Hs.2186	TGGGCAAAGCC	12	Elongationsfaktor
77	ribosomal protein L30	Hs.334807	CCAGAACAGAC	11	Ribosomal
78	ribosomal protein L26	Hs.91379	CCCATCCGAAA	11	Ribosomal
79	ribosomal protein L11 low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2- macroglobulin receptor)	Hs.179943	CGCTGGTTCCA	11	Ribosomal Zellrezeptor; interagiert mit Plasminogen Aktivatoren
80	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	Hs.89137	CTCAACCCCCC	11	Protease intrazellular Zellrezeptor bindend; Kinase Funktion;
81	endocytic receptor (macrophage mannose receptor family)	Hs.343475	GAAATACAGTT	11	Endozytose
82	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 5 (RNA helicase, 68kD)	Hs.7835	GCCCTTTCTCT	11	RNA-Helikase
83	milk fat globule-EGF factor 8 protein	Hs.76053	GCCTTCCAATA	11	Bindet Phospholipide
84	collagen, type VI, alpha 2 eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (beta, 36kD)	Hs.3745	GGTTGGCAGGG	11	EZM Elongation; Translation Initiation
85	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Hs.159263	GTGGCACACGC	11	Integrin; Zellrezeptor
86	likely ortholog of mouse Urb	Hs.295726	TAACTTGTGAC	11	unbekannt
87	tropomyosin 1 (alpha)	Hs.356289	TGGCCAGCTCC	11	Zytoskelett
88	ribosomal protein S27a cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 [Swissprot: sp O60565;]	Hs.77899	TTAAAGATTTA	11	Ribosomal
89	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 actin related protein 2/3 complex, subunit 2 (34 kD)	Hs.3297	AACTAAAAAAA	10	unbekannt
90	ribosomal protein S16 procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4- dioxygenase (proline 4-hydroxylase),	Hs.40098	AATCTGTAACT	10	Elongation Faktor
91	solute carrier family 38, member 2	Hs.181165	AGAACCTTCCA	10	Zytoskelett
92	myosin, light polypeptide 9, regulatory	Hs.83583	CAGGAGTTCAA	10	Ribosomal
93	ribosomal protein S3A	Hs.80617	CCGTCCAAGGG	10	Protein Disulfid Isomerase
94	KIAA0675 gene product	Hs.75655	CCTGGAAGAGG	10	unbekannt
95	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	Hs.298275	CTTAATCCTGA	10	Zytoskelett
96		Hs.9615	GGAGTGTGCTC	10	Ribosomal
97		Hs.77039	GTGAAGGCAGT	10	unbekannt
98		Hs.165662	TACCCTAAAC	10	EZM
99		Hs.750	TGCAATATGCC	10	
100					

6.4 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0

6.4.1 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0 – Einzelspenderanalyse 1h

