

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mechanische Kräfte können in vielfältiger Weise auf den Organismus wirken und von Zellen des Organismus aufgebaut werden. Die Haut, als Schutzschicht des Organismus, ist in vivo ständig mechanischen Kräften ausgesetzt. Einige in der Haut vorkommende Zelltypen (Fibroblasten) können selbst mechanische Spannungen aufbauen, z.B. nach Verletzungen. Im Bestreben, Wunden möglichst rasch wieder zu verschließen, spielt neben der Herstellung einer provisorischen Matrix und der nachfolgenden Ablagerung neuer Matrix die Wundkontraktion durch Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Die Ablagerung neuer Matrix im Verlauf der Wundheilung ist ein streng regulierter Prozeß. Störungen durch gesteigerte mechanische Belastungen führen zu Änderungen der Regulation mit nachfolgender verstärkter Matrixablagerung wie z.B. bei der Fibrose- und Keloidentstehung.

Es sind verschiedene in vitro Modelle entwickelt worden, um die Zusammenhänge zwischen mechanischem Streß und den dadurch bedingten Modifikationen im Zellstoffwechsel zu untersuchen. Werden Fibroblasten in eine Kollagen Typ (I) Matrix gesät, kontrahieren sie isotonisch das Kollagengel zu einer Gewebe-ähnlichen Struktur (FL). Wird diese Kontraktion durch einen in die Petrischale platzierten Nylonfaden verhindert, erfolgt eine isometrische Kontraktion mit gesteigerter Spannung im Gel (BL). Diese Kollagengelsysteme simulieren die in vivo Bedingungen der Wundheilung sehr gut, da die Kraft von den Zellen selbst aufgebaut wird. Andere in vitro Modelle, bei denen die Kraft von außen auf das System einwirkt, sind im Gegensatz dazu weniger geeignet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation definierter Gene und deren Regulation durch mechanischen Streß zu untersuchen, und es galt, unbekannte, streßregulierbare Gene zu identifizieren. Die systematische Analyse der Kollagengelsysteme BL und FL erfolgte

1. für definierte Gene, die eine bekannte Rolle im Bindegewebsstoffwechsel spielen, mittels Northern Blot Analysen,
2. für definierte Gene, die bisher nicht im Zusammenhang mit auf Fibroblasten einwirkendem Streß gesehen wurden, durch die Atlas™-Hybridisierung und
3. für unbekannter Gene mittels modifizierter subtraktiver Hybridisierung (PCR-Select™).

Als Ergebnis der Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß zahlreiche Gene in vitro durch mechanischen Streß in Fibroblasten regulierbar waren. Dabei wurden EZM-Bestandteile und den EZM-Stoffwechsel steuernde Faktoren wie auch Zytoskelettbestandteile induziert. Weiterhin wurde eine Hemmung des Matrix-degradierenden Enzyms MMP-1 und eine verstärkte Expression eines Inhibitors der Matrixdegradation (PAI-2) nachgewiesen. Diese in vitro differentiell regulierten Gene sind nach Ergebnissen von in vivo Untersuchungen in fibrotischen Prozessen (z.B. Keloiden) und/oder während der Wundheilung erhöht. Diese Korrelationen lassen BL als ein geeignetes Modell für spätere Phasen der Wundheilung denkbar erscheinen und damit der Zusammenhang mit mechanischen Einflüssen untersucht werden kann. In entzündlichen Prozessen relevante Gene (ICAM-1, IL-6) werden unter mechanischem Streß vermindert exprimiert. Auch andere definierte Gene, deren Regulation durch mechanische Kräfte bisher nicht untersucht wurde, zeigten sich in

Fibroblasten beeinflussbar Beispielsweise wurde das humane Alu-RNA-bindende Protein induziert, während sich z. B. Inhibin- β vermindert exprimiert zeigte

Es wurden auch zwei bisher nicht definierte Gene detektiert:

1. Das humane PAST Gen und
2. der Klon Nr. 19

Diese Gene erwiesen sich in Fibroblasten unter isometrischen (BL) Bedingungen im Vergleich zu isotonischen (FL) als induzierbar. Die Gesamtsequenz des humanen PAST Gens wurde zeitgleich mit den eigenen Untersuchungen identifiziert. Von der Gesamtsequenz des Klons Nr. 19 konnten im Rahmen dieser Arbeit etwa 50% identifiziert werden. Klon Nr. 19 zeigte eine hohe Homologie zu einem EST-Klon, der aus mechanisch gestreßtem Gewebe, einem schwangeren Uterus, isoliert worden ist.

