

**Daniela Keßler: Charakterisierung der Genexpression mechanisch stimulierter Fibroblasten.
2001**

Mechanische Kräfte wirken in vielfältiger Weise von außen auf den Organismus ein und werden gleichzeitig auch von den Körperzellen selbst aufgebaut. Obwohl gerade dem dermalen Bindegewebe mit seiner Zug- und Reißfestigkeit eine zentrale Rolle bei der Regulation des mechanischen Gleichgewichtes in der Haut zukommt, ist wenig darüber bekannt, wie mechanische Stimuli den Stoffwechsel von Fibroblasten beeinflussen. Störungen des regulierten Auf- und Abbaus der extrazellulären Matrix aufgrund einer gesteigerten mechanischen Belastung fördern die unkontrollierte Matrixablagerung, wie sie z. B. bei hypertrophen Narben, bei Keloiden aber auch bei fibrotischen Erkrankungen zu beobachten ist. Um den Einfluss mechanischer Kräfte auf die Genexpression dermalen Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Zellen *in vitro* in dreidimensionalen Kollagen-Gelen unter isotonischen oder isometrischen Bedingungen kultiviert. Mit Hilfe eines cDNA-Mikrochip-Arrays ergänzt durch detaillierte Northern Blot-Analysen wurde eine Vielzahl von differentiell regulierten Genen mit bekannter und unbekannter Funktion identifiziert. Mechanische Stimulation von Fibroblasten führte zur Induktion von Transkripten, die u. a. extrazelluläre Matrixmoleküle, fibrogene Wachstumsfaktoren, Protease-Inhibitoren und Komponenten der Fokalkontakte und des Zytoskeletts kodieren, während eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren, matrixdegradierenden Enzymen und apoptose-assoziierten Molekülen reprimiert wurden. Dies ging einher mit fundamentalen Veränderungen der Zellmorphologie. Die Genexpression wurde nicht nur durch die Art des mechanischen Stimulus sondern auch durch die Eigenschaften des Substrates moduliert, auf oder in dem die Zellen kultiviert wurden. Das Transkriptionsprofil mechanisch belasteter Fibroblasten in Kollagen-Gelen deutet auf die Bildung eines aktivierten Fibroblasten-Phänotyps hin, der durch gesteigerte Matrixsynthese und Hemmung der Degradation gekennzeichnet ist. Weiterhin wurde die Expression ausgewählter Gene mit unbekannter und bekannter Funktion näher charakterisiert. Die Bildung des mechanisch induzierbaren Transkripts B19 konnte in verschiedenen humanen Geweben, u. a. auch in der Haut, nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Expression fand sich in frischem Narbengewebe. Die cDNA dieses Transkripts und die abgeleitete Aminosäuresequenz besitzen Homologien zu einer Familie von Ubiquitin-Carboxylhydrolasen, die in die Regulation des von Proteinabbau-Vorgängen involviert sind. Die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 wurde in mechanisch belasteten Fibroblasten in einer dreidimensionalen Umgebung induziert und wies den zweithöchsten differentiellen Expressionskoeffizienten aller untersuchten Transkripte auf. Die Überexpression von PAI-2 in kultivierten Sklerodermiefibroblasten deutet zudem auf eine Beteiligung des Protease-Inhibitors bei fibrotischen Erkrankungen hin. Die Untersuchungen führten zu einer umfassenden Beschreibung mechanisch stimulierter Fibroblasten und zur Identifizierung von Genen, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit mechanischer Stimulation gesehen wurden. Da die Genexpressionsmuster *in vitro* auch mit Beobachtungen *in vivo* korrelieren, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit Impulse für die Untersuchungen von physiologischen und pathologischen Prozessen geben, bei denen mechanische Kräfte eine Rolle spielen.

Each organism is continuously subjected to external mechanical forces as well as to internal mechanical strain generated by various cell types. Although dermal connective tissue is involved in the regulation of the mechanical force balance, little is known about the mechanisms by which mechanical stimuli influence fibroblast metabolism. Changes of the balance between matrix deposition and degradation by increased mechanical load lead to accumulation of extracellular matrix as seen in hypertrophic scars, keloids and fibrotic diseases.

To investigate the influence of mechanical forces on gene expression of dermal fibroblasts the cells were cultured *in vitro* in three-dimensional collagen lattices either under mechanically restrained (isometric) or relaxed (isotonic) conditions. cDNA-microchip array analysis in combination with

detailed Northern blot hybridization yielded a substantial number of differentially regulated transcripts with known as well as unknown function. Mechanical stimulation of fibroblasts induced transcription of extracellular matrix molecules, fibrogenic growth factors, protease inhibitors and components of focal contacts and the cytoskeleton while simultaneously downregulating inflammatory mediators, matrix-degrading enzymes and apoptosis-related molecules. Also fundamental changes of the cell morphology were detected. Further, the type of strain as well as the properties of the substrate induced different patterns of gene regulation. The transcriptional profile of mechanically loaded fibroblasts suggests that mechanical stimuli lead to an activated phenotype characterised by induction of connective tissue synthesis and inhibition of matrix degradation.

Further, genes with known and unknown functions were investigated. Expression of the mechanically inducible transcript B19 was detected in different human tissue including skin. B19 expression was elevated in scar tissue. The cDNA sequence and the deduced amino acid sequence are homologous to a family of ubiquitin C-terminal carboxylases.

The expression of plasminogen activator inhibitor type-2 is highly induced in mechanically stressed fibroblasts. Overexpression of PAI-2 in monolayer cultures of scleroderma fibroblasts suggests that this protease inhibitor is involved in the regulation of fibrotic diseases.

By characterising the transcriptional profile of mechanically stimulated fibroblasts a lot of genes were identified that had not been implicated in the regulation of mechanically stressed tissues so far. The correlation between findings in vitro and in vivo could form the basis to investigate physiological and pathological processes in which the mechanical force balance is altered.