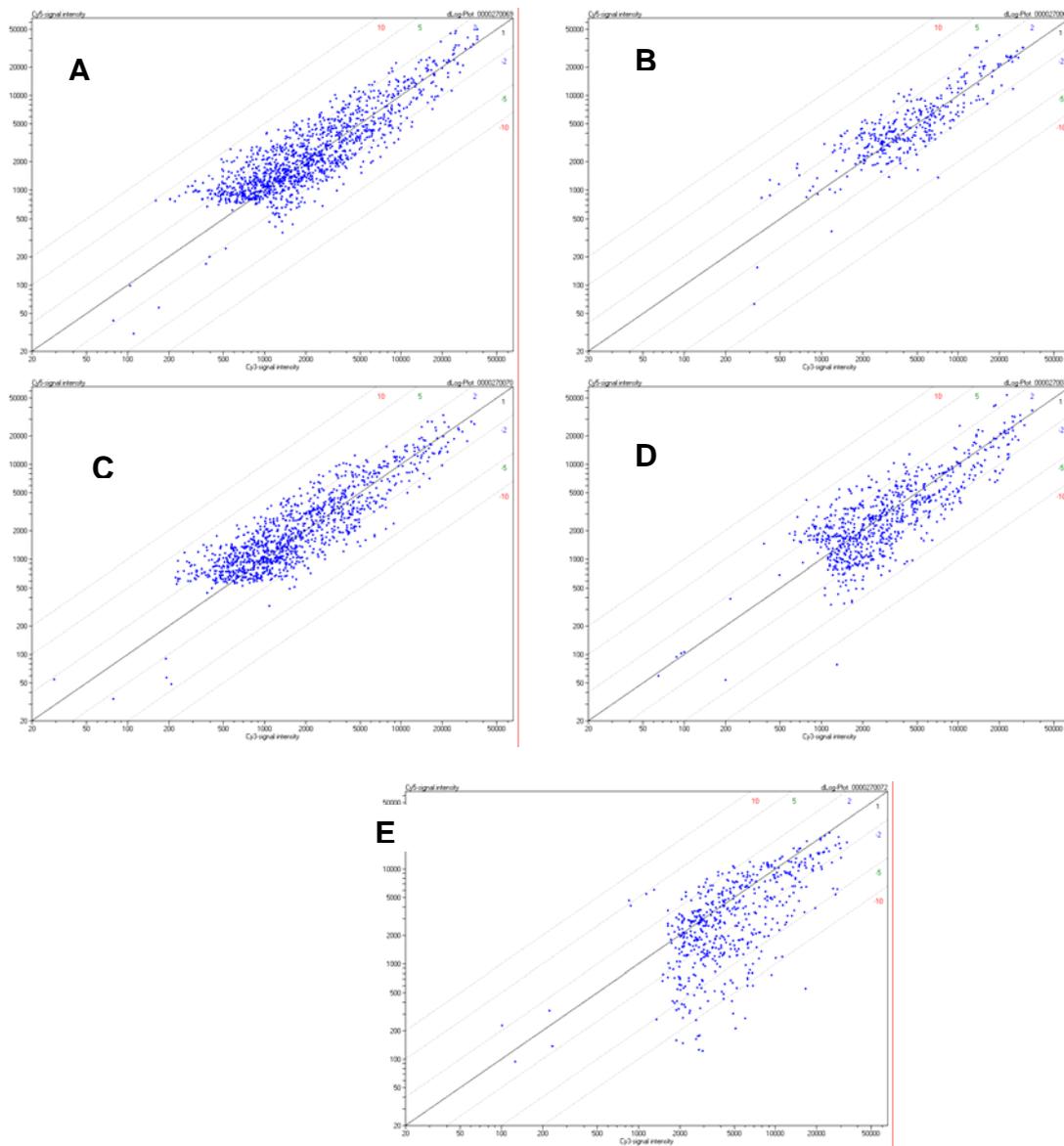


Abb. 6-1 Graphische Darstellung der Cy3- und Cy5-Signalintensitäten der Einzelspenderanalyse des 1h-Wertes mittels PIQOR™ in der *Scatter Plot* Darstellung. Verwendet wurden die Daten der 1SS-Analyse der PIQOR™-Messungen. (Spender: A 409; B 444; C 446; D 449; E 480).