In nachfolgenden in situ Hybridisierungen auf mechanisch gestreßtem Gewebe im Vergleich mit normaler Haut soll die differentielle Expression der Gene in Fibroblasten und die Verteilung in der Haut untersucht werden. Weitere Analysen sind zur Aufklärung der Funktion beider Gene geplant

SUMMARY

Silke Dethlefsen

Molecular analysis of the influence of mechanical forces on the metabolism of primary human dermal fibroblasts

Mechanical forces affect organisms in many ways and they are also exerted by the organisms cells. Skin as the organisms protection barriere is constantly influenced by mechanical forces in vivo. Skin cells (fibroblasts) can build up mechanical tension themselves, i.e. in the process of injury. Essential in this process is the closure of wounds as soon as possible due to provisional matrix production, later on deposition of new matrix and wound contraction by fibroblasts. Deposition of new matrix in the progress of wound healing is a strictly regulated process. Increased mechanical load causes changes in regulation with following increased matrix deposition as seen in the development of fibrosis and keloids

Several in vitro modells came up to investigate the relation between mechanical stress and the subsequent modification in cell metabolism. Seeding fibroblasts into a collagen type I matrix is followed by isotonic contraction of the collagen gel to a dermis-like structure (FL). Prevention of isotonic contraction by placing a nylon thread in the petri dish produces an isometric contraction and increased tension in the collagen gel (BL). These collagen gel systems represent virtually in vivo wound healing conditions, because the forces are exerted by the cells themselves. Other in vitro models using external forces are therefore less suitable for studying wound healing

The purpose of this study was to investigate the regulation of known genes, their regulation by mechanical forces and the identification of unknown stress regulated genes. The systematical approach to examine the collagen gel systems included:

- 1st Northern blot analysis for investigation of known genes with known function in the connective tissue metabolism,
- 2nd the „ATLAS™ human cDNA expression array“ for investigation of known genes which haven't been examined in context with fibroblasts influenced by mechanical stress and
- 3rd a modified subtractive hybridization for detection of unknown genes (PCR-Select™).

As a result of this study it turned out that several genes in fibroblasts are regulated by mechanical forces under these in vitro conditions. Components of the extracellular matrix (ECM), factors controlling the ECM-metabolism as well as elements of the cytoskeleton are induced. Moreover an inhibition of the matrix degrading enzyme MMP-1 and an increased expression of an inhibitor of matrix degradation (PAI-2) became evident. These in vitro differentially regulated genes are upregulated in fibrotic processes (i.e. keloids) and/or during woundhealing according to in vivo studies. These correlations underline the suitability of BL as an in vitro wound healing system so that the effects of mechanical forces can be studied. Expression of genes involved in inflammatory processes (ICAM-1, IL-6) is repressed under mechanical stress. In

addition other known genes are affected in fibroblasts which have not yet been examined in the context of regulation by mechanical forces. For example it was demonstrated an induction of the human Alu-RNA binding protein and a repression of Inhibin- β .

The following non-defined genes were detected:

1st The human PAST gene and 2nd Clon no.19.

These genes are induced in fibroblasts under isometric (BL) in comparison to isotonic (FL) conditions. The complete sequence of the human PAST gene was identified at the same time with the own studies. 50% of clone no 19's sequence were identified in this study. Clon no.19 showed a high homology to an EST-clon which was isolated from a mechanically stressed tissue, a pregnant uterus.

In subsequent *in situ* hybridization on mechanically stressed tissue in comparison to normal skin differential expression of these genes in fibroblasts and their distribution in skin will be investigated. Further analysis is planned to elucidate gene function.