6.4.2 Scatterplots PIQOR™ Skin 1.0 – Einzelspenderanalyse 2h

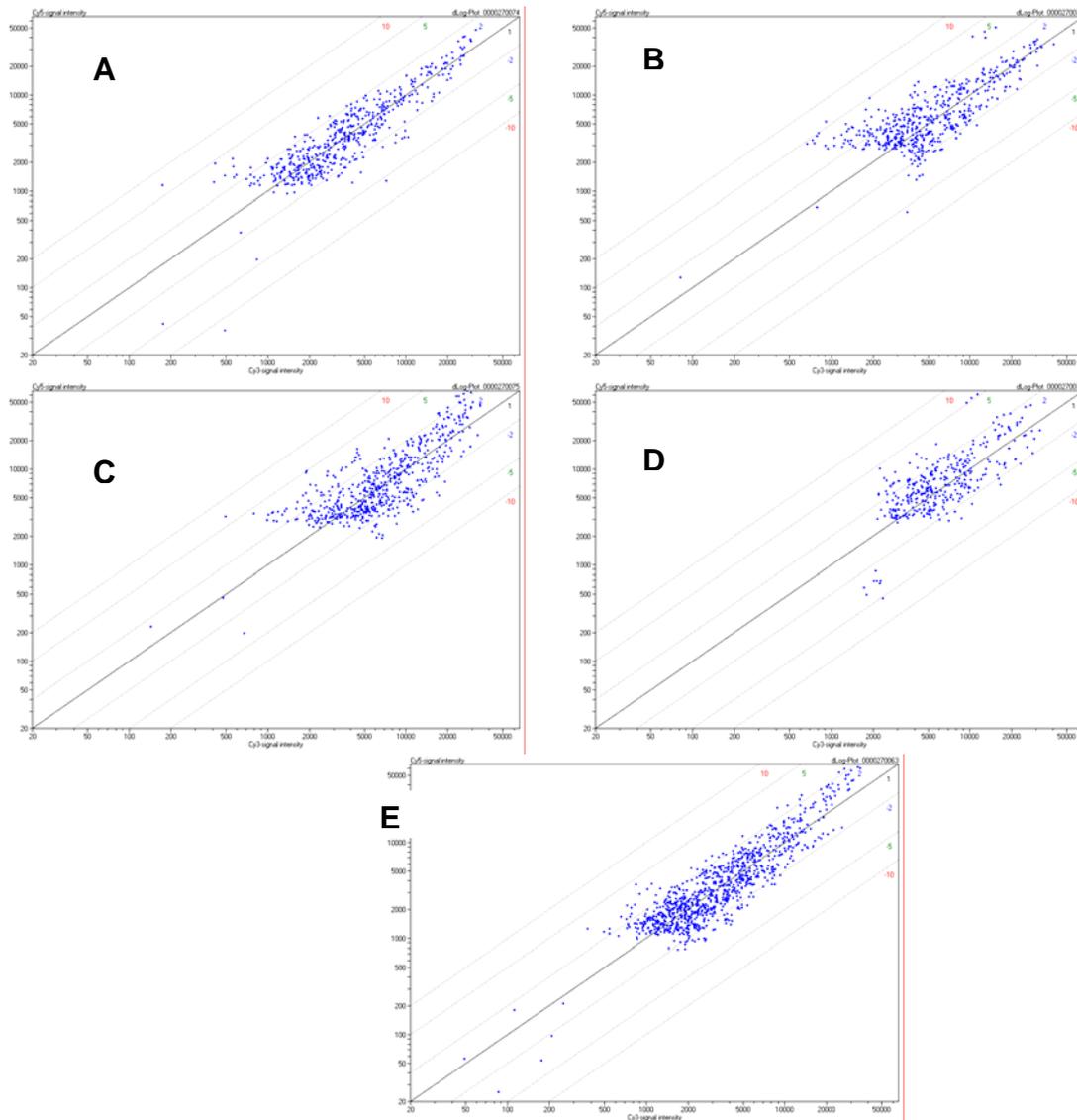


Abb. 6-2 Graphische Darstellung der Cy3- und Cy5-Signalintensitäten der Einzelspenderanalyse des 2h-Wertes mittels PIQOR™ in der *Scatter Plot* Darstellung. Verwendet wurden die Daten der 1SS-Analyse der PIQOR™-Messungen. (Spender: A 409; B 444; C 446; D 449; E 480).

7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
b	Base
BL	Bound Lattice
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serum Albumin
cDNA	Copy DNA
CV	Standardabweichung (PIQOR)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
ERSR	Endoplasmic Reticulum Stress Response
EST	Expressed sequence tag
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum
FL	Free (Floating) Lattice
GAG	Glykosaminglykane
hPDF	humane primäre Hautfibroblasten
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
ML	Monolayer
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dicht
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate bufferd saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PIQOR	Parallel Identification and Quantification of RNAs
PolyHEMA	Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat
Q-PCR	Semiquantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAC	stretch activated channel
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSII	Superscript II
SSRE	shear stress responsive element
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultra Violett
WWW	World Wide Web

8 Bildnachweis

Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Haut.

Quelle: <http://www.uni-bayreuth.de/departments/didaktikchemie/umat/gelatine/gelatine.htm>

Abb. 1-3 Signaltransduktion durch mechanische Kräfte.

Quelle: modifiziert nach Ruwhof und Laarse, 2000

Abb. 1-4 Mechanisch belastete Fibroblasten zeigen nach 20 h eine koordinierte Expression verschiedener funktioneller Gengruppen.

Quelle: Kessler, 2002

Abb. 3-1 Kollagengele „Freely Floating Lattice“ und „Bound Lattice“ nach 20 h Kulturdauer.

Quelle: Dethlefsen, 1998

Abb. 3-2 Kontraktion der Kollagengelfläche und entstehende interne Kräfte.

Quelle: Kessler *et al.*, 2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg und Frau Dr. Beate Eckes danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, für die Themenstellung und die kritische Diskussion dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Stoffel danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und seine kritische Diskussion. Herrn Professor Dr. Brüning danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt der Firma Memorec Köln, insbesondere Herrn Dr. Boris Stoffel. Weiter möchte ich Dr. Andreas Bosio für die Betreuung der PIQOR-Analysen danken, Dr. Markus Conradt für die Betreuung der SAGE und Dr. Kay Hofmann für zahlreiche Hilfestellungen bei den bioinformatischen Analysen. Danken möchte ich auch Jana, Stefie und Gerd für ihre technische Unterstützung, für den Spaß und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Gabi möchte ich für Ihre Unterstützung in der Zellkultur und bei der Durchführung der Zellkultur Experimente danke. Angelika danke ich für Ihre kritische Diskussion und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Semra, Kerstin, Pierre und Barbara möcht ich für die gute Stimmung danken. Alle zusammen haben mir auch in schwierigen Zeiten immer geholfen.

Großen Dank möchte auch meinen Eltern aussprechen. Lin-Chi danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit, für Ihr Durchhaltevermögen mich zu unterstützen und für die ein oder andere nette Überraschung.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern der Laboratorien der Hautklinik, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abstract

Mechanischer Stress spielt in der Haut eine bedeutende Rolle bei biologischen Prozessen wie der Wundheilung und Narbenbildung, sowie in pathologischen Situationen wie Keloiden, hypertrophen Narben und Fibrosen. Zur Untersuchung des Einflusses von mechanischem Stress auf Hautfibroblasten wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Zellkulturmodellsysteme verwendet, die als Bound Lattice (BL) und Free Lattice (FL) bezeichnet werden. Während im FL-System primäre Hautfibroblasten eine *Kollagen-I*-Matrix frei kontrahieren können, wird im BL-System durch Anlegen eines Nylonrings an die Peripherie der Zellkulturschale die Kontraktion verhindert und folglich mechanischer Stress induziert.

Im Rahmen der Untersuchung der beiden Kollagensysteme BL und FL wurden Analysen der Genexpressionprofile zu frühen Zeitpunkten im Zeitraum von 1 bis 8 h mit den beiden Methoden SAGE und PIQOR™ durchgeführt. Dabei wurden mehr als 50 Transkripte aus den Bereichen Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Signaltransduktionen, Komponenten des Zytoskeletts und der EZM sowie Zellrezeptoren identifiziert, die in den Systemen differentiell exprimiert waren. Zusätzlich wurden durch Northernblot-Technik und mittels Q-PCR ausgewählte Kandidaten validiert.

Durch eine Literaturrecherche konnten funktionelle Beziehungen der identifizierten Transkripte dargestellt werden. Dabei reagieren die mechanisch belasteten Fibroblasten zeitabhängig in mehreren Phasen durch die Expression geeigneter Transkripte. In der ersten Phase werden Mechanosensoren an der Oberfläche der Zelle stärker exprimiert, die eine bessere Übertragung der mechanischen Signale ins Zellinnere erlaubt. Anschließend werden Komponenten des Zytoskeletts differentiell exprimiert, die über Signaltransduktionswege die Expression von Wachstumsfaktoren initiieren. Der dadurch gestartete autokrine parakrine Loop führt dann zu der Expression weiterer Transkripte, die den nach 20 h entstehenden „aktivierten Fibroblasten“ initiieren.

Im Zusammenhang mit der Entstehung des „aktivierten Fibroblasten“ konnte aufgezeigt werden, dass der Myofibroblasten ähnliche Phänotyp nicht nur im BL-System aktiviert wird, sondern auch im FL-System suppremiert zu werden scheint. Weiterführende Untersuchungen der in diesem Fall identifizierten Kandidatengene kann helfen, die Entstehung bzw. Supprimierung des „aktivierten Phänotyps“ besser zu verstehen.

Die im SAGE erstellen Expressionsprofile wurden des Weiteren dazu genutzt, charakteristische Transkripte für primäre Hautfibroblasten, Vorhautfibroblasten und transfizierte Fibroblasten zu identifizieren. Die bioinformatische Analyse dieser Fibroblastentypen führte zu der Identifizierung zahlreicher differentiell exprimierter Gene. Es konnte aufgezeigt werden, dass Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs unterschiedliche Expressionsprofile besitzen. Des Weiteren konnten durch die Auswertung der im NCBI publizierten SAGE-Datenbanken potentielle Fibroblastenmarker identifiziert werden.

Mechanical forces play an important role in the skin during physiological processes like tissue repair and scar formation, as well as in pathological situations such as keloids, hypertrophic scars and fibrosis. To investigate the influence of mechanical stress on skin fibroblasts, we cultured primary human dermal fibroblasts from healthy donors in three-dimensional collagen type I lattices in the presence or absence of mechanical stress. In “freely contracting lattices” (FL), fibroblasts reorganize the collagen fibrils and contract the lattice to a dense network. In this system, cells are under no significant mechanical load. By contrast, in the “bound lattices” (BL), fibroblasts develop isometric tension against the collagen matrix, which cannot be contracted.

Gene expression profiles were generated from fibroblasts in these two mechanical environments at 1 to 8 hours after culture initiation and analyzed by SAGE (serial analysis of gene expression) and cDNA microarrays. More than 50 differentially expressed transcripts were identified in both systems including transcription factors, growth factors, signal transduction molecules, components of the cytoskeleton and the extracellular matrix as well as cell receptors. Validation of the results obtained for some selected candidates was performed by Northernblot analysis and by real time RT-PCR.

Mechanically loaded fibroblasts alter the expression of transcripts in a time-dependent fashion. In the first phase of mechanical loading, mechanical sensors at the cell surface are more strongly expressed thus facilitating the intracellular transmission of mechanical signals. Subsequently, components of the cytoskeleton are differentially expressed and thought to transmit the signals leading to induction of growth factor expression. The initiated autocrine and/or paracrine loops lead to the expression of further transcripts, which induce the fibroblast „activated phenotype“ after 20 h.

SAGE expression profiles revealed characteristic transcripts of primary skin fibroblasts, foreskin fibroblasts and transfected fibroblasts. The bioinformatic analysis of these results lead to the identification of different expression profiles according to the origin of the fibroblasts. In addition, potential fibroblast markers were identified by screening of the SAGE data generated in this study as well as by analysis of the SAGE data base available at NCBI.

LEBENS LAUF

Axel Seher

Höninger Weg 124
50969 Köln

Persönliche Daten

Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdatum und -ort 22.03.1972 in Köln

Berufliche Tätigkeit

seit 08/1999 **Promotion** im Bereich **Biologie** (im Fach Biochemie) in der Dermatologie und Venerologie der Medizin der Universität Köln bei Herrn Professor Dr. Krieg und Herrn Professor Dr. Stoffel mit dem Thema „Analyse der Genexpression primärer dermaler Fibroblasten unter mechanischem Stress“

11/1999 – 09/2001 Praktische Tätigkeit in dem biotechnologischen Unternehmen Memorec (Köln) im Rahmen einer Kooperation mit der Dermatologie der Universität Köln

Berufliche Weiterbildung

10/1998 Ausbildung zum **Beauftragten für biologische Sicherheit**

Schulische Ausbildung/Studium

05/1998 – 05/1999 **Diplomarbeit** mit dem Thema „Die funktionelle Expression der B-Kette des Mistellektins 1“

1992 – 1999 Studium der Biologie mit den Schwerpunkten **Biochemie, Genetik** und **Molekulare Entwicklungsbiologie** an der Albertus Magnus Universität Köln

1991 – 1992 Allgemeiner Wehrdienst in der Bundeswehr (Koblenz)

1982 – 1991 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Köln

1978 – 1982 Grundschule Loreleystr., Köln

Köln, den 30.11.2004

Axel Seher

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Professor Dr. Stoffel und Herrn Professor Dr. Krieg betreut worden.

Köln, den 30.11.2004

Axel Seher